



**HAL**  
open science

# Impact du microenvironnement diabétique de type 2 sur les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse : potentiel d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif intracellulaire et la réparation osseuse

Rebecca Landon

## ► To cite this version:

Rebecca Landon. Impact du microenvironnement diabétique de type 2 sur les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse : potentiel d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif intracellulaire et la réparation osseuse. Biotechnologies. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5289 . tel-04861187

**HAL Id: tel-04861187**

**<https://theses.hal.science/tel-04861187v1>**

Submitted on 2 Jan 2025

**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 Paris Cité

École doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (ED 561)

*Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B3OA)*

*(CNRS UMR 7052, INSERM U 1271)*

## **Impact du microenvironnement diabétique de type 2 sur les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse : potentiel d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif intracellulaire et la réparation osseuse**

Par **Rebecca LANDON**

Thèse de doctorat de Biothérapies et Biotechnologies

Dirigée par **Fani ANAGNOSTOU**

Présentée et soutenue publiquement le **19 décembre 2023**

Devant un Jury composé de :

<b>Fani ANAGNOSTOU</b>	PU-PH	Université Paris Cité	Directrice de thèse
<b>Frédéric LEZOT</b>	CR-HDR	Sorbonne Université	Rapporteur
<b>Angela SUTTON</b>	PU-PH	Université Sorbonne Paris Nord	Rapporteuse
<b>Catherine LEVISAGE</b>	DR	Université de Nantes	Présidente du jury
<b>Mauro ALINI</b>	Group Leader	AO Research Institute Davos	Examineur
<b>Fabienne FOUFELLE</b>	DR	Sorbonne Université	Examinatrice
<b>Virginie GUEGUEN</b>	CR	Université Sorbonne Paris Nord	Membre invité
<b>Graciela PAVON-DJAVID</b>	HDR	Université Sorbonne Paris Nord	Membre invité

## RÉSUMÉ

### **Impact du microenvironnement diabétique de type 2 sur les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse : potentiel d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif intracellulaire et la réparation osseuse**

Le diabète type 2 (DT2) est un problème de santé majeur. Il touche plus de 5% de la population mondiale et sa prévalence ne cesse d'augmenter. Le DT2 est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique, entraînant de sévères complications dont la prise en charge est lourde et coûteuse. Le DT2, n'épargne pas le tissu osseux, augmentant le risque de fracture et limitant le potentiel de réparation osseuse. Les mécanismes sous-jacents sont complexes, mais le microenvironnement DT2 reste un des éléments déterminants. En effet, l'hyperglycémie chronique entraîne une formation exacerbée de produits de glycation avancés (AGEs) et un stress oxydatif chronique modifiant la matrice et la fonctionnalité cellulaire y compris celle des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSMs). Les CSMs sont des actrices essentielles dans l'homéostasie et la réparation osseuse et des candidates prometteuses pour l'ingénierie tissulaire, or l'impact des AGEs et du stress oxydatif sur ces cellules reste partiellement caractérisé. De plus, l'utilisation d'antioxydants, sur les CSMs, pour la régulation du stress oxydatif intracellulaire a été peu investiguée jusqu'à maintenant.

L'objectif de ces travaux de thèse visait à comprendre l'impact du microenvironnement DT2 sur les CSMs et le potentiel thérapeutique d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif, induit par les AGEs. Le rat Zucker Diabetic Fatty (ZDF) a été utilisé comme modèle animal du DT2 et son homologue sain le rat Zucker Lean (ZL) comme contrôle. Nous avons montré que les CSMs-ZDF, issues d'un microenvironnement DT2 de longue durée, et cultivées *in vitro* en normoglycémie, présentent des modifications de plusieurs fonctions pertinentes pour la réparation osseuse comparées à celles issues des animaux contrôle. Ainsi, l'utilisation de CSMs autologues, en l'état, semble compromise pour les thérapies de réparation osseuse.

Pour mieux comprendre l'impact de l'hyperglycémie chronique sur les CSMs, nous avons étudié les effets des AGEs. Les résultats ont montré que les AGEs altèrent la viabilité, la prolifération, la migration et le profil d'expression génique des CSMs. Les effets des AGEs sur CSMs-ZDF étaient plus prononcés que ceux observés sur les CSMs-ZL. Dans les deux types

cellulaires, ils conduisent à un état de stress oxydatif par la production en excès d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaire (iROS) ; il est rapide et n'induit pas la formation d'excès de superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) par les mitochondries. Afin de réguler les iROS, induits par les AGEs, nous avons étudié le potentiel de la N-acétylcystéine et l'astaxanthine, deux antioxydants puissants. Les résultats ont montré que les taux de iROS sont similaires chez les CSMs -ZDF et CSMs -ZL, et qu'ils sont modulés différemment en réponse aux antioxydants. La co-exposition des CSMs aux antioxydants s'est avérée plus efficace que la pré-exposition pour la régulation des iROS. L'astaxanthine a montré une excellente cytocompatibilité, contrairement à la N-acétylcystéine qui diminue la viabilité des CSMs-ZDF. De plus, les CSMs-ZDF ont montré un profil d'expression génique, en réponse à l'exposition aux antioxydants, différent de celui des CSM-ZL. Enfin, l'implantation *in vivo* dans un modèle de défaut osseux subcritique chez le rat sain, d'hydrogels contenant de l'astaxanthine semble favoriser une néoformation osseuse.

Dans l'ensemble, cette thèse contribue à une meilleure compréhension de l'impact du microenvironnement du DT2 sur le tissu osseux et met en avant l'impact négatif du diabète de long-durée, des AGEs générés par l'hyperglycémie et de l'excès de stress oxydatif dans la fonctionnalité de CSMs. Les résultats obtenus mettent en question l'utilisation de CSMs de la moelle osseuse autologues, chez les individus DT2 dans le cadre de thérapie cellulaire et soulignent l'intérêt, pour la régulation du stress oxydatif, de l'utilisation des antioxydants dans le cadre de la réparation tissulaire osseuse.

**Mots clés :** diabète de type 2, cellules souches mésenchymateuses, stress oxydatif, produits de glycation avancés, antioxydant



# ABSTRACT

## **Impact of the type 2 diabetic microenvironment on bone marrow mesenchymal stem cells: potential of antioxidants for the regulation of intracellular oxidative stress and bone repair**

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a major health problem. It affects more than 5% of the world's population, and its prevalence continues to rise. T2DM is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycaemia, leading to severe complications (heart disease, nephropathy, retinopathy, neuropathy, etc.) that are costly and time-consuming to treat. T2DM does not spare bone tissue, increasing the risk of fracture and limiting bone repair potential. The underlying mechanisms are complex, but the T2DM microenvironment remains one of the determining factors. Chronic hyperglycaemia leads to the exacerbated formation of advanced glycation products (AGEs) and chronic oxidative stress modifying the matrix and cellular functionality, including that of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs are essential actors in bone homeostasis, bone repair and promising candidates for tissue engineering, yet the impact of AGEs and oxidative stress on these cells remains only partially characterized. Furthermore, the use of antioxidants on MSCs to regulate intracellular oxidative stress has been little investigated to date.

The aim of this PhD work was to understand the impact of the T2DM microenvironment on mesenchymal stem cells and the therapeutic potential of antioxidants for the regulation of oxidative stress induced by AGEs. The Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat was used as an animal model of T2DM and its healthy counterpart the Zucker Lean (ZL) rat as a control. We have shown that ZDF-MSCs derived from a long-standing T2DM microenvironment and cultured *in vitro* under normoglycaemia display changes in several functions relevant to bone repair (adhesion, clonogenicity, proliferation, migration, adipocyte differentiation) compared with those derived from control animals. As such, the use of autologous MSCs seems compromised for bone repair therapies.

To better understand the impact of chronic hyperglycaemia on MSCs, we studied the effects of AGEs. The results showed that AGEs alter the viability, proliferation, migration and gene expression profile of MSCs. The effects of AGEs on ZDF-MSCs were more pronounced than those observed on ZL-MSCs. In both cell types, they lead to oxidative stress through the excess

production of intracellular reactive oxygen species (ROS); which is very rapid, remains constant for 60min and does not induce the formation of excess superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) by the mitochondria. To regulate intracellular ROS induced by AGEs or other inducers, we studied the potential of N-acetylcysteine and Astaxanthin, two powerful antioxidants, on MSCs. The results showed that intracellular ROS levels are similar in ZDF- and ZL-MSCs, and are modulated differently in response to antioxidants. Co-exposure to antioxidants was more effective than pre-exposure in regulating intracellular oxidative stress in MSCs. ZDF-MSCs also showed a gene expression profile, in response to exposure to antioxidants, that differed from that of ZL-MSCs. Finally, *in vivo* implantation of hydrogels containing Astaxanthin in a subcritical bone defect model in healthy rats appears to promote bone neoformation.

Overall, this thesis contributes to a better understanding of the impact of the T2DM microenvironment on bone tissue and highlights the negative impact of long-term diabetes, AGEs generated by hyperglycaemia and excess oxidative stress on the functionality of MSCs. The results call into question the use of autologous bone marrow MSCs in T2DM individuals as part of cell therapy and highlight the importance of using antioxidants to regulate oxidative stress as part of bone tissue repair.

**Keywords:** type 2 diabetes, mesenchymal stem cells, oxidative stress, advanced glycation products, antioxidant

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier M. Hervé PETITE, directeur du laboratoire B3OA, qui m'a accueillie au sein du laboratoire, ainsi que le ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement et de la Recherche Français pour l'attribution de la bourse qui m'a permis d'effectuer cette thèse.

Mes pensées se tournent évidemment vers ma directrice de thèse, Mme Fani Anagnostou, et ma co-encadrante de thèse, Mme Graciela Pavon-Djavid, qui m'ont accompagnée pendant ces quatre années. Merci pour votre confiance, votre patience et votre soutien sans faille. Votre passion et votre gentillesse m'ont beaucoup apporté et m'ont fait grandir autant scientifiquement que personnellement.

Je remercie mes deux rapporteurs Mme Angela SUTTON et M. Frédéric LEZOT d'avoir accepté cette responsabilité et d'accorder un temps précieux à ce travail. Un grand merci à Mme Catherine LEVISAGE, Mme Fabienne FOUFELLE et M. Mauro ALINI d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse et de leur présence en cette occasion.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire B3OA et celle du LVTS pour leur accueil et leur aide, c'était un plaisir de travailler avec vous ! Un grand merci à Virginie pour son accompagnement scientifique et son aide lors de la synthèse des complexes, Olivier et Hanane pour la gestion de mes échantillons histologiques et leur grande disponibilité.

Je ne peux oublier mon duo préféré qui ont subi mes pleurs, rires et excès au bar : Pauline et Nath, je vous adore et merci d'avoir été là pour moi ! (Pas de panique, je ne vais pas disparaître)

Je remercie toute l'équipe des thésards pour leur bonne humeur et la joie qu'ils apportent au laboratoire et en dehors : Ahmad, Mathilde, Angelina, Morgane, Samantha, Léa, William, Gabi, Guoyan (best office-mate) ... Je vous souhaite plein de succès, vous êtes des rayons de soleil !

Last but not least, ma famille et mes ami(e)s. Même si vous ne comprenez pas toujours ce que je fais, vous m'avez toujours soutenue et encouragée dans mes projets et mes passions et je ne vous en remercierai jamais assez. Merci à mes rayons de soleil : ma grande sœur, mes parents et Lulu qui me supportent au quotidien (ce qui n'est pas une mince affaire !)

# Publications

## Articles publiés

- Ribot J, Denoeud C, Frescaline G, **Landon R**, Petite H, Pavon-Djavid G, Bensidhoum M, Anagnostou F. *Experimental Type 2 Diabetes Differently Impacts on the Select Functions of Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells*. Cells. 2021 Jan 29;10(2):268. doi: 10.3390/cells10020268. PMID: 33572905; PMCID: PMC7912056.
- Barzegari A, Omid Y, **Landon R**, Gueguen V, Parvizpour S, Meddahi-Pellé A, Anagnostou F, Pavon-Djavid G. *The protective effect of N-acetylcysteine on antimycin A-induced respiratory chain deficiency in mesenchymal stem cells*. Chem Biol Interact. 2022 Jun 1;360:109937. doi: 10.1016/j.cbi.2022.109937. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35430258.
- Barzegari A, Aaboulhassanzadeh S, **Landon R**, Gueguen V, Meddahi-Pellé A, Parvizpour S, Anagnostou F, Pavon-Djavid G. *Mitohormesis and mitochondrial dynamics in the regulation of stem cell fate*. J Cell Physiol. 2022 Sep;237(9):3435-3448. doi: 10.1002/jcp.30820. Epub 2022 Jul 1. PMID: 35775725.
- **Landon R**, Gueguen V, Petite H, Letourneur D, Pavon-Djavid G, Anagnostou F. *Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications*. Mar Drugs. 2020 Jul 9;18(7):357. doi: 10.3390/md18070357. PMID: 32660119; PMCID: PMC7401277.

## Article en rédaction

- **Landon R**, Bakari W, Barzegari A, Frescaline G, Larochette N, Thibaudeau O, El-Hafci H, Gueguen V, Pavon-Djavid G, Anagnostou F. *Long standing DT2 modify N-acetylcysteine effects on oxydative stress induced by AGEs in mesenchymal stem cells*.
- **Landon R**, Bakari W, Barzegari A, Larochette N, Thibaudeau O, El-Hafci H, Gueguen V, Pavon-Djavid G, Anagnostou F. *The protective effect of Astaxanthin on MSCs mediated osteogenesis, in diabetes type 2 context*.

### Communication orale

- Congrès national
  - **Landon R.**, Pavon-Djavid G, Anagnostou F « *Impact of diabetic microenvironment on mesenchymal stromal cells and therapeutic potential of antioxidant* » Journées scientifiques de l'Institut des maladies ostéo-articulaires (IMOA), Paris, France, juin 2022 (*Prix de présentation orale*)

### Communications affichées

- Congrès internationaux
  - **Landon R.**, Barzegari A, Larochette N, Gueguen V, Petite H, Pavon-Djavid G, Anagnostou F « *AGEs-induced oxidative stress regulation as a potential target to attenuate the impact of the diabetic microenvironment on mesenchymal stromal cells* ». Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asia Pacific Chapter (TERMIS-AP), Jeju, Corée du Sud, octobre 2022
  - **Landon R.**, Desbord M, Babinet L, Diallo A.M, Larochette N, El-Hafci H, Soulié J, Combes C & Anagnostou F « *Osteoformation potential of a new pyrophosphate-based glass in critical-size defects in the rat calvarium* ». Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - European Chapter (TERMIS-EU), Cracovie, Pologne, juin 2022
- Congrès nationaux
  - **Landon R.**, Ribot J, Frescaline G, Pavon-Djavid G & Anagnostou F « *Advanced Glycation End Products impact on select functions of rat mesenchymal stromal cells harvested from non-diabetic and diabetic rats* ». Journées Françaises de biologie des tissus minéralisés (JFBTM), La Baule, France, avril 2022
  - **Landon R.**, Desbord M, Siadous R, Diallo A.M, Larochette N, El-Hafci H, Soulié J, Amédée J, Combes C, Anagnostou F « *New amorphous calcium ortho-/pyrophosphate biomaterial promotes bone repair of critical-sized calvarial defects in rat* ». European society for biomaterials (ESB), Bordeaux, France, septembre 2022

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>0</b>
<b>CONTEXTE DE L'ETUDE</b>	<b>5</b>
1 <i>Diabète et Tissu osseux</i>	6
1.1 Le Diabète	6
1.1.1 Épidémiologie	6
1.1.2 Le diabète de type 1	6
1.1.3 Le diabète de type 2	7
1.1.4 Physiopathologie	7
1.1.5 Complications chroniques du diabète	8
1.2 Tissus osseux	11
1.2.1 Généralités sur le tissu osseux	11
1.2.2 Le tissu osseux chez le patient DT2	12
1.3 Modèle d'étude du diabète de type 2	15
1.3.1 Les modèles petits rongeurs pour le DT2	15
1.3.2 Le rat Zucker diabetic fatty (ZDF)	17
1.3.3 Rôle de la Leptine et de son récepteur	19
2 <i>Microenvironnement du diabète de type 2 et cellules souches mésenchymateuses</i>	21
2.1 Microenvironnement du DT2	21
2.1.1 Les produits avancés de la glycation (AGEs)	21
2.1.2 Le stress oxydatif	24
2.1.3 L'inflammation	29
2.1.4 Mécanismes de défense cellulaire	29
2.2 Potentiel des cellules souches mésenchymateuses dans le contexte DT2	31
2.2.1 Cellules souches mésenchymateuses et tissu osseux	31
2.2.2 Problématique du microenvironnement DT2 pour les CSMs	35
3 <i>Potentiel des antioxydants</i>	36
3.1 Utilisations d'antioxydants dans un contexte diabétique	36
3.2 Antioxydants d'intérêt pour notre étude	37
3.2.1 La N-acétylcystéine	37
3.2.2 L'Astaxanthine	38
<b>HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	<b>39</b>
<b>CHAPITRE I IMPACT DU DIABETE DE TYPE 2 SUR LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES</b>	<b>42</b>
<i>Article : Experimental Type 2 Diabetes Differently Impacts on the Select Functions of Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells</i>	42
<i>Points importants et interface</i>	59
<b>CHAPITRE II EFFETS DE COMPOSÉS DU MICROENVIRONNEMENT DT2 (STRESS OXYDATIF, AGEs) ET ETUDE DU POTENTIEL D'UN ANTIOXYDANT DE REFERENCE, POUR REGULER LE STRESS OXYDATIF AU NIVEAU DES CSMs</b>	<b>60</b>
<i>Article: The protective effect of N-acetylcysteine on antimycin A-induced respiratory chain deficiency in mesenchymal stem cells</i>	62
<i>Article : Long standing DT2 modify N-acetylcysteine effects on oxydative stress induced by AGEs in mesenchymal stem cells</i>	75
1 <i>Introduction</i>	76
2 <i>Materials and Methods</i>	77
2.1 Animal Model	77
2.2 Histology and immunohistochemistry	78
2.3 Isolation of Rat Bone Marrow-derived Multipotent Stromal Cells	78
2.4 Advanced Glycation Endproducts-effects on BMMSCs harvested from ZL and ZDF rats	79
2.4.1 Cytotoxicity	79
2.4.2 Cell survival and morphology	79
2.4.3 Cell Proliferation	80
2.4.4 Cell Migration	80

2.4.5	Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis	80
2.4.6	Reactive Oxygen Species (ROS) measurement	81
2.5	Statistical Analyses	82
3	<b>Results</b>	83
3.1	Biochemical parameters and body weight in long-standing diabetic ZDF rats	83
3.2	Long-standing Type 2 Diabetes affects bone marrow mesenchymal stromal cells microenvironment	84
3.3	AGEs alter select functions of bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro	86
3.4	AGEs modulate differently select genes expression	88
3.5	Effects of NAC on AGEs-induced intracellular ROS generation	90
4	<b>Discussion</b>	94
	<i>Points importants et interface</i>	97
 <b>CHAPITRE III POTENTIEL DE L'ASTAXANTHINE POUR RETABLIR L'EQUILIBRE REDOX DES CSMs, DANS LE CONTEXTE DT2, ET LA REPARATION OSSEUSE</b>		<b>98</b>
	<i>Review: Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications</i>	100
	<i>Article : The protective effect of Astaxanthin on MSCs mediated osteogenesis, in diabetes type 2 context</i>	121
1	<b>Introduction</b>	122
2	<b>Matériel et méthodes</b>	123
2.1	Synthèse et caractérisation des complexes CD-A	123
2.1.1	Synthèse	123
2.1.2	Caractérisation	124
2.1.3	Test de la capacité antioxydante contre les radicaux d'oxygène (ORAC)	125
2.2	Effet des CD-A sur les CSMs <i>in vitro</i>	125
2.2.1	Évaluation de la cytotoxicité par MTT	125
2.2.2	Mesure de l'activité antioxydante intracellulaire des CD-A	126
2.2.3	Expression génique	126
2.3	Étude <i>in vivo</i>	127
2.3.1	Synthèses des hydrogels	127
2.3.2	Animaux et modèle expérimental	128
2.3.3	Protocole chirurgical	128
2.3.4	Analyse micro-CT	129
2.3.5	Histologie	131
3	<b>Résultats</b>	132
3.1	Caractérisation	132
3.1.1	Capacité antioxydante des CD-A contre les radicaux d'oxygène	133
3.2	Effet des CD-A sur les CSMs <i>in vitro</i>	133
3.2.1	Cytocompatibilité des complexes CD-A	133
3.2.2	Effet antioxydant des CD-A sur les ROS intracellulaires	135
3.2.3	Effet de CD-A sur l'expression de gènes relatif à l'ostéogénèse et l'inflammation	139
3.3	Étude <i>in vivo</i>	141
3.3.1	Analyse micro-CT	141
3.3.2	Histologie	142
4	<b>Discussion et Conclusion</b>	143
5	<b>Annexe</b>	146
6	<b>Points importants</b>	147
 <b>DISCUSSION GENERALE</b>		<b>148</b>
 <b>CONCLUSION GENERALE, PERSPECTIVES, LIMITES ET FORCES DE L'ETUDE</b>		<b>154</b>
 <b>REFERENCES</b>		<b>158</b>

# Liste des Abréviations

## Français :

AAPH = 2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide, dihydrochloride

AMPK = protéine kinase activée par l'AMP

ADN = Acide désoxyribonucléique

ADP = Adénosine Di-Phosphate

AGE = Produits de glycation avancés

ALP = Phosphatase alcaline

AMA = Antimycine A

ARN = Acide ribonucléique

ASX = Astaxanthine

ATB = Antibiotiques

ATP = Adénosine Tri-Phosphate

BV = Volume osseux

CAA = Activité antioxydante cellulaire

CD-A = Complexes antioxydant Cyclodextrine et Astaxanthine

CSM = Cellule souche mésenchymateuse

CXCL1 = Chemokine C-X-C motif ligand 1

DCFH-DA = Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate

DHE = Dihydroethidium

DMO = Densité minérale osseuse

DT1 = Diabète de type 1

DT2 = Diabète de type 2

GSH = Glutathion

IL = Interleukine

NAC = N-acetylcysteine

Ob-Rb ou Lepr = Récepteur de la Leptine

RAGE = Récepteur des produits de glycation avancés

ROS = Espèces réactives de l'oxygène

iROS = Espèces réactives de l'oxygène intracellulaires

mROS = Espèces réactives de l'oxygène mitochondriales

SO = Stress oxydatif

STZ = Streptozotocine



SVF = Sérum de veau fœtal

t-buOOH = di-tert-butyl-peroxide

TV = Volume tissulaire

ZDF = Rat Zucker Diabetic Fatty

ZL = Rat Zucker Lean

18S = 18S Ribosomal RNA

Anglais :

AGE = Advanced Glycation Endproduct

$\alpha$ MEM = Alpha Modification of Eagle's Medium

BMMSC = Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell

BSA = Bovine Serum Albumin

FBS = Foetal Bovin Serum

FDA = Food and Drug Administration

HIF-1 $\alpha$  = hypoxia-inducible factor 1

IGF-1 = insulin-like growth factor 1

mTOR = mammalian target of rapamycin

ORAC = Oxygen Radical Absorbance Capacity

OS = Oxydative Stress

PPARG = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

RANKL = TNF superfamily member 11

RUNX2 = Runt-related transcription factor 2

TEAC = Trolox equivalent antioxidant capacity

TNF- $\alpha$  = Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

# Liste des Figures

*Figures hors articles publiés*

<b>Figure 1.</b> Développement du DT2 chez le rat Zucker Diabetic Fatty .....	18
<b>Figure 2.</b> Signalisation intracellulaire par le récepteur de la leptine (Ob-Rb) .....	19
<b>Figure 3.</b> Schéma de formation des AGEs .....	22
<b>Figure 4.</b> Voie des polyols.....	26
<b>Figure 5.</b> Dommages oxydatifs induits par les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	28
<b>Figure 6.</b> Cellules souches et différenciation.....	31
<b>Figure 7.</b> Étapes de la réparation osseuse.....	33
<b>Figure 8.</b> Structure moléculaire de la N-acétylcystéine.....	37
<b>Figure 9.</b> Structure moléculaire de l'Astaxanthine .....	38
<b>Figure II-1.</b> Type 2 diabetes mellitus (T2DM) affects the bone marrow .....	85
<b>Figure II-2.</b> Impaired cell survival, proliferation, and migration of ZDF-BMMSCs treated with AGEs in normoglycemic condition.....	87
<b>Figure II-3.</b> Expression of select inflammation, Adipo-Osteogenic- and diabetic microenvironment related genes from ZL and ZDF-BMMSCs cultured with AGEs-BSA .....	89
<b>Figure II-4.</b> Intracellular reactive oxygen species (ROS) measurement in ZDF-MSCs and Lean-MSCs when exposed to 100ug/mL of AGEs-BSA .....	90
<b>Figure II-5.</b> N-acetylcysteine (NAC) pre-treatment impact on intracellular reactive oxygen species (ROS) measurement in ZDF-MSCs and ZL-MSCs, exposed to AGEs-BSA; di-tert-butylperoxide (t-buOOH) and AAPH.....	92
<b>Figure II-6.</b> Impact of N-acetylcysteine (NAC) cotreatment on reactive oxygen species (ROS) measurement in ZDF-MSCs and ZL-MSCs, exposed to AGEs-BSA; t-buOOH and AAPH .....	93
<b>Figure III-1.</b> Méthode de synthèse des complexes CD-A.....	124
<b>Figure III-2.</b> Schéma simplifié chirurgie de formation de défauts dans la calvaria de rats....	129
<b>Figure III-3.</b> Caractérisation des complexes CD-A .....	132
<b>Figure III-4.</b> Capacité antioxydante des complexes CD-A.....	133
<b>Figure III-5.</b> Évaluation in vitro de la cytocompatibilité du complexe CD-A et d'un antioxydant de référence le N-acétylcystéine (NAC).....	134

<b>Figure III-6.</b> Impact de la pré-exposition des complexes cyclodextrine-astaxanthine (CD-A) sur la mesure des espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les ZDF-CSM et les ZL-CSM, lorsqu'elles sont exposées à des AGEs-BSA, du t-buOOH ou de l'AAPH .....	136
<b>Figure III-7.</b> L'activité antioxydante cellulaire (CAA) du complexe cyclodextrine-astaxanthine (CD-A) utilisé en pré-exposition.....	137
<b>Figure III-8.</b> L'activité antioxydante cellulaire (CAA) du complexe cyclodextrine-astaxanthine (CD-A) utilisé en co-exposition.....	138
<b>Figure III-9.</b> Expression de certains gènes liés à la différenciation, au microenvironnement diabétique et à l'inflammation dans les ZL et ZDF-CSMs cultivés avec 5 $\mu$ M CD-A.....	139
<b>Figure III-10.</b> Expression de certains gènes liés à la différenciation, au microenvironnement diabétique et à l'inflammation dans les ZL et ZDF-CSMs cultivés avec 5mM NAC .....	140
<b>Figure III-11.</b> Suivi in vivo par micro-CT de la cicatrisation osseuse dans les défauts sub-critiques de la calvaria de rats comblés avec des hydrogels chargés en CD-A .....	141
<b>Figure III-12.</b> Analyses histologiques de la néoformation osseuse dans les défauts sub-critiques de la calvaria de rats comblés avec des hydrogels chargés en CD-A .....	142

# Liste des Tableaux

*Tableaux hors articles publiés*

<b>Tableau 1</b> Modèles petits rongeurs pour le diabète de type 2 .....	16
<b>Tableau II-1</b> Blood parameters in ZDF and Lean rats .....	83
<b>Tableau III-1</b> Composition des hydrogels .....	128
<b>Tableau III-2</b> Mesure du pH des milieux de culture complets en présence d'antioxydants à différentes concentrations, avant une exposition aux CSMs .....	134

## **INTRODUCTION GENERALE**

Le diabète est un problème de santé majeur qui touchait en 2021, 536,6 millions de personnes dans le monde. Parmi les différents types de diabètes, le diabète de type 2 (DT2) représente 90 % des cas diagnostiqués et sa prévalence tendrait à augmenter de façon exponentielle dans les années à venir. Le DT2 est une maladie métabolique chronique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Lorsqu'elle n'est pas étroitement contrôlée, cette hyperglycémie affecte de nombreux types de cellules, de tissus et d'organes, entraînant de sévères complications dont la prise en charge est lourde et coûteuse pour les patients et la société. Les complications du diabète les plus documentées sont les complications avec atteintes vasculaires, or le tissu osseux n'est pas épargné. En effet, le DT2 affecte l'homéostasie et la fonctionnalité du tissu osseux. Les patients atteints de DT2 présentent une fragilité du squelette et un risque accru de pathologies fracturaires accompagné d'une altération de la cicatrisation et du remodelage osseux. L'augmentation à la fois de la prévalence de patients DT2 et de leur espérance de vie par une meilleure prise en charge contribue à l'augmentation de cas cliniques dans les domaines orthopédique, maxillo-facial et dentaire. Ces patients DT2 nécessitant une prise en charge adaptée, la compréhension de l'effet du DT2 sur le tissu osseux est donc primordiale pour la mise en place de stratégies efficaces pour la cicatrisation osseuse dans le contexte diabétique.

Plusieurs approches scientifiques ont été mises en place pour appréhender l'impact du DT2 comme (i) l'étude de prélèvements tissulaires et/ou cellulaires provenant de patients ou de modèles animaux DT2, ou encore (ii) l'étude *in vitro* de cellules exposées à des conditions de culture « mimant » une ou plusieurs caractéristiques du DT2. L'hyperglycémie chronique a des conséquences néfastes au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire ; induisant l'apparition et la progression des angiopathies, rétinopathies, néphropathies, neuropathies associées au DT2. Les altérations du tissu osseux sont au moins en partie imputées au microenvironnement DT2, mais les résultats des études parfois contradictoires maintiennent une grande incompréhension sur les mécanismes et conséquences d'une exposition à ce microenvironnement. En effet, ce dernier, extrêmement complexe, implique différents acteurs, notamment les produits avancés de glycation (AGEs) et le stress oxydatif, qui font en partie l'objet des travaux de cette thèse.

Des concentrations élevées d'AGEs ont été observées chez des patients atteints de DT2, ainsi qu'une augmentation de leur taux sérique avec la chronicité de la maladie. Les AGEs sont une famille de composés de natures chimiques diverses, ils peuvent provenir de l'alimentation, mais aussi être produits directement dans notre organisme par un ensemble de réarrangements moléculaires. L'hyperglycémie conduit à une accumulation d'AGEs dans l'organisme, suite à des réactions non-enzymatiques entre des sucres réducteurs et des protéines, des lipides ou des

acides nucléiques. Dans un contexte pathologique, les AGEs ont un effet nuisible indirect via l'altération de la structure et des fonctions des protéines matricielles, intracellulaires, des lipides et de l'ADN. Cela impacte la fonction des cellules et leurs interactions au sein d'un tissu. De plus, les AGEs présents dans l'environnement extracellulaire peuvent aussi directement interagir avec leur récepteur RAGE, transmembranaire, induisant un stress oxydatif intracellulaire.

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des défenses antioxydantes. S'il existe une signalisation « redox », modulée par des changements d'équilibre au niveau cellulaire et induisant différents mécanismes de signalisation (transcription, activité kinase...); dans le cadre du DT2 un état pro-oxydant est impliqué à la fois dans le développement du diabète et dans ses complications chroniques. Plusieurs mécanismes, liés à l'hyperglycémie, conduisent à l'état de stress oxydatif observé dans le contexte diabétique comme (i) l'augmentation de l'activité mitochondriale, (ii) la voie des polyols convertissant le glucose en fructose, (iii) l'auto-oxydation du glucose entraînant une formation de radicaux hydroxyle ou encore (iv) les glycations non-enzymatiques conduisant à la formation d'AGEs et l'interaction de ces derniers avec leur récepteur. L'accumulation des ROS au niveau cellulaires altère différents composants cellulaires (protéines, lipides, ADN) et modifie la fonctionnalité des cellules. Bien qu'il existe des mécanismes de défense au niveau cellulaire pour lutter contre le stress oxydatif, ils se révèlent paradoxalement diminués alors que le stress oxydatif augmente.

Le microenvironnement diabétique représente donc des conditions néfastes pour la survie des cellules et n'épargne pas les cellules souches, or les cellules souches (ou stromales) mésenchymateuses (CSMs) sont des cellules cruciales pour le remodelage, la réparation osseuse et des candidats potentiels pour les thérapies cellulaires. En effet, l'utilisation de CSMs pourrait améliorer localement la réparation osseuse via leur effet paracrine impliqué dans la médiation de l'inflammation et la vascularisation ainsi que leur potentiel de différenciation en ostéoblastes (cellules ostéoformatrices). Dans le cadre d'un traitement clinique, l'utilisation de CSMs d'origine autologue serait l'approche la plus simple. Cependant, des études précédentes ont montré que les CSMs issues d'environnement DT2 présentent une altération de leurs fonctionnalités, elles ne semblent donc pas être de bonnes candidates telles quelles. De plus, le microenvironnement affecte la fonction *in situ* des CSMs et bien que les études dans le contexte DT2 restent rares et les processus impliqués peu clairs le microenvironnement DT2 altère certaines fonctions des CSMs. Des études plus approfondies sur les modifications des CSMs issues d'individus diabétiques et/ou cultivées dans un milieu « mimant » un

microenvironnement DT2 permettront de mieux comprendre l'impact de ce microenvironnement, des voies impliquées, ainsi que de l'apport potentiel des CSMs en thérapie cellulaire.

En effet, une approche potentielle pour contrer le stress oxydatif du microenvironnement DT2 *in situ*, ou pour le pré-conditionnement de CSMs pour la thérapie cellulaire serait l'utilisation de molécules antioxydantes. Les antioxydants suscitent l'intérêt scientifique depuis plusieurs années, que ce soit pour la régulation de la glycémie, l'inflammation et du stress oxydatif ou encore dans le cadre de la prévention/traitement des complications micro- et macro-vasculaires. Parmi le très grand nombre d'antioxydants, nous avons, dans les travaux de cette thèse, choisi d'en sélectionner deux : la N-acetylcystéine (NAC), qui est un antioxydant de référence servant souvent comme contrôle dans la littérature et l'astaxanthine (ASX) qui est un caroténoïde ayant une activité antioxydante très puissante. Peu d'études sur l'exposition de CSMs à ces antioxydants ont été réalisées, elles suggèrent une réduction du stress oxydatif intracellulaire et une amélioration de fonctions pertinentes pour la réparation osseuse associés à des biomatériaux. Des études complémentaires sur les CSMs seraient essentielles pour définir les mécanismes d'action des antioxydants, mais aussi consolider les données existantes.

Notre projet se propose de contribuer à la compréhension de l'impact (i) du microenvironnement DT2 sur certaines fonctions des CSMs issues d'animaux DT2, (ii) des AGEs et du stress oxydatif sur certaines fonctions des CSMs afin d'investiguer leurs mécanismes d'action, et enfin (iii) d'évaluer l'apport d'antioxydants sur les CSMs, issues d'un environnement DT2, et dans le traitement de lésions osseuses. Ces travaux pourront contribuer à la mise en place de stratégies innovantes à base d'antioxydants pour des applications de réparation osseuses dans un contexte diabétique de type 2.

Pour l'élaboration de ce projet collaboratif nous bénéficions de l'expertise du, **B3OA, UMR CNRS 7052, INSERM 1271** sur les caractéristiques et la cicatrisation de l'os diabétique chez le modèle de rat DT2 Zucker Diabetic Fatty (ZDF) et celle du **LVTS UMRS 1148 INSERM** (Dr G. Pavon-Djavid, co-encadrante de la thèse) sur le stress oxydatif et les effets des complexes antioxydants.



## **CONTEXTE DE L'ETUDE**

# Contenu de la section :

<b>1</b>	<b>DIABETE ET TISSU OSSEUX</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>LE DIABETE</b>	<b>6</b>
1.1.1	<i>Épidémiologie</i>	6
1.1.2	<i>Le diabète de type 1</i>	6
1.1.3	<i>Le diabète de type 2</i>	7
1.1.4	<i>Physiopathologie</i>	7
1.1.5	<i>Complications chroniques du diabète</i>	8
a)	Complications macrovasculaires	8
b)	Complications microvasculaires	9
<b>1.2</b>	<b>TISSUS OSSEUX</b>	<b>11</b>
1.2.1	<i>Généralités sur le tissu osseux</i>	11
1.2.2	<i>Le tissu osseux chez le patient DT2</i>	12
a)	Modifications structurales	12
b)	Modifications cellulaires	13
<b>1.3</b>	<b>MODELE D'ETUDE DU DIABETE DE TYPE 2</b>	<b>15</b>
1.3.1	<i>Les modèles petits rongeurs pour le DT2</i>	15
1.3.2	<i>Le rat Zucker diabetic fatty (ZDF)</i>	17
1.3.3	<i>Rôle de la Leptine et de son récepteur</i>	19
<b>2</b>	<b>MICROENVIRONNEMENT DU DIABETE DE TYPE 2 ET CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>MICROENVIRONNEMENT DU DT2</b>	<b>21</b>
2.1.1	<i>Les produits avancés de la glycation (AGEs)</i>	21
a)	Formation des AGEs	21
b)	Mécanismes pathologiques des AGEs	23
2.1.2	<i>Le stress oxydatif</i>	24
a)	Définition	24
b)	Genèse	25
c)	Mécanisme pathologique du stress oxydatif	27
2.1.3	<i>L'inflammation</i>	29
2.1.4	<i>Mécanismes de défense cellulaire</i>	29
<b>2.2</b>	<b>POTENTIEL DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DANS LE CONTEXTE DT2</b>	<b>31</b>
2.2.1	<i>Cellules souches mésenchymateuses et tissu osseux</i>	31
a)	Définition	31
b)	Rôle des CSMs dans la réparation osseuse	32
c)	Intérêt thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses pour la réparation osseuse	34
2.2.2	<i>Problématique du microenvironnement DT2 pour les CSMs</i>	35
<b>3</b>	<b>POTENTIEL DES ANTIOXYDANTS</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>UTILISATIONS D'ANTIOXYDANTS DANS UN CONTEXTE DIABETIQUE</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>ANTIOXYDANTS D'INTERET POUR NOTRE ETUDE</b>	<b>37</b>
3.2.1	<i>La N-acétylcystéine</i>	37
3.2.2	<i>L'Astaxanthine</i>	38

# **1 Diabète et Tissu osseux**

## **1.1 Le Diabète**

Le diabète sucré est un groupe de troubles métaboliques caractérisés par une hyperglycémie sur une période prolongée [1]. C'est une affection chronique survenant lorsque l'organisme présente une incapacité à produire de l'insuline, ou insuffisamment, ou lorsqu'il ne parvient pas à utiliser cette hormone efficacement. Le diabète touche aujourd'hui plus d'un demi-milliard de personnes dans le monde, ce qui en fait un problème de santé majeur extrêmement préoccupant, de par le nombre sans cesse croissant de personnes atteintes, de ses complications associées, mais aussi en raison du coût économique considérable de ses traitements [2].

On distingue plusieurs types de diabète : le diabète sucré de type 1 (DT1) représentant 5-6% des cas, le diabète sucré de type 2 (DT2) représentant plus de 90% des cas, le diabète sucré gestationnel et les "autres" représentant moins de 1% des cas [3]. S'il n'est pas contrôlé à long terme, le diabète conduit à l'apparition et/ou au développement de plusieurs complications invalidantes voir mortelles.

### **1.1.1 Épidémiologie**

En 2021, dans le monde, on comptait 536,6 millions de personnes (entre 20 et 79 ans) diagnostiquées atteintes de diabète. En raison de l'augmentation et du vieillissement des populations, les projections prévoient une augmentation de ce chiffre d'environ 46% en 2045 [1]. La plupart des patients atteints de diabète vivent dans des pays à revenu faible ou moyen, mais les taux de prévalence sont plus élevés dans les pays à revenu élevé, où les groupes socio-économiques inférieurs sont touchés de manière disproportionnée. Au cours des 15 dernières années les coûts liés au traitement de cette maladie ont augmentés de 316%, pour atteindre en 2021 environ 900 milliards d'euros.

### **1.1.2 Le diabète de type 1**

Le DT1 est caractérisé par la destruction des cellules bêta du pancréas, par le système immunitaire, conduisant à une déficience partielle ou totale (dans la majorité des cas) de la production d'insuline. Le processus auto-immun n'est pas encore totalement compris, mais il est probable qu'il soit initié par l'association d'une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux (ex : infection virale, médicaments...) [4,5]. Le DT1 peut se développer à tout âge, bien qu'il apparaisse principalement au cours de l'enfance ou chez les jeunes adultes.

Actuellement, le traitement de référence est la thérapie de substitution de l'insuline exogène, par test de glycémie puis injection sous-cutanée de façon répétée ou via l'utilisation de pompes injectant de petites quantités d'insuline en continu, permettant aux patients dont la glycémie est difficile à contrôler de mieux se traiter [6].

### 1.1.3 Le diabète de type 2

Le DT2 représente 90% des cas dans le monde et plus de 3 millions de personnes traitées en France. L'hyperglycémie dans le DT2 résulte, initialement, d'un défaut de reconnaissance de l'insuline (totale ou partielle) par les cellules de l'organisme, on parle alors d'insulino-résistance. Le DT2 se développe progressivement chez les patients et bien qu'une cause exacte ne soit pas mise en avant, la prédisposition génétique et les facteurs environnementaux semblent jouer un rôle essentiel dans son développement. Outre les modifications du mode de vie des patients (activité sportive, alimentation, arrêt du tabac...) pouvant ralentir la progression du DT2, différents traitements permettent la régulation de la glycémie (ex : metformine, injections d'insuline). Malheureusement plus de 50% des patients atteints de DT2 ne sont pas diagnostiqués et/ou diagnostiqués tardivement, conduisant ainsi au développement de pathologies associées au diabète.

### 1.1.4 Physiopathologie

Le DT2 est caractérisé par une hyperglycémie chronique. Il est diagnostiqué par prélèvement sanguin, généralement en présence de symptômes apparents (polydipsie, polyurie, polyphagie, vision trouble, perte de poids inexplicée, fatigue importante...). Il est caractérisé par une concentration en glucose circulant  $\geq 7.0 \text{ mmol/L}$  (1,26 g/L) à jeun, ou la présence d'hémoglobine glyquée  $\geq 48 \text{ mmol/mol}$  (6,5%) [7].

Contrairement au DT1, où le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline, le DT2 est associé à une résistance à l'insuline et à une production insuffisante d'insuline. Par conséquent, le glucose ne peut pas être efficacement absorbé par les cellules, ce qui entraîne l'accumulation dans le sang. En réponse, le pancréas tente de compenser en augmentant la production d'insuline. Cette sollicitation amplifiée conduit à un dysfonctionnement des cellules  $\beta$ , et la sécrétion d'insuline est finalement réduite. L'insulinorésistance contribue à l'augmentation de la production de glucose dans le foie et à la diminution de l'absorption du glucose dans les muscles, le foie et le tissu adipeux [8]. Même si les deux processus interviennent tôt dans la pathogenèse et contribuent au développement de la maladie, le dysfonctionnement des cellules

$\beta$  est généralement plus grave que la résistance à l'insuline. Cependant, ces processus sont tous deux présents, l'hyperglycémie est amplifiée, entraînant la progression du DT2 [9].

Le DT2 se développe au cours du temps, le « pré-diabète » est un état intermédiaire entre une homéostasie du glucose normal et un DT2 avéré. Parallèlement à la résistance à l'insuline et à l'insuffisance de production d'insuline, le diabète et ses complications sont liés à la présence d'un stress oxydatif et à une inflammation chronique de bas niveau [10].

Le DT2 est également associé à d'autres problèmes de santé, tels que l'hypertension artérielle, la dyslipidémie (niveaux élevés de lipides dans le sang) et l'athérosclérose (accumulation de dépôts de graisse dans les artères). Ces complications sont souvent le résultat de l'interaction complexe entre l'hyperglycémie chronique, la résistance à l'insuline et l'inflammation.

### 1.1.5 Complications chroniques du diabète

Le microenvironnement diabétique affecte de nombreux types cellulaires, tissus et organes, entraînant des complications chroniques. Parmi les tissus et organes affectés, on retrouve notamment : le tissu adipeux, les muscles squelettiques, la peau, les vaisseaux, le cerveau, les reins, les yeux... On classe généralement les complications associées au diabète en complications macrovasculaires, touchant principalement les artères, et complications microvasculaires qui affectent les petits vaisseaux et la microcirculation. Bien que les complications du diabète les plus connues soient les cardiopathies, rétinopathies, néphropathies, neuropathies ou encore la cicatrisation des plaies, le tissu osseux n'est pas épargné et pourtant souvent oublié. Les complications du DT2, découlent principalement d'une exposition chronique à l'hyperglycémie et une régulation de celle-ci est le point central pour contrôler l'apparition de ces pathologies.

#### a) *Complications macrovasculaires*

Les complications macrovasculaires du DT2 comprennent les maladies coronariennes, cardiomyopathies, l'arythmie, les maladies cérébrovasculaires et les maladies artérielles périphériques. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès chez les patients diabétiques [11]. Le mécanisme central de ces complications est **l'athérosclérose**, entraînant un rétrécissement des parois artérielles. Le dysfonctionnement endothélial est un acteur principal du développement de l'athérosclérose, il a de plus été reconnu comme impliqué dans le développement de l'insulinorésistance et du DT2 [12].

Si la plupart des cellules sont capables de réduire le transport intracellulaire de glucose lors d'hyperglycémie, ce n'est pas le cas des cellules endothéliales. Les AGEs, en activant la voie

NF-kB, provoquent la transcription de médiateurs inflammatoires, augmentant la résistance à l'insuline et contribuant à l'exagération du processus d'athérosclérose [13]. Le stress oxydatif, présent dans le microenvironnement du DT2, inactive l'oxyde nitrique qui est une molécule clé pour la structure et la fonction normales des cellules endothéliales [14]. Cela explique que les causes du dysfonctionnement de ces cellules (apoptose, diminution de la prolifération et inhibition de la fibrinolyse) soient fortement reliées à des mécanismes intracellulaires modifiés dans le contexte du DT2 [15].

*b) Complications microvasculaires*

Le DT2 peut engendrer de graves atteintes microvasculaires, qui affectent principalement le fonctionnement des reins, des yeux et des nerfs. La néphropathie et la rétinopathie diabétiques concernent environ 25% des patients DT2, la neuropathie diabétique près de 50% ; de plus, une prévalence de la dysfonction érectile est constatée chez les hommes DT2 elle est cependant très variable en fonction des pays et de l'âge des patients [16–18]. Les complications microvasculaires diminuent la qualité et l'espérance de vie des personnes diabétiques.

**La Néphropathie diabétique** est la principale cause d'insuffisance rénale dans le monde, et représente 50% des cas [19]. Elle est définie par la présence d'une altération de fonction rénale, diagnostiquée par une diminution du débit de filtration glomérulaire estimée (DFGe <60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) et/ou d'une augmentation de l'excrétion urinaire d'albumine ( $\geq 30$  mg/g de créatinine) persistant sur plus de 3 mois. En 1983, Mogensen a signalé pour la première fois que les changements microvasculaires rénaux chez les patients diabétiques pouvaient provoquer une néphropathie diabétique. Celle-ci se caractérise par des lésions des cellules endothéliales glomérulaires, un épaississement de la matrice mésangiale glomérulaire, une prolifération de la matrice mésangiale glomérulaire et une glomérulosclérose nodulaire [20]. Le stress oxydatif, induit par l'hyperglycémie dans le DT2, est un acteur important dans le développement de cette complication, de par son impact au niveau de la fonctionnalité cellulaire [21], conduisant à la fibrose rénale. Au niveau rénal le microenvironnement DT2 est perçu comme un état de surabondance en nutriments, entraînant une modification des voies de signalisations impliquant notamment la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), mTOR et les sirtuine [22]. L'autophagie est considérée comme un mécanisme de défense, permettant de maintenir l'homéostasie, hors l'inhibition de l'AMPK et l'activation de mTOR conduisent au contraire à une inhibition de l'autophagie. Ce phénomène de blocage de l'autophagie a

notamment été constaté sur les podocytes lors d'une exposition aux AGEs [23]. Le microenvironnement diabétique induit des changements dans les podocytes (réarrangement du cytosquelette, dédifférenciation, apoptose et autophagie) conduisant à un dérèglement de leur croissance et différenciation [21,24,25].

**La rétinopathie diabétique** est la cause première de cécité chez les adultes de 20 à 74 ans [26]. Le développement de cette maladie est initié par une exposition chronique à l'hyperglycémie, une bonne régulation de la glycémie réduit donc son risque d'apparition. Le microenvironnement diabétique entraîne une cascade de mécanismes biochimiques (impliquant notamment les AGEs et le stress oxydatif) qui modulent le développement de rétinopathie en agissant au niveau cellulaire (métabolisme, signalisation, facteurs de croissance) [27]. Les lésions oculaires par une altération microvasculaire [28], provoquent des zones d'ischémie au niveau de la rétine.

**La Neuropathie diabétique** touche entre 37% et 45% des patients atteints de DT2 [29] et, en fonction des nerfs atteints, peut engendrer : des douleurs / engourdissements dans les membres ; des problèmes digestifs, urinaires et circulatoires. La neuropathie diabétique peut aller de l'inconfort jusqu'à des formes très invalidantes voir mortelles [30].

## 1.2 Tissus osseux

### 1.2.1 Généralités sur le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé, en perpétuel remodelage. Il est impliqué dans plusieurs fonctions importantes de l'organisme : la locomotion, le soutien et la protection des tissus mous, le stockage du calcium et du phosphate et l'hébergement de la moelle osseuse [31]. Le tissu osseux est composé d'une matrice extra-cellulaire minéralisée qui lui confère sa solidité, de cellules osseuses (cellules bordantes, ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes) et est parcouru par un riche réseau vasculaire.

**La matrice osseuse** est constituée d'une partie organique (collagène, glycoprotéines non collagéniques, protéoglycanes et eau) et d'une partie minérale (calcium, phosphore, sodium, potassium et magnésium). La matrice organique se minéralise par le dépôt de calcium et phosphate cristallisés, entraînant la formation d'hydroxyapatite.

**Les cellules osseuses** jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie du tissu osseux et son remodelage. Les ostéoblastes dérivent des cellules souches mésenchymateuses et sont présents sur la surface interne et externe de l'os, ce sont des cellules ostéoformatrices responsable de la formation de matrice organique et de sa minéralisation. Au cours du processus de formation, certaines se retrouvent piégées dans la matrice minéralisée et deviennent des ostéocytes. Les ostéocytes sont piégés dans des lacunes ostéocytaires (non minéralisées), reliées entre elles par un réseau de canalicules. Ils ont deux rôles essentiels : (i) la régulation du remodelage osseux et son adaptation en réponse aux contraintes mécaniques (mécanorécepteurs) ainsi que (ii) la régulation de la calcémie en communiquant avec les vaisseaux sanguins via le réseau de canalicules. Les cellules bordantes recouvrent la surface du tissu osseux qui n'est pas en remodelage, ce sont des ostéoblastes quiescents. Reliées entre elles et en communication avec le réseau canaliculaire, elles répondent à la signalisation cellulaire, pour participer au remodelage osseux en se rétractant pour permettre l'accès des ostéoclastes à la matrice et en réactivant les ostéoblastes. Les ostéoclastes sont les cellules impliquées dans la résorption de la matrice osseuse lors du remodelage osseux, elles occupent des cavités superficielles à la surface de l'os. Contrairement aux cellules présentées précédemment, elles sont d'origine hématopoïétique et dérivent de la lignée myéloïde. Elles déminéralisent la matrice osseuse et dégradent la trame organique via la sécrétion d'acides faibles et d'enzymes (ex : collagénases).



### 1.2.2 Le tissu osseux chez le patient DT2

Les os chez le patient DT2 se caractérisent par (i) un risque élevé de survenue d'ostéopénie et d'ostéoporose et une augmentation du risque de fracture osseuse [32–34]; (ii) des propriétés mécaniques altérées [35] ; (iii) une cicatrisation osseuse retardée et une altération du potentiel de la régénération osseuse [36,37]. Cette altération au niveau du tissu osseux est considérée comme une complication du DT2, bien que contrairement aux complications vasculaires les mécanismes et conséquences soient moins documentés. Les effets du DT2 sur la qualité osseuse sont suspectés d'être en partie dus à son microenvironnement, qui affecte le tissu osseux au niveau structural, cellulaire et moléculaire. S'il est difficile de distinguer les effets directs du microenvironnement DT2, de l'exposition chronique à celui-ci (avec chez certains patients un contrôle métabolique instable), ou encore de la présence d'autres complications (vasculaires notamment) ; plusieurs études ont montré que le risque de fracture augmentait significativement chez les individus atteints de DT2 depuis plus de 10 ans et étant traités mais dont on ne connaît pas la régulation glycémique [34].

#### a) Modifications structurales

L'étude de la densité minérale osseuse (DMO) des patients atteints de DT2 dans la littérature montre des résultats hétérogènes, expliqués par les paramètres d'études, sites d'observation et éventuellement dans la définition de la durée et de l'équilibre du DT2 [38]. Cependant, les études s'accordent sur le fait que le DT2 n'entraîne pas une diminution de la DMO en comparaison au tissu osseux sain, et au niveau de certains sites montraient même une augmentation de la DMO [39]. L'étude de Rotterdam conduite sur 6655 individus s'est intéressée à la relation entre la DMO et le risque de fracture chez les individus atteints de DT2, en comparaison à des individus sains et incluant des patients atteints de DT2 depuis des temps plus ou moins longs [40]. Cette étude a mis en évidence que contre intuitivement, l'augmentation de la DMO chez les individus atteints de DT2 était tout de même associée à un risque de fractures plus élevé. L'analyse plus détaillée des groupes de l'étude a montré que l'augmentation du risque de fracture concernait uniquement les individus atteints d'un DT2 établi (et traité), mettant en lumière l'impact négatif de la durée du DT2 sur le tissu osseux. Une méta-analyse de Compston et coll. corrobore ces résultats [41].

Le tissu osseux DT2 serait caractérisé par une diminution de la masse osseuse trabéculaire et une augmentation de la masse osseuse corticale [42]. Cependant, un essai clinique conduit

sur 1729 patients a montré que par rapport aux patients non diabétiques, les patients atteints de DT2 avaient une densité trabéculaire plus importante et une DMO corticale plus faible [43].

Si la fragilité du tissu osseux augmente indépendamment de la DMO et de la masse osseuse, c'est que la qualité osseuse est modifiée à d'autres niveaux par le DT2, plusieurs études se sont donc intéressées à d'autres critères déterminant la qualité osseuse. Au niveau de l'os spongieux du col du fémur de patients DT2, une augmentation de la concentration en AGEs ainsi qu'en sucres associés à la matrice collagénique a été observée [44]. Cette étude a montré un effet « bénéfique » du DT2 sur des propriétés mécaniques (module de Young, élasticité) de l'os spongieux, mais un effet délétère sur la matrice de collagène. Ces données suggèrent que des concentrations élevées en AGEs peuvent augmenter la fragilité en réduisant la capacité de l'os à absorber l'énergie. Plusieurs études *ex vivo* sur des échantillons d'os de patients DT2 ont observé que la réticulation du collagène (exemple la Pentosidine : AGEs formant des liaisons entre les résidus arginine et lysine du collagène) dans la matrice osseuse est une cause de la détérioration de la solidité osseuse [45]. Karim et coll. ont mis en évidence des taux d'AGEs plus élevés au niveau l'os cortical, mais pas de l'os trabéculaire (21 %,  $p = 0,09$ ) [46].

Le tissu osseux diabétique reste donc encore incompris et les observations sont parfois contradictoires. La qualité osseuse dépend donc de multiples facteurs et le rôle du microenvironnement, et notamment des AGEs, n'est pas à négliger.

#### *b) Modifications cellulaires*

Les cellules du tissu osseux subissent les effets du microenvironnement diabétique, impactant directement l'homéostasie osseuse. Si, chez un individu sain, le glucose est une source d'énergie essentielle et favorise la fonction des ostéoblastes [47]. Le microenvironnement diabétique, via l'hyperglycémie peut modifier la fonctionnalité cellulaire.

Il a été décrit que l'hyperglycémie favorise l'accumulation de produits de glycation avancés (AGEs), qui induisent des modifications des composants de la matrice ainsi que de la fonctionnalité de cellules du tissu osseux [48]. L'accumulation des AGEs dans le tissu osseux induit l'apoptose des ostéoblastes [49], des CSMs [50] et inhibent l'expression des marqueurs pro-ostéogéniques [51]. En conséquence, la différenciation des CSMs en ostéoblastes est inhibée et une augmentation de la population adipocytaire de la moelle osseuse est observée [52]. Les ostéoblastes altérés par le microenvironnement DT2 se trouvent en plus faible nombre à la surface du tissu osseux, ainsi la partie des ostéoblastes s'insérant dans la matrice osseuse se trouverait aussi réduite. De plus, dans le modèle animal de la souris obèse, le réseau canaliculaire des ostéocytes est altéré, avec une diminution du nombre d'ostéocytes dans les

lacunes [53]. Les ostéoclastes quant à eux sont retrouvés en plus grand nombre chez les patients atteints de DT2 [54] et les paramètres de résorption osseuse dans les modèles diabétiques augmentés [42].

La vascularisation joue aussi un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie et la réparation osseuse, or dans le cas du DT2 chronique l'angiogenèse [55] et la vascularisation [56] sont profondément altérées.

Les études conduites sur des cellules provenant d'environnements sains ou descriptives des populations cellulaires du tissu osseux ne permettent pas de renseigner sur la fonctionnalité ou la viabilité des cellules exposées à un microenvironnement DT2 dans le temps. Il reste donc des interrogations sur les effets d'une exposition chronique au DT2 sur les cellules du tissu osseux (mécanisme, réversibilité ...).

### 1.3 Modèle d'étude du diabète de type 2

Comme pour toute pathologie, l'étude du DT2 et de ses complications peut impliquer des études cliniques (patients DT2) ou des études précliniques pouvant être conduites *in vitro* à partir de tissus/cellules (patients ou animaux) ou *in vivo* sur des modèles animaux. L'implication de patients dans le contexte du DT2 comporte de nombreuses contraintes et variables : prélèvements, cohortes, critères d'inclusion, stade d'avancement du DT2, régulation de la glycémie, traitements ... L'utilisation de modèles animaux présente aussi des limites (choix de l'espèce, application à l'homme, euthanasie des animaux...) et conduit à de nombreux débats sociétaux, elle reste néanmoins aujourd'hui encore indispensable à la production de connaissances [57].

#### 1.3.1 Les modèles petits rongeurs pour le DT2

Il existe différents modèles de petits animaux permettant l'étude du diabète de type 2 et de ses complications associées (Tableau 1). L'installation du diabète et sa progression dans ces différents modèles peut avoir lieu de façon spontanée ou induite. Ces modèles présentent généralement une intolérance au glucose ou résistance à l'insuline, induisant à terme une hyperglycémie. Dans les modèles murins, on retrouve les souris *ob/ob*, les *db/db*, les souris KKay (KK), les souris New Zealand Obese (NZO) et les souris Tsumura Suzuki Obese Diabetics (TSOD) [58]. Le modèle murin et la taille de ce modèle, limitent les prélèvements et interventions chirurgicales. Parmi les modèles de rats diabétiques de type 2, on retrouve notamment les rats Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) [59], les rats Wistar fatty [60], les rats Zucker diabetic fatty (ZDF) [61], et les rats Spontaneously Diabetic Torii (SDT) fatty [62]. Ces modèles présentent tous des complications liées au DT2 avec des différences de sévérité ou d'âge [63].

**Tableau 1** Modèles petits rongeurs pour le diabète de type 2

Modèle	Souche	Cause	Caractéristiques diabétiques
Murin	db/db	Autosomal récessive mutation Lep <sup>db</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète 11 semaines</li> <li>- obésité, hyperinsulinémie, dyslipidémie</li> <li>- hyperglycémie apparaissant secondairement à l'insulinorésistance</li> </ul>
	db/db (obese "yellow mice")	Autosomal dominant mutation Lep <sup>db</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète 7 semaines</li> <li>- obésité et hyperinsulinémie</li> <li>- intolérance au glucose induisant une hyperglycémie chronique</li> <li>- hyperplasie avec une hypertrophie des îlots de Langerhans</li> <li>- développement de neuropathie et rétinopathie</li> </ul>
	KK (KKAY Mouse)	Alimentation hypercalorique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète entre 5-8 semaines</li> <li>- obésité, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie précoce</li> <li>- développement de rétinopathie et néphropathie</li> </ul>
	NZO (New Zealand Obese)	Polygénique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète entre 8 semaines</li> <li>- souris mâles</li> <li>- obésité sévère, intolérance au glucose, insulinorésistance</li> <li>- défaut de transport de la leptine</li> </ul>
Rat	TSOD (Tsumura Suzuki Obese Diabetics)	Polygénique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète entre 6-10 semaines</li> <li>- souris mâles</li> <li>- hyperphagie, polydipsie, obésité, hyperglycémie, hyperlipidémie et hyperinsulinémie</li> <li>- hypertrophie des îlots de Langerhans</li> <li>- développement de néphropathie, neuropathie</li> </ul>
	TALLYHO/Ingl (TH)	Polygénique Consanguinité	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète entre 10-14 semaines</li> <li>- souris mâles</li> <li>- obésité, hyperglycémie, hyperlipidémie et hyperinsulinémie</li> <li>- hypertrophie des îlots de Langerhans</li> <li>- taux de triglycérides plasmatiques élevés dès le stade prédiabétique</li> <li>- anomalies du système vasculaire et du tissu osseux (baisse DMO, activité pro-ostéoclastogénique)</li> </ul>
	OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty)	Polygénique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète 18 semaines</li> <li>- obésité légère et évolution chronique du diabète</li> <li>- hypertrophie de îlots de Langerhans</li> <li>- développement de néphropathie, rétinopathie, neuropathie et ostéoporose</li> </ul>
Rat	Wistar fatty	Autosomal récessive mutation Lep <sup>fa</sup> obtenue par croisement avec ZDF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète 8 semaines</li> <li>- obésité, hyperinsulinémie et hyperlipidémie</li> <li>- hypertrophie de îlots de Langerhans</li> <li>- développement de néphropathie et rétinopathie</li> </ul>
	ZDF (Zucker diabetic fatty)	Autosomal récessive mutation Lep <sup>fa</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète 8 semaines</li> <li>- rats mâles</li> <li>- obésité, insulinorésistance, hyperlipidémie</li> <li>- hypertrophie de îlots de Langerhans puis dégénération</li> <li>- développement de néphropathie, rétinopathie et neuropathie</li> </ul>
	SDT (Spontaneously Diabetic Torii fatty)	Autosomal récessive mutation Lep <sup>fa</sup> obtenue par croisement avec ZDF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- apparition du diabète 6 semaines</li> <li>- non obèse, hyperglycémie, dyslipidémie</li> <li>- hypertrophie de îlots de Langerhans puis dégénération</li> <li>- développement de néphropathie, rétinopathie, neuropathie et ostéoporose</li> </ul>

### 1.3.2 Le rat Zucker diabetic fatty (ZDF)

Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser le modèle de rat Zucker diabetic fatty (ZDF) ainsi que son contrôle non diabétique le rat Zucker diabetic fatty Lean (ZDF-ZL). L'animal ZDF, homozygote récessif (fa/fa), présente une mutation sur un récepteur de la leptine et développe spontanément l'obésité, l'hyperlipidémie, et la résistance d'insuline [64]. A partir de la 8ème semaine, le DT2 est établi et progressivement les complications chroniques associées au DT2 se développent (Figure 1). Ce modèle a déjà été bien caractérisé au sein du laboratoire B3OA. Zeitoun et coll. se sont intéressés à la microarchitecture osseuse (corticale et trabéculaire) et à la vascularisation des fémurs dans ce modèle [65]. Ils ont montré que les rats ZDF à 24 semaines avaient un volume osseux trabéculaire moins important, un espacement des travées et une porosité de l'os cortical plus important. La vascularisation du tissu était diminuée au niveau de la tête fémorale et de la partie distale du fémur. L'étude de Caliaperoumal et coll. s'est intéressée au potentiel de réparation osseuse et vasculaire dans les défauts osseux de calvaria, chez des animaux de 16 semaines [55]. Dans un défaut de taille critique (8mm de diamètre), la cinétique de cicatrisation était altérée. Le volume et la surface du tissu osseux formé était significativement diminué ( $p < 0.01$ ). Dans des défauts de taille sub-critique (6-4-2cm de diamètre) la cicatrisation n'était pas altérée mais la surface de vascularisation était diminuée, contribuant à montrer que la cicatrisation est affectée par le microenvironnement diabétique à plusieurs étapes du processus. Enfin Ribot et coll. à mis en évidence une altération des propriétés paracrines angiogéniques des CSMs issues de rats ZDF lorsqu'elles sont cultivées *ex vivo* dans des conditions normoglycémiques [66].

Une étude très récente de Monahan et coll. a montré une altération de la croissance osseuse chez les individus diabétiques ZDF (fa/fa) dès 12 semaines, une modification de la composition du tissu osseux avec le rapport carbonate/phosphate réduit et une teneur en phosphate acide accru (témoin d'une altération du processus de renouvellement osseux.) [67]. Cette étude a aussi montré une accumulation des AGEs plus importante dans la peau des rats ZDF atteints de diabète de longue durée, mais une concentration inchangée au niveau du tissu osseux. Les mesures d'AGEs (par fluorescence) au niveau du tissu osseux dans différents modèles DT2 sont hétérogènes avec des taux augmentés ou inchangés chez les individus diabétiques.

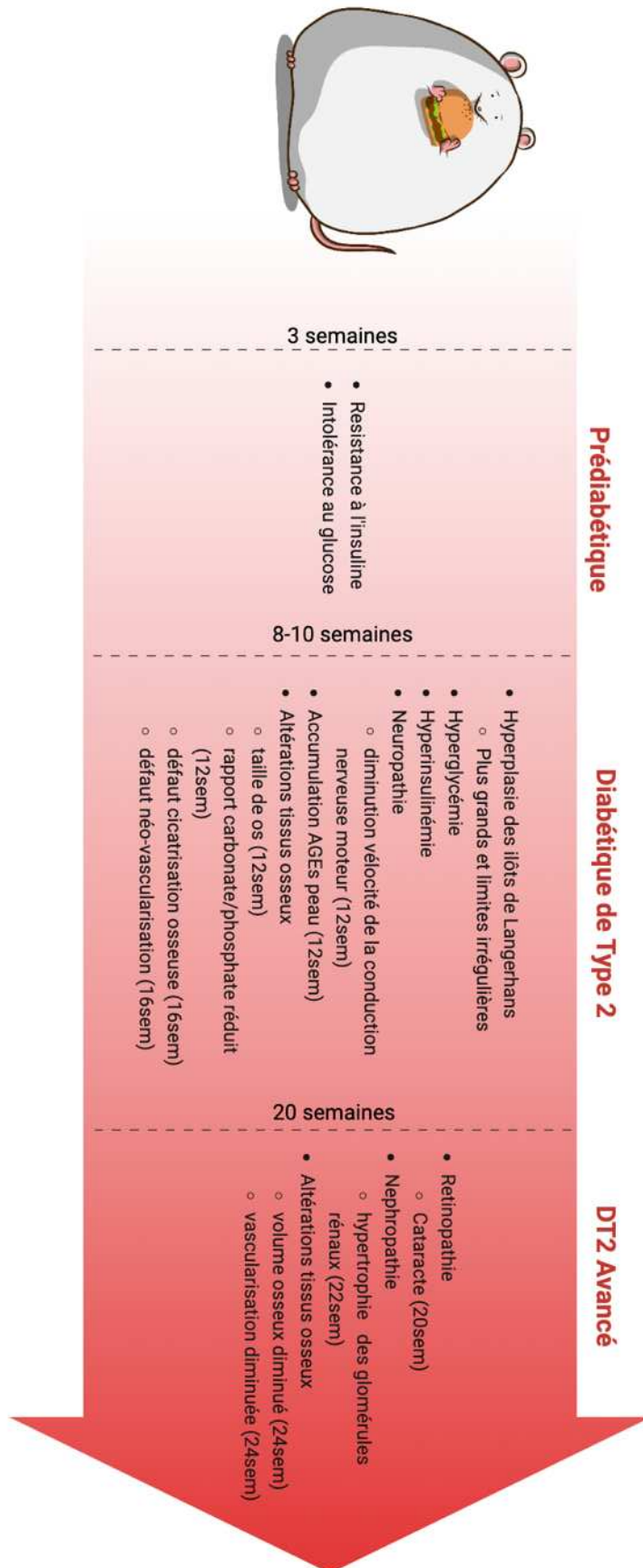


Figure 1. Développement du DT2 chez le rat Zucker Diabetic Fatty. Créée sur Biorender

### 1.3.3 Rôle de la Leptine et de son récepteur

La leptine, caractérisée d'« hormone de satiété » est une hormone peptidique circulante, sécrétée par les adipocytes [68]. Outre son rôle dans la régulation de l'appétit, elle est aussi notamment impliquée dans l'homéostasie énergétique, la croissance du squelette, l'hématopoïèse et le contrôle de la glycémie [69]. Le récepteur de la leptine (Ob-R) est présent sous plusieurs isoformes, la forme principale (forme longue, Ob-Rb) est exprimée dans l'hypothalamus et serait responsables des actions centrales de la leptine [70]. Les formes courtes du récepteur de la leptine sont exprimées dans de nombreux tissus périphériques, et bien que leurs rôles soient moins caractérisés ils seraient impliqués dans l'équilibre lipidique intracellulaire, le métabolisme du glucose et l'action de l'insuline [71].

L'interaction de la leptine à son récepteur transmembranaire, active différentes voies de signalisation (Figure 2) notamment, JAK/STAT, AMPK et PI3K [72].

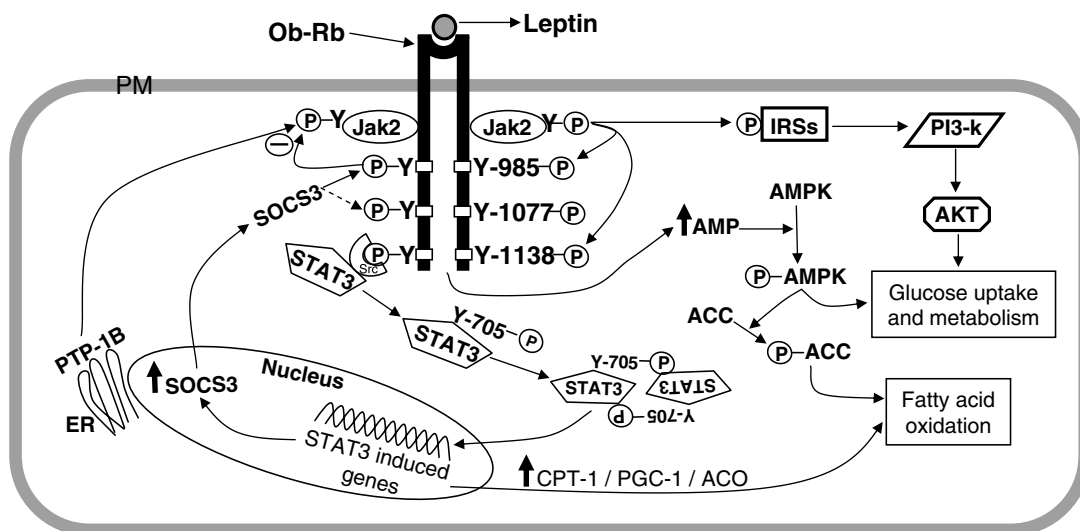


Figure 2. Signalisation intracellulaire par le récepteur de la leptine (Ob-Rb) [72]

Des mutations de la leptine ou de ses récepteurs, induisant la perte de leurs fonctions, ont été décrites. Chez les rongeurs : La mutation **Lep<sup>ob</sup>** provoque une troncature prématurée de la Leptine lors de sa synthèse la rendant non fonctionnelle [73]. La mutation **Lepr<sup>db</sup>** se situe sur le gène codant pour le récepteur de la leptine, entraînant un épissage anormal et la production de la forme longue (Ob-Rb) du récepteur. Le récepteur ne possédant pas de région cytoplasmique, la transduction du signal est aberrante [74]. La mutation **Lepr<sup>fa</sup>** provoque une mutation sur tous les isoformes du récepteur de la leptine [75].



Chez l'homme : Une mutation impliquant la suppression d'un nucléotide de guanine dans le codon 133 du gène de la leptine est associé à une diminution de leptine circulante et une obésité précoce [76]. Une mutation homozygote du gène du récepteur de la leptine a aussi été observé chez des patients obèse, entraînant la formation d'un récepteur Ob-R tronqué, dépourvu des domaines transmembranaire et intracellulaire [77].

Chez les patients DT2, une corrélation entre l'augmentation des taux de leptine à jeun et l'insulinorésistance a été observée [78]. Une étude de Pelleymounter et coll. sur un modèle de souris  $Lep^{ob}$  a montré que l'administration de leptine à faible dose (0,1 mg/kg/jour) permettait de normaliser la glycémie et de réduire les taux d'insuline, sans pour autant modifier l'obésité et la prise alimentaire des animaux [79]. L'augmentation des doses de leptine administrées permettaient de normaliser les taux d'insuline, le taux de graisse et le poids des souris. Dans un modèle de souris  $Lepr^{KO}$ , Duquenne et coll. ont constaté une intolérance au glucose par l'atténuation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques [80].

En plus d'être associées à l'obésité, les mutations au niveau du gène de la leptine et/ou de(s) récepteurs ont donc une relation avec à la résistance à l'insuline qui favorise l'hyperglycémie et est à l'origine du DT2.

## **2 Microenvironnement du diabète de type 2 et cellules souches mésenchymateuses**

### **2.1 Microenvironnement du DT2**

Le microenvironnement DT2 est caractérisé par une hyperglycémie et une inflammation chronique, auxquels s'ajoute un environnement hypoxique dans le cas de fractures. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la toxicité du glucose au niveau cellulaire dans le contexte diabétique. Les principaux incluent les produits de glycation avancés (AGEs) et le stress oxydatif que nous aborderons dans cette étude.

#### **2.1.1 Les produits avancés de la glycation (AGEs)**

##### ***a) Formation des AGEs***

Les produits avancés de la glycation (AGEs pour « advanced glycation endproducts ») sont une famille de composés de natures chimiques diverses, issus de réactions non enzymatiques entre des sucres réducteurs et des protéines, des lipides ou des acides nucléiques possédant un groupe aminé libre [81]. Parmi les réactions impliquées on retrouve un ensemble de réarrangement des composés créés au cours des voies de Maillard et des polyols, mais aussi des réactions d'oxydo-réduction ou des glycosylations autoxydatives (Figure 3) [82,83]. La glycation non enzymatique des protéines a été décrite pour la première fois par Maillard en 1912 [84]. Elle se fait par une réaction covalente entre le groupement carbonyle des résidus glucose et le groupement libre NH<sub>2</sub> des protéines. La glycation conduit rapidement à la formation d'une base de Schiff, cette étape est encore réversible mais peut ensuite subir des réarrangements d'Amadori formant des composés dicarboxylés stables [85]. La plupart des glycations peuvent s'accompagner de réactions d'oxydation, d'où le terme glycosylation, les produits d'Amadori peuvent ainsi réagir avec l'oxygène moléculaire et former des ions superoxydes à pH physiologique [86] Si l'oxydation n'est pas nécessaire pour la formation des AGEs, la présence de stress oxydatif augmente leur formation [87]. Le fructose, produit par la voie des polyols, possédant un groupement carbonyle peut conduire à la formation d'une base de Schiff en suivant des réarrangement de Heyns pour aussi former des composés dicarboxylés stables [88]. Ces composés, considérés comme des produits de glycation précoces, comprennent notamment l'hémoglobine glyquée (HbA<sub>1c</sub>) ou encore l'albumine sérique glyquée (AG), cette dernière étant très abondante, elle représente à peu près 80% de toutes les glycations impliquant les protéines circulantes [89].

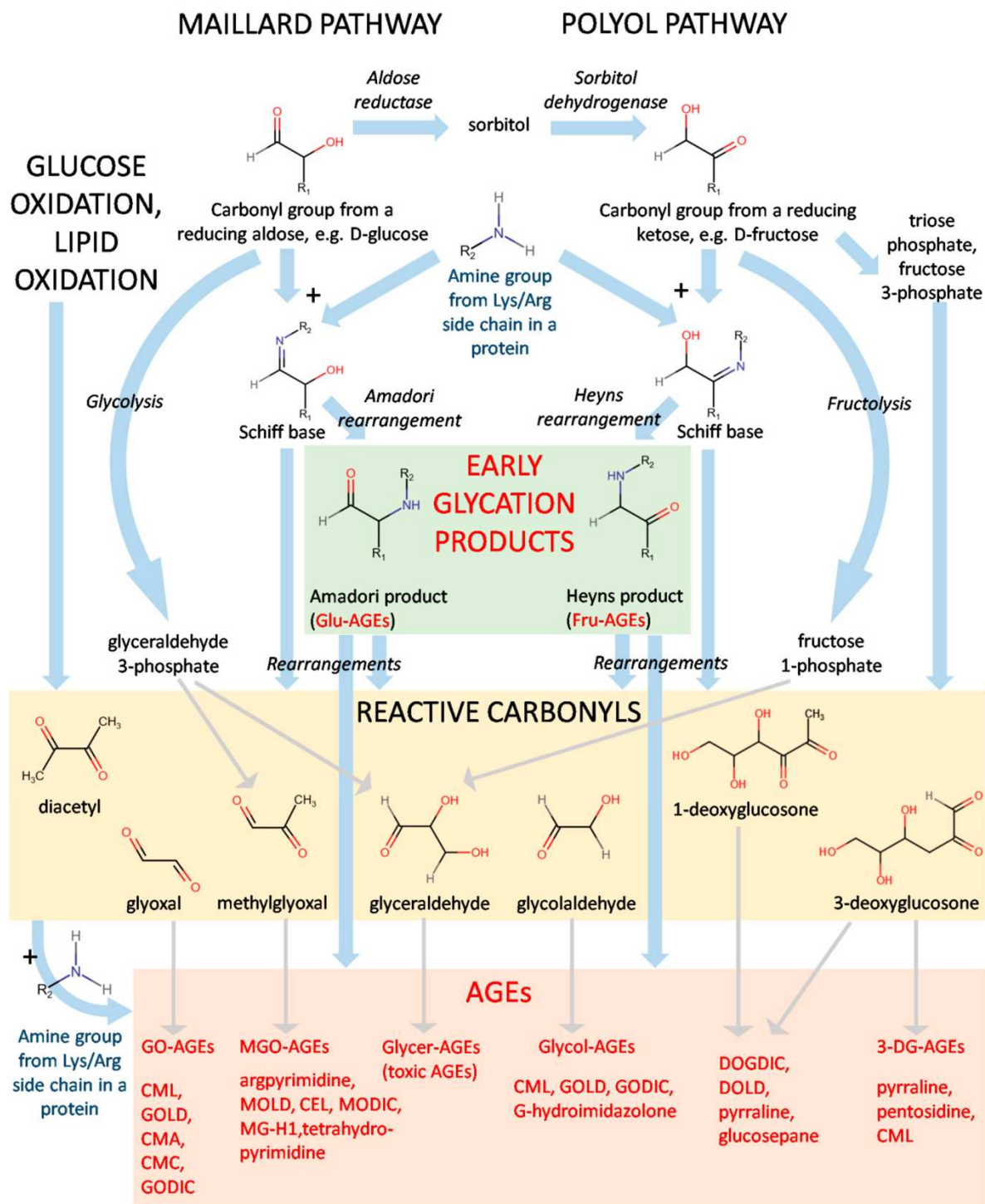


Figure 3. Schéma de formation des AGEs [82].

Abréviations : dérivés du glucose (Glu-AGEs), dérivés du fructose (Fru-AGEs), dérivés du glyoxal (GO-AGEs), dérivés du méthylglyoxal (MGO-AGEs), dérivés du glycéraldéhyde (Glycer-AGEs), dérivés du glycoldéhyde (Glycol-AGEs), et dérivés du 3-désoxyglucosone (3-DG-AGEs).

Des concentrations élevées d'AGEs ont été observées chez des patients atteints de DT2 [90], le taux sérique d'AGEs augmente progressivement avec la chronicité chez le patient diabétique [91]. Ainsi, le DT2 favoriserait la production d'AGEs indépendamment du contrôle glycémique ou de l'âge des patients. En effet, bien que l'hyperglycémie conduise à une accumulation d'AGEs, ils ne sont *in vivo* principalement pas issus d'une réaction directe protéine – glucose, mais plutôt avec des composés dicarbonylés réactifs, produits en intracellulaire à partir du glucose, exemples: le glyoxal (produit d'auto-oxydation du glucose), le 3-désoxyglucosone (issu de décomposition du produit d'Amadori du glucose) ou le méthylglyoxal (issu de la fragmentation du glycéraldéhyde-3-phosphate et du dihydroxyacétone phosphate générés lors de la glycolyse). Il est important aussi d'ajouter que les AGEs peuvent être issus de l'alimentation, et que les aliments riches en graisses et en protéines contiennent des concentrations particulièrement élevées de Nε-(carboxyméthyl) lysine (CML), un des AGEs les plus documentés dans la littérature [92].

#### b) Mécanismes pathologiques des AGEs

Les AGEs peuvent avoir un rôle physiologique en induisant la modification post-traductionnelle de protéines, ils peuvent même avoir un rôle protecteur dans le cas d'un excès de composés aldéhydes/carbonylés captés et détoxifiés par les protéines intracellulaires en formant les AGEs [93,94]

L'effet nuisible des AGEs réside notamment dans l'altération de la structure et des fonctions des protéines, lipides ou acides nucléiques lors de réticulations ou par une action directe des AGEs au niveau cellulaire. Les AGEs sont souvent présents dans la matrice extracellulaire (MEC), on observe notamment des modifications sur les protéines à longue durée de vie, comme le collagène, qui sont des composants majeurs de la MEC du tissu osseux [95]. En modifiant les protéines matricielles, ils affectent les interactions matrice - cellules et ont un impact sur la différenciation, adhésion ou migration des cellules.

Les protéines intracellulaires sont également la cible de modifications, il a été démontré que la formation d'AGEs altère leurs fonctions [96,97]. De plus, les AGEs peuvent avoir une action sur les nucléotides en réagissant avec leurs groupements aminés. Il a été suggéré que la glycation de l'ADN, formation d'AGEs nucléotidiques, est associée à une augmentation de la fréquence des mutations et de la cytotoxicité [98]. Lorsque des glycations se forment sur l'ADN, des effets délétères sur l'expression des gènes peuvent se produire [99].

Outre les modifications directes de la structure et des fonctions des protéines, lipides ou acides nucléiques, les dommages causés par les AGEs se produisent aussi par le biais de la liaison des AGEs au récepteur des produits de glycation avancée (RAGE) [87]. Des récepteurs spécifiques aux AGEs (RAGE) ont été mis en évidence dans la plupart des cellules, notamment au niveau des macrophages, des monocytes, des cellules endothéliales et des cellules mésangiales glomérulaires. Il existe plusieurs isoformes de RAGE (i) les RAGE membranaires qui transmettent un signal cellulaire [100] (ii) les RAGE solubles qui piègent leurs ligands, ils ont une action de régulation mais pourraient aussi avoir des propriétés pro-inflammatoires, contribuer au recrutement des neutrophiles [101] (iii) les RAGE sécrétoires endogènes, forme tronquée en C-terminal notamment produites par les cellules endothéliales [102].

Les interactions entre les AGEs extracellulaire et leur RAGE induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans de nombreux types de cellules [103] et augmentent les niveaux intracellulaires de dérivés de l'oxygène tels que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, et NO. Dans différents types cellulaires (endothéliales, fibroblastes...), il a été démontré que l'interaction des AGEs avec leur récepteur induit une augmentation de la NADPH oxydase (NOX) et l'active, contribuant à la déplétion en NADPH et à la synthèse de ROS [104].

### 2.1.2 Le stress oxydatif

#### a) *Définition*

Le stress oxydatif, est un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des défenses antioxydantes [105]. Les radicaux libres sont présents à un niveau « basals » et chaque type cellulaire est ainsi caractérisé par un « équilibre redox », maintenu dans une fourchette étroite, de la même manière qu'un système biologique régule son pH [106]. Le stress oxydatif, bien qu'il ait un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire, joue un rôle important dans le développement du diabète et ses complications chroniques [107]. Dans le contexte diabétique, le stress oxydatif résulte à la fois de l'augmentation de la production de radicaux libres et d'une diminution des antioxydants permettant de les éliminer. Un radical libre est une espèce capable d'exister indépendamment (d'où le terme "libre") qui contient un ou plusieurs électrons non appariés. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont un terme collectif désignant les espèces plus réactives et dérivées de l'oxygène. Ce terme englobe non seulement le superoxyde et certains autres radicaux de l'oxygène: l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le monoxyde d'azote (NO), le peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>), l'hydroxyle (HO), mais aussi certains dérivés non radicaux de l'O<sub>2</sub> : le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'acide hypochloreux (HOCl) [108].

Les ROS ont un rôle important de second messenger co-régulateur nécessaire à l'obtention de l'intégralité de l'effet biologique de l'insuline. Pourtant, à forte concentration, ils peuvent favoriser la résistance à l'insuline, via une activation des MAPK et la phosphorylation du récepteur à l'insuline et autres protéines [109]. Le stress oxydatif joue ainsi un rôle important dans le développement du DT2 et de ses complications chroniques associées [110].

b) Genèse

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la genèse du stress oxydatif dans le diabète et ses complications : la chaîne respiratoire mitochondriale, la voie des polyols, les glycations non enzymatiques des protéines [111].

**Chaîne respiratoire mitochondriale** : elle est l'usine énergétique des cellules, permettant la formation d'adénosine triphosphate (ATP) à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi) via la phosphorylation oxydative [112]. La mitochondrie est aussi impliquée dans la formation de radicaux libres, qui, s'ils ont un rôle important dans la signalisation et sont essentiels à la survie cellulaire, conduisent en forte quantité au stress oxydatif. L'exposition des cellules, notamment endothéliales, rétinienne, rénales ou encore les cellules  $\beta$ , à des concentrations élevées de glucose, entraîne une augmentation de la production de ROS mitochondriaux [113–116]. Les ROS seraient impliqués dans le développement de plusieurs complications associées au diabète, bien que le mécanisme ne soit pas totalement défini. Le métabolisme du glucose et des acides gras générerait des niveaux élevés de flux de substrats (pyruvate, acyl-CoA) vers les mitochondries, induisant une augmentation de l'activité de la chaîne de transport d'électrons et donc une plus importante « fuite » d'électrons, susceptibles de réagir avec l'oxygène, formant des dérivés réactifs de l'oxygène. [117]

**La voie des polyols** : également appelée voie de la sorbitol-aldose réductase, permet la conversion du glucose en fructose. Dans un premier temps, le glucose est réduit en sorbitol par l'aldose réductase, entraînant au passage une oxydation du NADPH en NADP<sup>+</sup>. Le sorbitol est ensuite oxydé par la sorbitol déshydrogénase en fructose, produisant du NADPH à partir du NADP<sup>+</sup> (Figure 4).

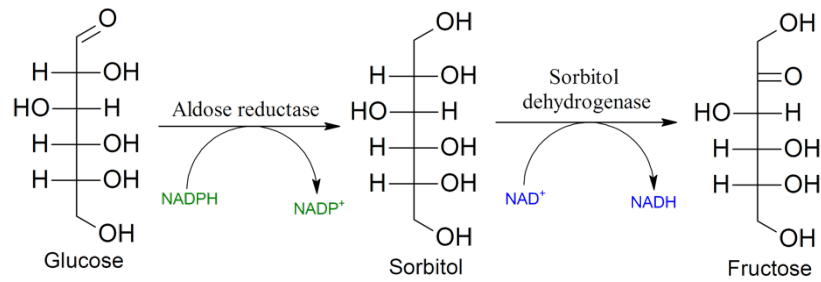


Figure 4. Voie des polyols (auteur image : LHcheM)

Dans le contexte diabétique, l'hyperglycémie conduit à une accumulation en sorbitol et une déplétion intracellulaire de NADPH. La déplétion en NADPH entraîne une faible régénération du glutathion de forme réduite au niveau intracellulaire, limitant la régulation du stress oxydatif au niveau cellulaire [118].

**L'auto-oxydation des aldoses :** Les aldoses (ex : glucose) peuvent aboutir à un sucre dicarbonylé et formant du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est l'un des principaux responsables des dommages oxydatifs au niveau cellulaire. Il entraîne la formation de radicaux hydroxyle OH<sup>•</sup> (réaction de Fenton, homolyse), réagissant avec toutes les molécules organiques adjacentes. Cette réaction joue un rôle important dans les dommages oxydatifs de l'ADN et d'autres aspects des dommages oxydatifs, y compris les dommages aux protéines et aux lipides, *in vivo* [119]

**Les glycations** non enzymatiques contribuent à la synthèse d'AGEs, lors de ce processus des oxydations peuvent intervenir augmentant le stress oxydatif. De plus, comme définit précédemment, l'interaction entre les AGEs et leur récepteur RAGE conduit à la genèse d'un stress oxydatif intracellulaire.

**L'alimentation** est l'une des principales sources d'oxydants. Cependant, il existe d'autres sources exogènes telles que les polluants photochimiques, le tabac, les drogues ou les radiations ionisantes, pénétrant l'organisme via le système respiratoire, l'alimentation ou les muqueuses [120]. Bien que l'exposition de l'organisme aux ROS de sources exogènes soit extrêmement élevée, celle aux sources endogènes est plus importante car en augmentation continue pendant la durée de vie de chaque cellule de l'organisme. [121].



c) *Mécanisme pathologique du stress oxydatif*

L'une des principales conséquences du stress oxydatif est la détérioration des bases de l'acide nucléique, des lipides et des protéines, qui peut gravement compromettre la viabilité cellulaires ou induire diverses voies de signalisation, conduisant à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose [122].

Dans des conditions pathologiques, l'état d'oxydoréduction peut être modifié à la baisse ou à la hausse [123]. Il existe une « signalisation redox », induite par une perturbation dans l'équilibre redox cellulaire : augmentation de la formation de ROS, diminution de l'activité des systèmes antioxydants. Plusieurs mécanismes de signalisation répondent à ce changement d'état : des facteurs de transcription (AP-1 et NF-B); les protéines tyrosine phosphatases (SHP-1) ; les kinases de la famille Src ; les voies de signalisation JNK et p38 MAPK (« mitogen activated protein kinase ») ; l'activité kinase du récepteur de l'insuline, et d'autres [124].

L'insuline joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie nutritionnelle et métabolique cellulaire via son récepteur (IRS) et la voie de signalisation PI3K-AKT qui cible FOXO1 et mTOR [125]. Il a été décrit que l'hyperinsulinémie présente dans le DT2 induit un dérèglement mitochondrial et contribue à l'augmentation du stress oxydatif [126]. Dans certains cas, on observe un shift de l'équilibre redox des cellules vers un état plus pro-oxydant. Si dans le cadre du vieillissement il n'est pas toujours associé à un état pathologique, dans le cadre du DT2 on observe une modification chronique pro-oxydante [124].

Dans le contexte clinique, il reste extrêmement difficile de quantifier les ROS, car les espèces réactives ont une demi-vie extrêmement courte dans les fluides biologiques, les cellules et les tissus [127]. Cependant, on sait que l'accumulation de ROS, d'origine endogène ou exogène, au niveau cellulaires altère différents composants cellulaires et modifie la fonctionnalité des cellules (Figure 5) [120]. Les composants les plus sensibles aux ROS sont les enzymes, les membranes lipidiques et l'ADN [128]. Les espèces réactives de l'oxygène possédant un radical libre étant extrêmement réactives, et leur temps de vie relativement court, leurs cibles moléculaires se trouvent à proximité immédiate de leur source. En revanche, les dérivés de l'oxygène non radicalaires (ex : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peuvent exister dans l'environnement intracellulaire pendant des périodes plus longues et atteindre des endroits éloignés de leur site de production avant de former des radicaux de l'oxygène très oxydants.

Le stress oxydatif intracellulaire, va induire différentes voies de signalisation, la cellule tentant de réparer les composés altérés par les ROS ou tentant de lutter contre eux. Ces mécanismes de défense peuvent nettement conduire à la mort cellulaire : autophagie, apoptose et nécrose. De nombreuses voies de signalisation peuvent conduire à la mise en place de ce



système de défense, permettant de réduire le stress oxydatif [129], mais fatal pour la cellule. Parmi les voies les plus connues, on retrouve C-Jun-N-terminal kinase (JNK)/p53, l'activation persistante de JNK augmente la production intracellulaire de ROS ; p53 est activé par le mauvais équilibre redox de la cellule et transcrit des inducteurs de l'autophagie ou de l'apoptose [130]. L'ADN, l'ARN et les protéines mitochondriales ne sont pas épargnés, contribuant au dysfonctionnement de la mitochondrie et la perméabilité de sa membrane, libérant le cytochrome-c [131]. L'autophagie peut aussi être régulée via l'inhibition de mTOR et l'activation la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) [130]. La nécrose est induite à la fois par les ROS intracellulaires, exacerbés à la fois par l'activation de la protéine kinase 3 et par l'interaction des complexes enzymatiques NADPH oxydase (NOX) avec le récepteur du TNF $\alpha$  [130].

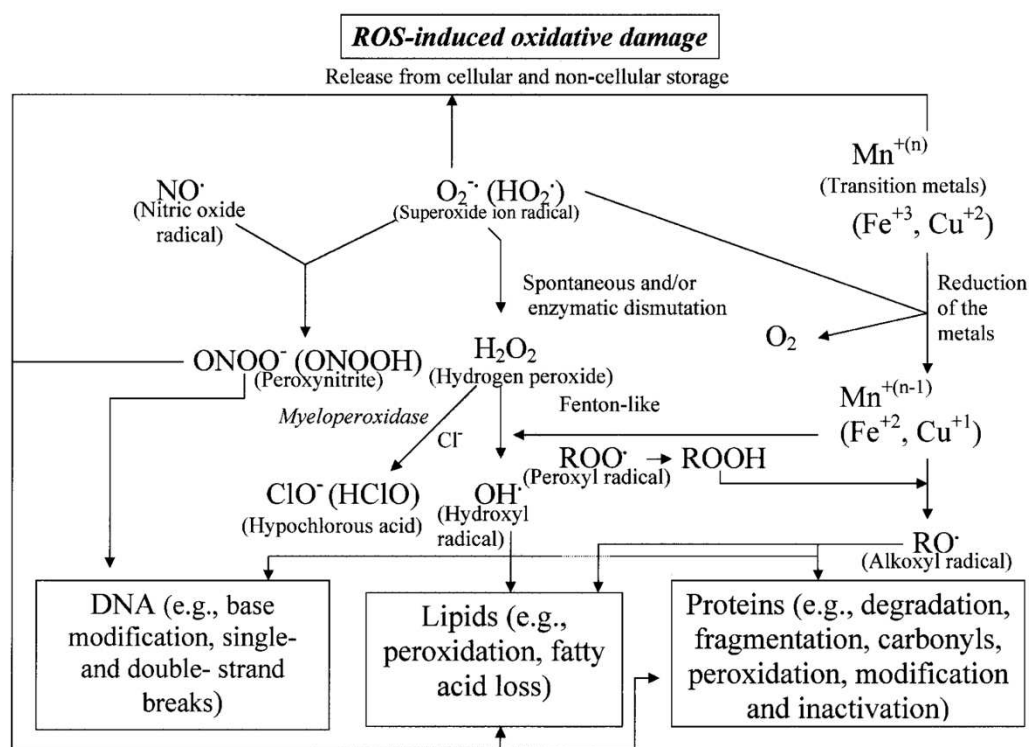


Figure 5. Dommages oxydatifs induits par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [120]

L'augmentation des peroxydations lipidique a été corrélée avec une réduction de l'activité antioxydante intracellulaire chez les patients DT2 [132]. Gunawardena et coll. ont notamment constaté qu'un mauvais contrôle de la glycémie associé à des niveaux élevés de peroxydation lipidique et de glutathion peroxydase (GPx) coïncide avec une activité réduite du superoxyde (SOD) chez les patients atteints de DT2 [133]. Paradoxalement, le système antioxydant se retrouve donc diminué alors que le stress oxydatif augmente.

### 2.1.3 L'inflammation

Dans le DT2, l'inflammation chronique contribue au développement du diabète et des complications associées. La résistance à l'insuline entraîne une série de réponses immunitaires qui exacerbent l'état inflammatoire et contribuent à l'hyperglycémie [134]. Plusieurs études sur la souris obèse ont rapporté des taux élevés de facteurs de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$ , d'interleukine (IL)-6 et d'autres médiateurs de l'inflammation. TNF- $\alpha$  peut contribuer à la résistance à l'insuline via l'inhibition de la fonction du récepteur [135]. L'hyperglycémie et les AGEs participent à l'activation de la voie I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) / c-Jun N-terminal kinase I (JNK1) et induisent l'inhibition du substrat du IRS-1). Les AGEs, en interagissant avec leurs récepteurs (RAGE) et à d'autres récepteurs, activent le facteur nucléaire kappa B (NF-kB), stimulant ainsi la production de ROS et l'expression de cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  [136].

### 2.1.4 Mécanismes de défense cellulaire

L'exposition aux radicaux libres provenant de diverses sources a conduit les organismes à développer une série de mécanismes de défense [137]. Ces mécanismes de défense contre le stress oxydatif induit par les radicaux libres comprennent : (i) des mécanismes de prévention, (ii) des mécanismes de réparation, (iii) des défenses physiques et (iv) des défenses antioxydantes.

La surproduction de ROS conduit à la suppression des antioxydants non enzymatiques et des enzymes antioxydantes dans divers tissus, ce qui contribue à l'augmentation du stress oxydatif dans des conditions d'hyperglycémie chronique [138]. Le système de « neutralisation » des ROS présent dans les cellules comprend des antioxydants enzymatiques : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et les glutathion peroxydases (GPx), la thiorédoxine (Trx) mais aussi des antioxydants non enzymatiques comme les vitamines C et E, le glutathion (GSH), l'acide lipoïque, les caroténoïdes et les chélateurs du fer [139]. Les SOD sont des enzymes nécessitant des ions métalliques pour catalyser la dismutation de l'O $_2^-$  en O $_2$  + H $_2$ O $_2$ . On les retrouve au niveau cytosolique, intracellulaire et intra mitochondrial [140]. La catalase est une enzyme hémique capable de dismuter H $_2$ O $_2$  en H $_2$ O + O $_2$ , elle est principalement présente dans les peroxysomes [141]. Les GPx sont présentes au niveau extracellulaire, cytoplasmique et mitochondrial ; elles convertissent le glutathion (GSH), en glutathion oxydé (GSSG) et réduisent le H $_2$ O $_2$  ou des hydroperoxydes organiques en eau ou en alcools, réduisant ainsi leur toxicité et maintenant l'équilibre redox, elles peuvent également réduire les composés lipidiques complexes [142]. Le système thiorédoxine (Trx), composé du NADPH, de la

thiorédoxine réductase (TrxR) et de la thiorédoxine, fournit des électrons aux peroxydases thiol-dépendantes pour éliminer les espèces réactives de l'oxygène et est aussi impliqué dans réparation de l'ADN et des protéines [143].

## 2.2 Potentiel des cellules souches mésenchymateuses dans le contexte DT2

### 2.2.1 Cellules souches mésenchymateuses et tissu osseux

#### a) Définition

Le terme « cellules souches » regroupe plusieurs types de cellules ayant les capacités communes de s'auto renouveler lors de leur division, mais aussi de se différencier en fonction du microenvironnement auquel elles sont exposées (Figure 6). Les cellules souches permettent donc ainsi de maintenir l'équilibre dans l'organisme entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire, assurant ainsi le bon fonctionnement des tissus. On peut distinguer 3 grands types de cellules souches :

- Les cellules souches totipotentes : pouvant générer toutes les cellules de l'organisme
- Les cellules souches pluripotentes : pouvant générer la plupart des cellules d'un tissu mais ne pouvant pas former d'annexes embryonnaires
- Les cellules souches multipotentes : pouvant générer plusieurs types de cellules

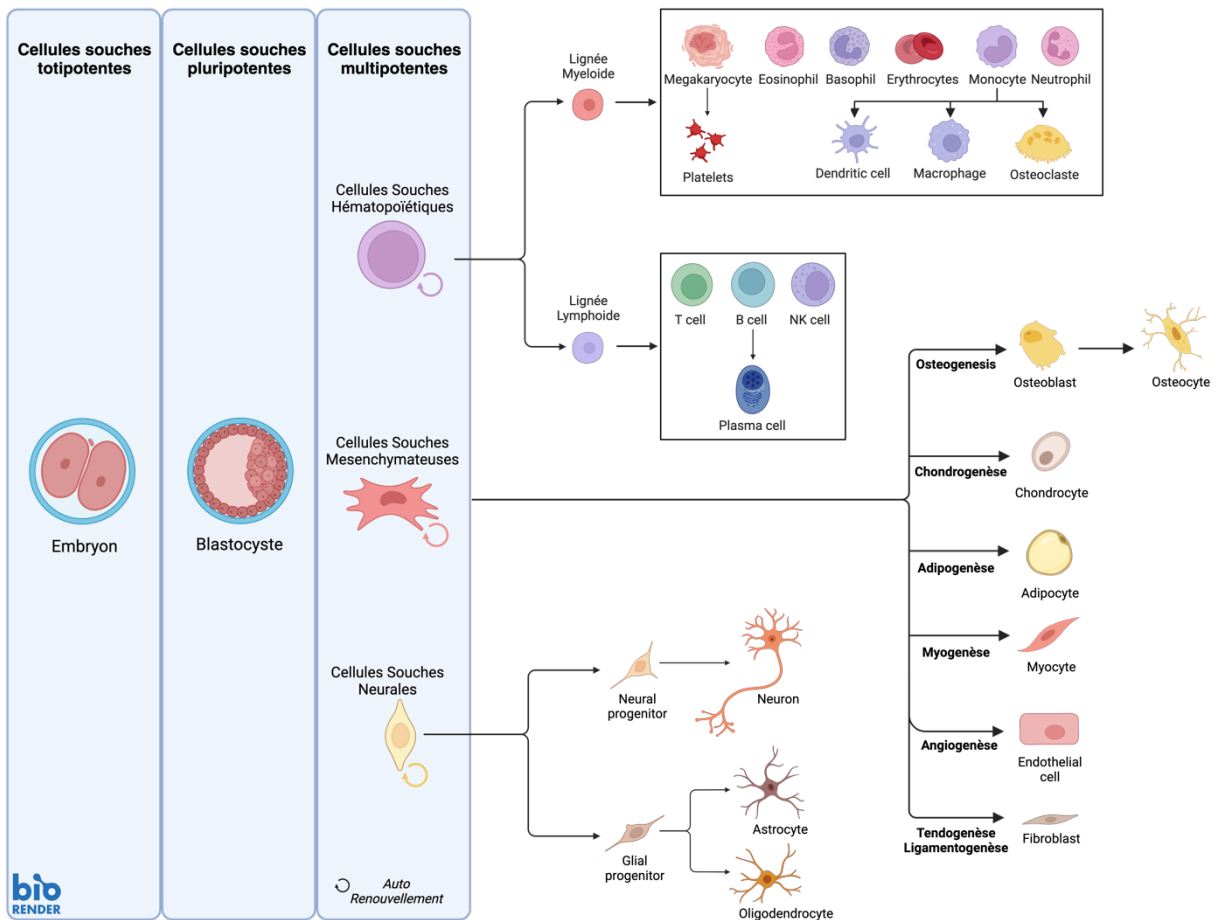


Figure 6. Cellules souches et différenciation. Créée sur Biorender

Les cellules souches mésenchymateuse (CSM) sont des cellules multipotentes, découvertes dans les années 70 [144], qui sont encore aujourd'hui très largement étudiées. Les CSMs sont présentes chez l'adulte dans de nombreux tissus [145], mais la source la plus utilisée encore de nos jours reste la moelle osseuse, de par son accessibilité et son abondance [146]. Les CSMs sont connues pour leur potentiel de prolifération, de différenciation et leurs effets paracrines (via des facteurs angiogéniques, ostéogéniques et immunomodulateurs) [147]. Les CSMs du tissu osseux (la moelle osseuse, le périoste, endoste ...), sont la principale source de CSMs impliqués dans la réparation osseuse [148]. Les CSMs, de par leurs potentiels ostéoblastique, adipogénique et chondrogénique, en plus de leur auto-renouvellement sont de potentiels acteurs en thérapie cellulaire mais aussi des cellules d'intérêt pour la compréhension des mécanismes de réparation osseuse.

La fonctionnalité des CSMs dépend du microenvironnement auquel elles sont exposées, dans le cas du DT2, le microenvironnement est perturbé, les CSMs reçoivent des signaux (AGEs, stress oxydatif, cytokines inflammatoires...) pouvant influencer sur leur prolifération, différenciation ou autres fonctions [149].

#### *b) Rôle des CSMs dans la réparation osseuse*

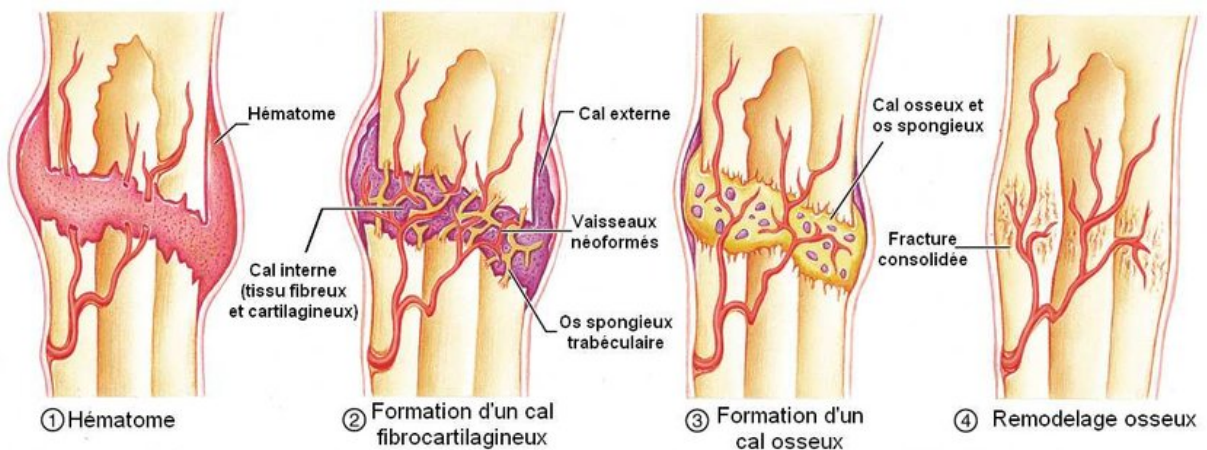
La réparation osseuse est un processus complexe impliquant différentes cellules et facteurs, dont les CSMs [146]. Les CSMs de la moelle osseuse ont une action directe sur la réparation, se différenciant en ostéoblaste puis ostéocytes [150] mais aussi une action indirecte (effet paracrine) en produisant des cytokines, des facteurs de croissance, en régulant la vascularisation et en modulant l'inflammation [151].

Suite à une fracture, et dans le cas d'un défaut non critique, 4 phases vont se succéder (Figure 7):

- 1) La phase inflammatoire : lors de cette étape, les cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages) sont mobilisées sur le site, elles phagocytent les cellules nécrotiques et la matrice. Ces cellules synthétisant des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, pourraient alors intervenir dans le recrutement des CSMs en provenance de la moelle osseuse, du périoste et la circulation sanguine [152]. Les cytokines présentes dans le site lésé comprennent les protéines morphogénétiques osseuses (BMP), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), l'interleukine 17 (IL-17) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) [153]. Le TNF- $\alpha$  influence la concentration de CSMs et leur différenciation, sa sécrétion excessive dans le cadre du DT2 pourrait

diminuer la concentration de CSM au stade initial de la cicatrisation d'environ 25 % [154]. Le recrutement des CSMs au niveau du site de fracture reste encore incompris [155] mais le microenvironnement DT2 pourrait jouer un rôle particulièrement inhibiteur dans ce processus.

- 2) La formation du cal fibro-cartilagineux : l'inflammation se résorbe et les CSM, fibroblaste et cellules ostéoprogénitrices recrutées sur site prolifèrent et forment un tissu de granulation richement vascularisé (angiogenèse, néovascularisation) [156] qui stabilise la fracture et rétabli l'afflux de nutriments et oxygène via la circulation sanguine.
- 3) La formation du cal osseux : une partie des CSMs se différencient en ostéoblastes et en chondrocytes [157]. Lorsque les chondrocytes du cal de fracture prolifèrent, ils deviennent hypertrophiques et la matrice extracellulaire se calcifie, il est alors résorbé pour laisser place à un tissu osseux néoformé [156].
- 4) Le remodelage osseux : bien que la fracture soit rigidifiée et assure une meilleure résistance mécanique, le tissu formé présente pas encore les propriétés biomécaniques d'un os sain. Interviens donc le remodelage osseux avec la résorption du cal osseux par les ostéoclastes et le dépôt d'une nouvelle matrice osseuse par les ostéoblastes.



**Figure 7.** Étapes de la réparation osseuse « Pearson Education Inc., Benjamin Cummings, 2006 »

Le microenvironnement DT2 entraîne une diminution de la formation osseuse et augmentant le risque de non-union ou d'union tardive, ainsi qu'une altération de la guérison des fractures chez les individus diabétiques [158] . Les AGEs participent à l'augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui en excès, génèrent un stress oxydatif, pouvant conduire à l'oxydation des constituants cellulaires. Ils peuvent ainsi affecter la fonctionnalité de plusieurs types cellulaires impliquées dans la cicatrisation osseuse. La

perturbation de l'équilibre redox induit des anomalies du micro-environnement médullaire telles que la microangiopathie et le dysfonctionnement des niches mésenchymateuses [159].

c) Intérêt thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses pour la réparation osseuse

La régénération osseuse est un problème crucial dans de nombreux cas, et bien que la greffe autologue reste le « gold standard », cette technique présente des limitations en terme de disponibilité, de douleurs et de risque de complications au niveau du site de prélèvement [160,161]. Les thérapies cellulaires à base de CSMs pour l'amélioration ou l'augmentation de la formation osseuse suscitent un grand intérêt [162,163], de plus ces dernières pouvant être directement prélevées chez le patient adulte, les questionnements éthiques ou techniques sont limités. Dans une étude préclinique de Jayankura et coll., l'implantation de CSMs allogéniques en percutané dans la zone d'une fracture d'os long présentant une union retardée, ont montré une amélioration de cicatrisation osseuse (76,2% des patients) après 6 mois et aucune réaction immunitaire allogénique médiée par le traitement n'a été observée [164]. Gjerde et coll. ont utilisé des CSMs autologues implantées avec des granules de phosphate de calcium biphasé pour l'augmentation de la crête mandibulaire [165]. Si cette étude a mis en évidence la faisabilité de l'implantation des CSMs avec un biomatériau pour cette application, les patients n'ayant pas présenté d'effets indésirables et l'augmentation du tissu osseux ayant permis la pose d'un implant, un contrôle sans CSMs aurait été intéressant. Petit et coll. dans un modèle de défaut segmentaire critique chez le mouton ont montré que l'implantation de CSMs avec un biomatériau résorbable améliorait (40%) significativement la réparation osseuse par rapport au matériau seul [166].

L'utilisation de CSMs pour la réparation osseuse dans un contexte diabétique pourrait aussi permettre de lutter contre le microenvironnement localement et ainsi améliorer la réparation osseuse. En effet les CSMs présentent des propriétés antioxydantes intéressantes pour le contexte diabétique car il a été démontré que l'administration de CSMs réduisait les niveaux d'un ou de plusieurs marqueurs de stress oxydatif dans divers modèles animaux [167]. Une étude de Li et coll., implantant des CSMs dans un modèle de lésion du poumon induit par lipopolysaccharide, a montré une augmentation de l'expression de l'enzyme antioxydative hème oxygénase-1 (HO-1) et réduction de la production en malondialdéhyde (MDA), un produit terminal de la peroxydation lipidique [168]. Dans un modèle diabétique de souris obèses db/db, Feng et coll. ont montré que la transplantation de CSMs a réduit les peroxydation



lipidiques et amélioré la concentration en glutathione (GSH) et diminué sa forme oxydée (GSSG) au niveau rénale [169].

### 2.2.2 Problématique du microenvironnement DT2 pour les CSMs

Le microenvironnement diabétique constitue une condition néfaste pour la survie des cellules et n'épargne donc pas les cellules souches. Les effets des AGEs et du stress oxydatif sur la fonctionnalité des CSMs ne sont pas encore clairement établis et restent en cours de recherche [170]. Il existe tout de même quelques études qui se sont intéressées à l'impact du DT2 sur différents types cellulaires, on observe deux approches (i) étudier, dans des conditions classiques de culture, des cellules issues d'un individu diabétiques et les comparer à des cellules issues d'individus non diabétiques (ii) étudier les cellules issues d'individus non diabétiques dans des conditions « mimant » le microenvironnement DT2.

Hamman et coll. se sont intéressés au potentiel ostéoblastique des CSMs issues de rats Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) et ils ont constaté une altération de ce potentiel, avec une baisse de l'activité de la phosphatase alcaline (-20%) et de la formation de la matrice minéralisée (-55%) [171]. De plus ils ont constaté une diminution de l'expression de gènes d'intérêts pour la différenciation ostéoblastiques (Runx2, la bone morphogenic protein 2 (BMP-2), l'osteopontine, et l'ostéocalcine). Sur ce même modèle, une étude du laboratoire B3OA par Ribot et coll. a mis en évidence une modification des propriétés paracrines des CSMs cultivées *ex vivo* dans des conditions normoglycémiques [66]. Ils ont constaté que le milieu conditionné provenant des CSMs issues de rats ZDF induisait une augmentation de la formation tubulaire (3,5 fois supérieure) et de la migration (3 fois supérieure) des HUVEC. Les concentrations facteurs angiogéniques (IGF-1) et de médiateurs (OSTP, CATD, FMOD LTBP1 et LTBP2) étaient différents de ceux observés dans le milieu conditionné provenant de rats non diabétiques, montrant une modification de l'effet paracrine des CSMs par le microenvironnement diabétique.

L'exposition aux AGEs pour mimer le microenvironnement DT2 sur des cultures de CSMs humaines issues d'individus sains a montré une altération de la fonctionnalité des cellules avec une diminution de la prolifération [50,172,173], de la viabilité et une augmentation du stress oxydatif intracellulaire [50,173,174].

Des études plus approfondies sur les modifications des CSMs issues d'individus diabétiques et/ou cultivées dans un milieu « mimant » un microenvironnement DT2 permettront de mieux comprendre l'impact du microenvironnement DT2 sur les CSMs ainsi que l'apport potentiel de ces cellules en thérapie cellulaire.



### **3 Potentiel des antioxydants**

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de réduire l'oxydation, elles sont ainsi d'un grand intérêt pour le développement de thérapies dans le contexte diabétique. Les antioxydants peuvent avoir différentes actions : (i) inhiber la formation de ROS (ii) piéger les radicaux libres (iii) augmenter les capacités antioxydantes des cellules [175]. Les propriétés réductrices des antioxydants se retrouvent généralement dans la présence de groupements thiol (R-SH) ou phénol (cycle aromatique hydrocarboné et groupe hydroxyle -OH) sur les molécules [176]. Ils peuvent être d'origine synthétique ou naturelle et ils ont de très nombreuses applications : pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, industrie chimique... L'alimentation est l'une des premières sources d'antioxydants exogènes, on retrouve notamment dans : les fruits, les légumes, les tanins (cacao, thé, café, vin rouge...) et les levures (bière). Parmi les antioxydants les mieux caractérisés pour des applications cliniques, on retrouve les caroténoïdes (ex : astaxanthine,  $\beta$ -carotène/vitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E).

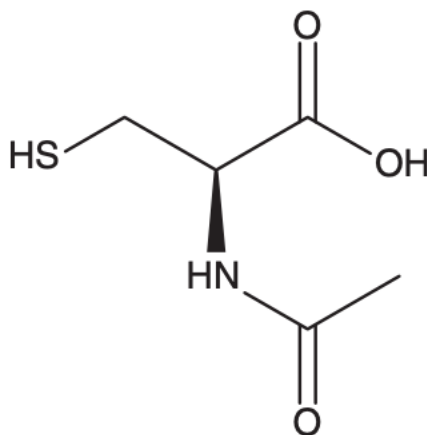
#### **3.1 Utilisations d'antioxydants dans un contexte diabétique**

Plusieurs études suggèrent que le déséquilibre redox cellulaire conduit au stress oxydatif et à l'apparition et au développement du diabète et des complications [177–180]. Si les premières études cliniques sur l'homme d'utilisation d'antioxydant comme complément de traitement n'ont pas montré de bénéfice [181], l'utilisation de nouvelles sources ou de nouveaux systèmes d'administration des médicaments (microparticules, nanoparticules, liposomes) ouvre de nouvelles possibilités [182]. L'administration orale de curcumine (puissant antioxydant naturel) encapsulée en nanoparticules dans un modèle de diabète induit par la streptozotocine chez le rat, permet de retarder plus efficacement le développement de cataractes diabétiques qu'une administration sans système de délivrance [183]. L'extrait de *Tinospora cordifolia* (plante aux propriétés antioxydantes) a montré une capacité prometteuse pour augmenter les antioxydants enzymatiques (SOD, CAT) et non enzymatiques (vitamines C et E) dans un modèle de diabète induit chez le rat [184]. L'administration de doses quotidiennes de vitamine D par voie orale chez des patients diabétiques ont améliorées les taux d'HbA1c et diminué des produits d'oxydation avancée des protéines [185]. L'amélioration du contrôle de la glycémie et/ou de marqueur d'inflammation a aussi été observée avec l'administration d'antioxydants naturels tels que le resvératrol [186] le curcumin [187], la cannelle [188] ou encore l'astaxanthin [189].

## 3.2 Antioxydants d'intérêt pour notre étude

### 3.2.1 La N-acétylcystéine

La N-acétylcystéine (NAC) est un analogue acétylé de la cystéine (Figure 8) qui est utilisé dans de nombreuses applications clinique comme antioxydant et agent mucolytique [190]. La NAC à une capacité antioxydante dont l'action est à la fois directe et indirecte au niveau cellulaire. D'une part, la NAC est un puissant capteur d'espèces réactives de l'oxygène, Aruma et coll. mettait en valeur en 1989 cette propriété à capter le HOCl et le OH [191]. Cependant, il a aussi mis en évidence que la NAC n'est pas aussi performante avec le radical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>. L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> étant un ROS majeur dans le stress oxydatif, d'autres études s'y sont intéressés, dont Schneider et coll., qui ont conclu que la NAC n'est pas un piègeur efficace de superoxyde *in vivo* mais que son potentiel antioxydant peut être associé à des effets non immédiats [192]. En effet, au niveau intracellulaire la cystéine est un acide aminé impliqué dans la synthèse de glutathion (GSH), un tripeptide (L-cystéine, L-Glutamine et Glycine) contenant des thiols qui a un rôle clé dans le maintien la régulation du stress oxydatif [193]. De plus, la NAC aurait des propriétés ostéogénique d'après Amid et coll. qui ont observé une augmentation de minéralisation et de l'activité ALP en présence de NAC, sur des CSMs de la pulpe dentaire [194].

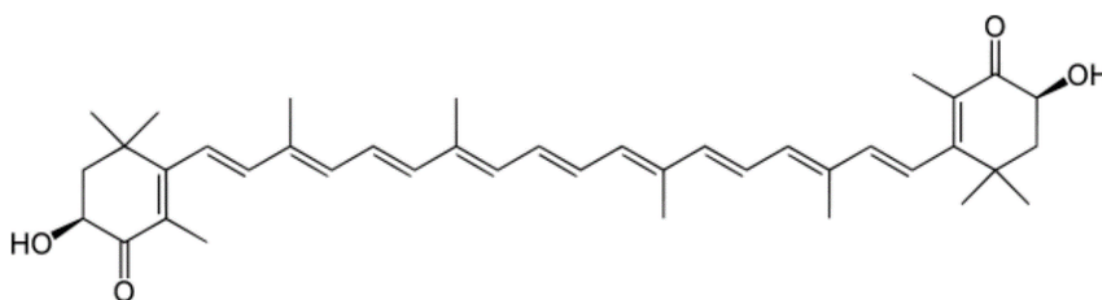


**Figure 8.** Structure moléculaire de la N-acétylcystéine [195]

### 3.2.2 L'Astaxanthine

L'astaxanthine (ASX) est l'un des caroténoïdes les plus puissants ayant une activité antioxydante, elle peut être produite naturellement ou chimiquement. Parmi les sources naturelles d'ASX on retrouve divers micro-organismes, animaux marins (levures, micro-algues, la truite, le saumon, le krill, les crevettes, les écrevisses), des plantes complexes et certains oiseaux. L'ASX a été autorisé en 1987 par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis en tant qu'additif pour l'alimentation des poissons, puis a été approuvé en tant que complément alimentaire, par la FDA, en 1999 [196]. L'ASX (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotène-4,4'-dione, formule moléculaire  $C_{40}H_{52}O_4$ , masse molaire 596,84 g/mol) est un caroténoïde xanthophylle qui se compose de 40 atomes de carbone organisés en deux anneaux oxygénés reliés par une chaîne polyène, elle est capable de piéger des radicaux libres et réduire le stress induit par les ROS (Figure 9) [197]. L'ASX atténue notamment les médiateurs du stress oxydatif, de l'inflammation [198], de la peroxydation lipidique [199,200].

L'ASX n'est pas synthétisée par le corps humain mais peut être ingérée par l'alimentation [201]. Cependant, sous sa forme brute, son instabilité en solution compromet son absorption par les cellules épithéliales intestinales [202]. Plusieurs systèmes d'encapsulations ont été développés avec pour surmonter les défis liés à l'administration de l'astaxanthine : des systèmes polymériques, des vecteurs à base de lipides et des complexes d'inclusion utilisant des cyclodextrines [203]. Les cyclodextrines sont largement utilisées pour augmenter la solubilité de composés organiques peu solubles dans l'eau [204]. Ce sont des oligosaccharides macrocycliques présentant des cavités lipophiles rigides et une surface extérieure hydrophile, ce qui leur permet d'enfermer des molécules hautement hydrophobes à l'intérieur de leur cavité [205].



*Figure 9. Structure moléculaire de l'Astaxanthine[206]*

## **HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Le DT2 représente un problème de santé publique majeur, il peut engendrer de sévères complications chroniques impliquant d'une prise en charge longue et coûteuse pour la société. Le tissu osseux n'étant pas épargné, la prévalence de patients DT2 présentant une fragilité du squelette augmente et s'accompagne de l'émergence d'une pathologie fracturaire et/ou de besoins accrus de reconstitution de lésions osseuses dans les domaines orthopédique, maxillo-facial et dentaire. La cicatrisation se trouvant altérée chez ces patients, il est nécessaire d'y suppléer.

L'effet du DT2 sur le tissu osseux est complexe [207]. Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle (CSMs) sont des actrices essentielles dans l'homéostasie et la réparation osseuse. Elles sont aussi des candidates prometteuses pour l'ingénierie tissulaire y compris dans le contexte diabétique [208]. Cependant l'impact du microenvironnement DT2 sur ces cellules pourtant cruciales dans la réparation osseuse reste peu documenté.

Les AGEs, générés par l'hyperglycémie, participent à l'augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui en excès génèrent un stress oxydatif. Ce dernier, peut conduire à l'oxydation de constituants cellulaires et affecter la fonctionnalité de plusieurs types cellulaires, telles que les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les CSMs. Le stress oxydatif peut alors être impliqué dans la diminution du potentiel angiogénique et ostéogénique des CSMs dans le contexte diabétique.

*Cette hypothèse est la clé de voute de notre axe de recherche : comprendre le rôle du microenvironnement DT2 sur l'os diabétique et ses effets sur la fonctionnalité de CSMs peut ouvrir de nouvelles perspectives d'approches thérapeutiques.*

À cet égard, l'utilisation d'un antioxydant représente une approche intéressante pour stabiliser l'équilibre redox de CSMs. Deux antioxydants autorisés par le FDA ont retenu notre intérêt : un synthétique déjà utilisé en clinique, la NAC [209,210] et un naturel, l'astaxanthine qui a déjà apporté des résultats prometteurs pour la régulation de la glycémie chez des patients DT2 [189].

L'équipe de Bioingénierie du LVTS (U1148 INSERM) a mis au point des complexes de cyclodextrine-astaxanthine (CD-A) améliorant la stabilité et l'efficacité de l'astaxanthine. Les propriétés antioxydantes des CD-A ont été mises en évidence *in vitro* sur les cellules

endothéliales [211] et *in vivo* dans un modèle d'ischémie /perfusion [203]. L'astaxanthine ainsi stabilisée agit par voie intracellulaire, avec des propriétés d'élimination des ROS potentialisées.

*Nous émettons l'hypothèse que l'hypothèse que les AGEs induisent un stress oxydatif exacerbé chez les CSMs et que l'utilisation d'antioxydants pourrait rétablir l'équilibre redox et fournir un environnement favorable pour la réparation osseuse dans le tissu osseux DT2.*

**L'objectif de ce projet est alors** d'étudier l'impact du microenvironnement DT2 sur les cellules souches mésenchymateuses et le potentiel d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif et la néoformation osseuse.

**Le projet s'est articulé autour de 3 axes :**

- 1) Impact du microenvironnement DT2 sur le tissu osseux et les CSMs *ex vivo* :** Caractérisation du tissu osseux et de la moelle osseuse de rats de Zucker Diabetic Fatty (ZDF), diabétiques, et leurs homologues sains ZL (Zucker Lean). Étude de la fonctionnalité des CSMs prélevées.
- 2) Effets des produits de glycation avancés (AGEs) - « mimant » le microenvironnement DT2 *in vitro* - sur les CSMs et régulation du stress oxydatif intracellulaire par un antioxydant de référence, la N-acétylcystéine (NAC) :** Étude de certaines fonctionnalités des CSMs (survie, prolifération, migration) en présence d'AGEs. Évaluation de la production des ROS sur les CSMs humaines, les CSMs issues de rats de ZDF et ZL. Étude de l'effet de la NAC sur l'équilibre redox des CSMs exposées à différentes sources génératrices de ROS.
- 3) Potentiel de l'astaxanthine à rétablir l'équilibre redox des CSMs issues d'un milieu DT2 ou sain et à améliorer la réparation osseuse chez le rat :** Caractérisation et synthèse de complexes antioxydants. Évaluation de la production des ROS sur les CSMs issues de rats de ZDF diabétiques et leurs homologues sains ZL. Étude du potentiel de complexes antioxydants appliqués *in situ* pour la néoformation osseuse chez le rat sain.

Ce projet permettra de mieux comprendre l'impact du stress oxydatif sur la fonctionnalité des CSMs issues d'un microenvironnement diabétique et d'évaluer l'apport des antioxydants sur les CSMs dans le cadre de la réparation tissulaire osseuse.

## **Chapitre I IMPACT DU DIABETE DE TYPE 2 SUR LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES**

### **Article : Experimental Type 2 Diabetes Differently Impacts on the Select Functions of Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells**

Jonathan Ribot, Cyprien Denoeud, Guilhem Frescaline, **Rebecca Landon**, Hervé  
Petite, Graciela Pavon-Djavid, Morad Bensidhoum, Fani Anagnostou  
Publié dans le journal Cells

Ce chapitre met l'accent sur l'impact du diabète de type 2 (DT2) sur les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMMSC). Nous nous sommes intéressés à certaines fonctions et à la différenciation des BMMSC prélevées dans un modèle animal (rats ZDF) présentant un microenvironnement DT2 pour déterminer leur potentiel en tant que candidats pour la médecine régénérative. Comme indiqué dans l'introduction, les BMMSC représentent une modalité thérapeutique attrayante pour la thérapie cellulaire des complications associées au DT2. Ce dernier modifie l'environnement du tissu osseux, mais ses effets sur les propriétés des BMMSC restent incertains. Ce chapitre est présenté en anglais sous la forme de l'article « Experimental Type 2 Diabetes Differently Impacts on the Select Functions of Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells » publié dans le journal Cells.

## Résumé en français



Les cellules souches mésenchymateuses, multipotentes, dérivées de la moelle osseuse (BMMSC) représentent une modalité thérapeutique attrayante pour la thérapie cellulaire des complications associées au diabète de type 2 (DT2). Le DT2 modifie l'environnement de la moelle osseuse, mais ses effets sur les propriétés des BMMSC restent incertains. La présente étude visait à étudier certaines fonctions et différenciations des BMMSC prélevées dans le microenvironnement du DT2, candidates potentielles pour la médecine régénérative. Les BMMSC ont été prélevées sur des rats Zucker diabétiques gras (ZDF ; un modèle d'obésité-T2DM) et sur leurs compagnons de non diabétiques (ZL ; contrôles), et cultivées dans des conditions normoglycémiques. Les BMMSC issues des animaux ZDF étaient moins nombreuses, et présentaient une diminution de la clonogénicité (facteur 2), de l'adhésion (facteur 2,9), de la prolifération (réduction de 50 %), une capacité de la migration (réduction de 25 %) et un taux d'apoptose accru (multiplié par 2,5) par rapport à leurs homologues ZL. Par rapport aux ZL-BMMSC cultivées, les ZDF-BMMSC ont présenté (i) une différenciation adipogénique accrue (nombre de gouttelettes lipidiques multiplié par 2 ; régulation à la hausse des gènes Pparg, AdipoQ et Fabp), possiblement ayant été préconditionnées par le microenvironnement *in vivo* avant l'isolement des cellules, et (ii) une expression différente des gènes liés à l'angiogenèse *in vitro* et un potentiel pro-angiogénique réduit après transplantation chez des souris nude. Ces résultats prouvent que l'environnement du DT2 entrave l'expansion des BMMSC et certaines fonctions pertinentes pour leur efficacité lorsqu'elles sont utilisées dans le cadre de thérapies cellulaires autologues.

**Mots-clés** : diabète de type 2, CSM, cellules souches, ZDF, moelle osseuse



## Article

# Experimental Type 2 Diabetes Differently Impacts on the Select Functions of Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells

Jonathan Ribot <sup>1</sup>, Cyprien Denoeud <sup>1</sup>, Guilhem Frescaline <sup>1</sup>, Rebecca Landon <sup>1</sup>, Hervé Petite <sup>1</sup>, Graciela Pavon-Djavid <sup>2</sup>, Morad Bensidhoum <sup>1</sup> and Fani Anagnostou <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Paris, CNRS, INSERM, B3OA, 75010 Paris, France; jonathan.ribot@outlook.fr (J.R.); cyprien.denoeud@gmail.com (C.D.); frescaline@anrt.asso.fr (G.F.); rebecca.landon@inserm.fr (R.L.); herve.petite@univ-paris-diderot.fr (H.P.); morad.bensidhoum@paris7.jussieu.fr (M.B.)

<sup>2</sup> INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Cardiovascular Bioengineering, Université Sorbonne Paris Nord, 93430 Villetaneuse, France; graciela.pavon@univ-paris13.fr

<sup>3</sup> Department of Periodontology, Service of Odontology–Pitié Salpêtrière Hospital, AP-HP et U.F.R. of Odontology, 75013 Paris, France

\* Correspondence: fani.anagnostou@univ-paris-diderot.fr; Tel.: +33(0)1-5727-8683; Fax: +33(0)1-5727-8571

**Abstract:** Bone marrow-derived multipotent stromal cells (BMMSCs) represent an attractive therapeutic modality for cell therapy in type 2 diabetes mellitus (T2DM)-associated complications. T2DM changes the bone marrow environment; however, its effects on BMMSC properties remain unclear. The present study aimed at investigating select functions and differentiation of BMMSCs harvested from the T2DM microenvironment as potential candidates for regenerative medicine. BMMSCs were obtained from Zucker diabetic fatty (ZDF; an obese-T2DM model) rats and their lean littermates (ZL; controls), and cultured under normoglycemic conditions. The BMMSCs derived from ZDF animals were fewer in number, with limited clonogenicity (by 2-fold), adhesion (by 2.9-fold), proliferation (by 50%), migration capability (by 25%), and increased apoptosis rate (by 2.5-fold) compared to their ZL counterparts. Compared to the cultured ZL-BMMSCs, the ZDF-BMMSCs exhibited (i) enhanced adipogenic differentiation (increased number of lipid droplets by 2-fold; upregulation of the Pparg, AdipoQ, and Fabp genes), possibly due to having been primed to undergo such differentiation in vivo prior to cell isolation, and (ii) different angiogenesis-related gene expression in vitro and decreased proangiogenic potential after transplantation in nude mice. These results provided evidence that the T2DM environment impairs BMMSC expansion and select functions pertinent to their efficacy when used in autologous cell therapies.

**Keywords:** diabetes type 2; MSCs; stem cell; ZDF; bone marrow



**Citation:** Ribot, J.; Denoeud, C.; Frescaline, G.; Landon, R.; Petite, H.; Pavon-Djavid, G.; Bensidhoum, M.; Anagnostou, F. Experimental Type 2 Diabetes Differently Impacts on the Select Functions of Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells. *Cells* **2021**, *10*, 268. <https://doi.org/10.3390/cells10020268>

Academic Editors: Adrian Kee Keong Teo and Jun Shirakawa  
Received: 18 December 2020  
Accepted: 26 January 2021  
Published: 29 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) has reached epidemic proportions worldwide. In addition to macro- and micro-vascular complications such as cardiovascular diseases, retinopathy, neuropathy, nephropathy, and prolonged/incomplete wound healing, T2DM is associated with increased bone fragility [1] and impaired bone healing [2–4]. Specifically, in the bone marrow, T2DM induces microvascular rarefaction and vascular endothelial cell dysfunction [5], reduces osteoblastogenesis, and increases adiposity [6,7]. These conditions have also been implicated in changing the stem cell niche, resulting in a compromised function of the bone marrow-derived multipotent stromal cells (BMMSCs)/mesenchymal stem cells (MSCs).

BMMSCs are a unique type of adult stem cells. They home in on the sites of injuries and contribute to tissue repair [8], as well as playing a key role in regulating new blood vessel formation and function [9]. BMMSCs exhibit high proliferation as they differentiate into various cells types, including fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, and vascular endothelial cells [10]. They also exert paracrine effects by releasing growth

factors and cytokines [11]. The phenotype of these cells is strongly affected by their “milieu”. Diabetic microenvironment encompassing high glucose, inflammation, hypoxic conditions, and Reactive Oxygen Species (ROS) content has deleterious effects on the functionality of BMMSCs [12]. More precisely, in the case of obese T2DM, however, the data are inconclusive and incomplete to date regarding the BMMSC phenotype and functional properties [13,14]. Moreover, owing to their multipotency and ability to secrete angiogenic factors, cytokines, and immunomodulatory chemical compounds, BMMSCs are an attractive cell source to treat the secondary complications of T2DM [15,16]. Nevertheless, in preclinical and clinical studies, autologous use has resulted in mixed outcomes [17]. Despite the fact that the T2DM milieu is a critical aspect in preparing BMMSCs from diabetic donors and in predicting their function after implantation, relatively little is known about the consequences of T2DM for the BMMSC functions which are needed for the success of pertinent clinical studies.

The present study focused on elucidating select functions and the differentiation potential of BMMSCs harvested from the T2DM microenvironment in order to improve understanding of induced alterations and to establish the potential of these cells as candidates for regenerative medicine applications. To this end, BMMSCs were obtained from Zucker diabetic fatty (ZDF) (*Leprfa/fa*) rats (an obese T2DM well defined animal model) [18,19], which exhibit musculoskeletal [20] and vascular [4,21,22] complications, and from their Zucker lean (ZL) littermates (respective healthy controls).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animal Model

Adult 8-week-old male, Swiss, nude mice and 13-week-old male, obese Zucker *fa/fa* rats (ZDF) and their lean *fa/+* littermates (ZL) were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The animals were housed, operated, and euthanized based on the procedures in accordance with the “European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals”. The experimental procedures used in the present study were approved by the Ethics Committee of the Paris-Diderot University (N°01610.01/S69), Paris, France.

The diabetic conditions in the aforementioned rats were determined on the day of sacrifice. Venous blood was collected and the glycemic state was evaluated using a glucometer (Roche Diagnostics, Meylan, France). The glucose and fructosamine concentrations were determined in the collected blood plasma using commercially available kits from Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, France) and following the manufacturer’s instructions.

### 2.2. Isolation of Rat Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells

BMMSCs were obtained as previously described [23]. Briefly, the femurs and tibiae from each rat were cleaned of connective tissues and their respective epiphyses were removed to allow the insertion of a 23-gauge needle connected to a syringe containing alpha-Modified Eagle’s Medium ( $\alpha$ MEM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Harvested cells were then homogenized in complete culture medium ( $\alpha$ MEM) supplemented with 10% (*v/v*) fetal calf serum (FCS) and 1% (*v/v*) antibiotic/antimycotic (ATB/ATM) solution (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The isolated cells from ZL and ZDF rats were seeded separately at a density of  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>, and cultured at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air environment, and the supernatant media (containing non-adherent cells) were discarded after 2 days of culture. Fibroblastic colonies (CFU-Fs) were formed at day 5 of culture and all pooled at day 12 (cell passage 1). For amplification of the ZL- and ZDF-BMMSC populations, the cells at a subconfluent stage (after 3 days of culture) were trypsinized using a 0.005% trypsin/EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) solution and seeded at  $10 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>. During cell culture, the supernatant media were replaced twice a week. BMMSCs (passages 2–3) were used for all the experiments of the present study. The BMMSC origin was assessed using fluorescence-activated cell sorting and monitoring for expression of the CD29 (clone Hmb1–1; eBioscience), the CD45 (clone

OX1; eBioscience), and the CD90 markers (clone HIS51; Life Technology), as well as their differentiation into the osteogenic and adipogenic lineages.

### 2.3. Fibroblastic Colony-Forming Unit (CFU-F) Assay

After being harvested from bone marrows, mononuclear cells were seeded at  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in individual wells of 6-well-tissue-culture plates. After 4 h, the supernatant culture medium (containing non-adherent cells) was discarded and the adherent cells were cultured for 14 days. These cells were then rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and stained in situ using the May-Grünwald Giemsa protocol. The stained cells in each well were photographed using a Nikon Eclipse TE 2000U inverted microscope. Cell colonies measuring more than 2 mm in diameter (which also contained more than fifty adherent fibroblastoid cells), but not smaller cell clusters, were further analyzed. The shape of each colony was visualized, and the respective surface area was automatically marked using the NIS-Elements BR 2.30 computer image analysis system (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). For each condition tested, the colony forming efficiency (CFE) was calculated as the total number of CFU-Fs per well-formed  $10^6$  cells seeded.

### 2.4. Cell Adhesion

ZDF- and ZL-BMMSCs in complete culture medium were separately seeded at  $8.5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in individual wells of 12-well cell culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland). After 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, and 240 min, the supernatant media were removed. The adherent cells were fixed using a methanol-PBS (1/1 v/v) solution (Prolabo) and then stained with Giemsa solution (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Six random spots per well surface area were photographed using light microscopy (Keyence VHX100, Osaka, Japan). Afterward, the adherent cells were counted using the data processing software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

### 2.5. Cell Proliferation

ZDF- and ZL-BMMSCs in complete culture medium were each seeded at the density of  $3 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in individual wells of 12-well cell culture plates. Following cell adhesion, BMMSC proliferation was determined daily for up to seven consecutive days of culture. The cells present in each well were fixed using 95% ethanol at the prescribed time points, stained with propidium iodide (PI; 50 µg/mL; Sigma-Aldrich) at 37 °C for 30 min, and counted using flow cytometry analysis (Attune NxT Flow Cytometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 2.6. Apoptosis

BMMSCs derived from ZL and ZDF rats (passage 2) were cultured in serum-free αMEM for 48 h. The percentage of apoptotic cells was then determined using Guava<sup>®</sup> Nexin Reagent and flow cytometry analysis according to the manufacturer's instruction.

### 2.7. Cell Migration

BMMSC migration was determined using commercially available 24-well Boyden chambers (Corning Costar, Cambridge, MA, USA) whose two compartments were separated with porous polycarbonate membranes with 8 µm diameter pores. Briefly, either ZDF or ZL cells ( $75 \times 10^3$  cells/100 µL) in serum-free αMEM (migration medium) were placed in the upper chamber of each Boyden chamber. The bottom chamber of each Boyden system contained 0.6 mL of complete culture medium. The cell migration experiments were conducted in a humidified, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air environment, overnight. The cells that had traversed, but still adhered to the other side of the membrane separating the two Boyden compartments, were fixed using 4% paraformaldehyde and then stained in situ with the May Grünwald-Giemsa stain. Each membrane was then excised, mounted on a glass slide, and visualized using light microscope. The cells present on four randomly-

chosen, separate areas per membrane were counted in situ. Pertinent numerical data were averaged and reported “as cell numbers per test”.

### 2.8. Reactive Oxygen Species (ROS) Release

To measure ROS production in ZDF- and ZL-BMMSCs, the DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) (DCFH-DA, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), an oxidation-sensitive indicator, was used. ZDF- and ZL-BMMSCs in complete culture medium were separately seeded at  $1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in individual wells of 96-well cell culture plates. After 12 h, the cells were rinsed and incubated with 100  $\mu$ L of 5  $\mu$ M 2',7'-diacetate dichlorofluoresceine at 37 °C for 1 h. Oxidative stress was induced by adding 50  $\mu$ L of tert-butyl peroxide 400  $\mu$ M (Luperox<sup>®</sup>, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) to the supernatant medium of each well. Fluorescence (excitation wavelength of 485nm and emission wavelength of 530nm) of each supernatant sample was monitored every 5 min for 40 min using a spectrophotometer (TECAN Infinite<sup>®</sup> 200 PRO Series instrument, Männedorf, Switzerland). Fluorescence was directly correlated to ROS release by the ZDF- and ZL-BMMSCs.

### 2.9. Differentiation Assays

#### 2.9.1. Adipogenic Differentiation

ZDF- and ZL-BMMSCs in complete medium were separately seeded at  $10 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions until they reached 90% confluency. The supernatant media of these cell cultures were replaced with either complete medium (used as control) or adipogenic medium (i.e., complete medium supplemented with 100 ng/mL biotin, 250 nM dexamethasone, 0.5 mM isobutyl methylxanthine, 60  $\mu$ M indomethacin, and 10  $\mu$ g/mL insulin; all chemicals were from Sigma-Aldrich). All supernatant media were replaced every 2 days of cell culture. Adipogenic differentiation was determined by monitoring the expression of select adipogenic markers (specifically, Pparg, AdipoQ, and Fabp4) using quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), and by the formation of intracellular lipid droplets detected using Oil Red-O staining.

#### 2.9.2. Osteogenic Differentiation

BMMSCs in complete medium were seeded at  $10 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions until they reached 80% confluency. The supernatant media were then replaced with either complete culture medium (used as control) or osteogenic-induction medium (Lonza France, Levallois). The supernatant media were replaced every 2 days of cell culture. Osteogenic differentiation was determined by monitoring the expression of select osteogenic markers (specifically, Runx2, Coll1, and Osterix) using qRT-PCR, by the presence of calcium-containing mineral deposits (stained with Alizarin Red) in the extracellular matrix of the cultured BMMSCs, and by determination of ALP (Alkaline phosphatase) activity.

#### 2.9.3. Angiogenic Differentiation and Potential

ZDF- and ZL-BMMSCs were seeded at  $10 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions for 24 h. The supernatant media were then replaced with either culture medium supplemented with 2% FCS (*v/v*) (used as control) or angiogenic-induction medium composed of  $\alpha$ MEM, 2% FBS (Fetal bovine serum) (*v/v*), and 50 ng/mL VEGF (Vascular endothelial growth factor) (all chemicals were from Sigma-Aldrich). The BMMSCs were cultured under those conditions for 14 consecutive days. The supernatant media were replaced every 2 days of cell culture. Endothelial differentiation was determined by monitoring the expression of select angiogenic markers (specifically *Vegf*, *Fgf2*, *Hif1*, and *Hif2*) using qRT-PCR. In addition, the formation of tubular structures was determined upon culturing the aforementioned cells on Matrigel for 24 h.

### 2.10. Matrigel Plug Assay

BMMSCs from either ZL or ZDF rats ( $10^6$  cells in 500  $\mu$ L of Matrigel) were implanted subcutaneously into the flank of 8-week-old, Swiss, nude mice. After 14 days, the mice were euthanized using Dolethal (Vétoquinol). Each Matrigel plug was excised, placed in 500  $\mu$ L RIPA buffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer), and processed using a Retsch MM 300 TissueLyser at 30 pulses/min for 2 min. The hemoglobin content in each excised Matrigel implant was determined using a commercially available assay (Hemoglobin Colorimetric Assay kit; Cayman).

### 2.11. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Expression of select osteogenic and adipogenic markers by BMMSCs cultured in either adipogenic, osteogenic, or angiogenic media was determined using total RNA extracted from BMMSCs pre-treated with Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The RNA integrity and purity/concentration were checked using spectrophotometry (Nanodrop 1000, Labtech, Palaiseau, France). Random-primed cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using the SuperScript<sup>TM</sup> II RT Kit (Invitrogen). Equal volumes of cDNA were used to program amplifications through real-time PCR (RT-PCR). qRT-PCR was performed using an iCycler thermocycling apparatus (MyiQ<sup>TM</sup> Single-Color RT-PCR; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) in the presence of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the following specific primers: for osteogenic differentiation: Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Collagen type I (coll1), and Osterix; for adipogenic differentiation: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg), Adiponectin (AdipoQ), and fatty acid binding protein 4 (Fabp4); and for endothelial differentiation: analysis of the involved angiogenic factors was performed using a multiplex containing 84 angiogenic-related genes (and the rat angiogenesis RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array; Qiagen, Hilden, Deutschland). Briefly after the activation of DNA polymerase at 95 °C for 10 min, cDNA was amplified by performing 40 two-step PCR cycles: a 15-s denaturation step at 95 °C, followed by a 60-s annealing, and an extension step at 60 °C. Each sample tested was run in triplicate. All data were subsequently analyzed using MyiQ<sup>TM</sup> Software (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Quantitation of gene expression was performed using the comparative threshold cycle method ( $\Delta\Delta Ct$ ).

### 2.12. Statistical Analyses

Each experiment was performed in triplicate and at least three separate times using different cell preparations. Numerical data were reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). For time-dependent experiments, analysis of variance (ANOVA) was used for unpaired two-tailed samples, and the experimental data were compared to their respective controls. For time-independent experiments, Student's t-tests were used for unpaired two-tailed samples, and the experimental data were compared to their respective controls. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Animals

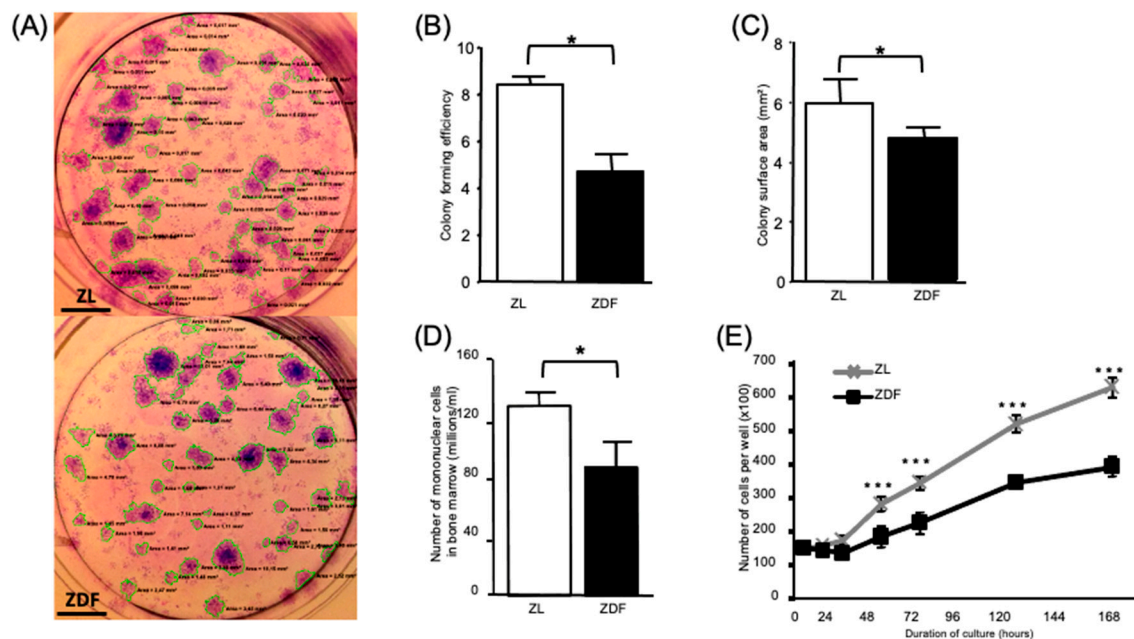
At 13 weeks, the ZDF rats had significantly ( $p < 0.001$ ) higher body weight compared to their age-matched ZL rats (specifically,  $339.2 \pm 4.61$  vs.  $404.2 \pm 13.07$ , respectively; data not shown). Compared to the ZL rats, the ZDF rats also had significantly ( $p < 0.05$ ) increased serum glucose and fructosamine levels (specifically, 2.26-fold and 1.52-fold, respectively; data not shown).

### 3.2. T2DM Affects the Number of Bone Marrow Mononuclear Cells and Select Functions of the Expanded BMMSCs

The formation of CFU-Fs was significantly ( $p < 0.05$ ) lower (specifically, by 2-fold) in the BMMSCs harvested from the ZDF than from the ZL rats (Figure 1A,B). The average colony size formed by BMMSCs from the diabetic ZDF animals was significantly lower (by

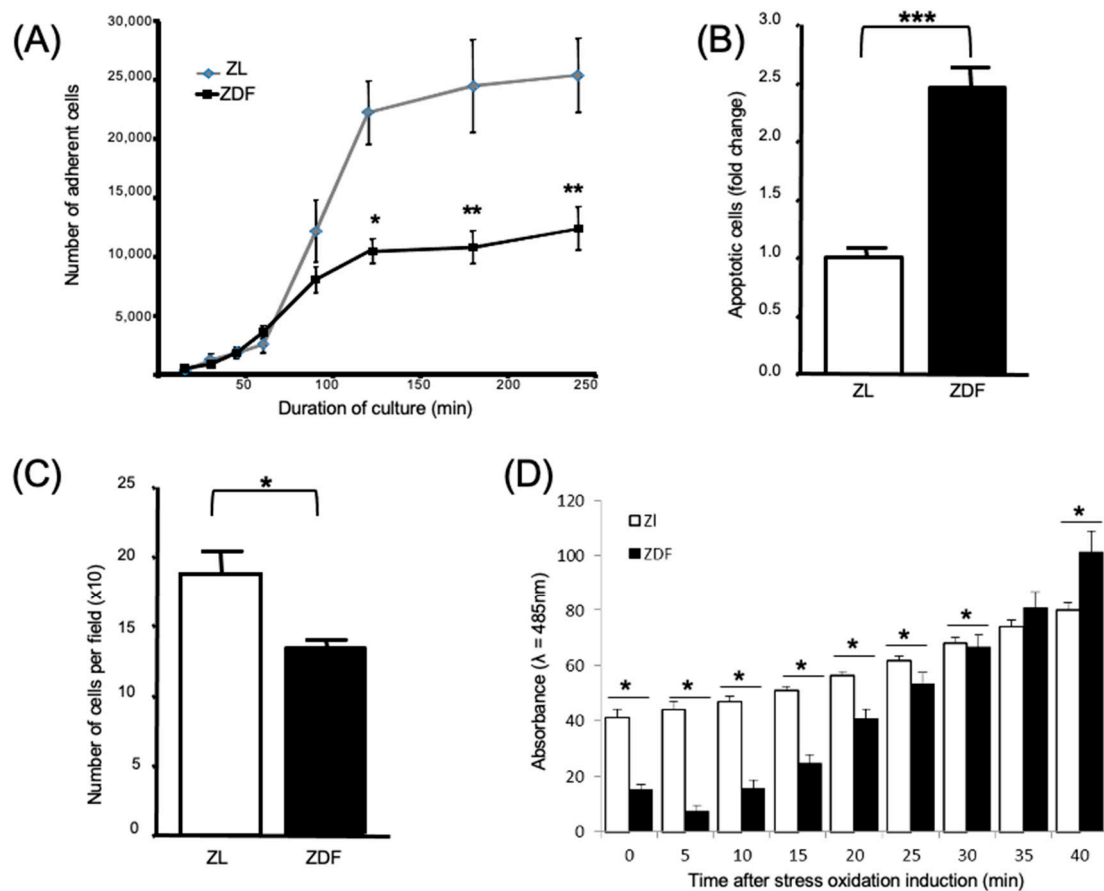


20%) compared to that obtained with the cells from non-diabetic ZL animals (Figure 1C). The number of mononuclear cells harvested from the bone marrow of diabetic (ZDF) animals was significantly ( $p < 0.05$ ) lower (by 30%) than the cells from non-diabetic (ZL) rats (Figure 1D). The MSC markers CD90 and CD105 were similarly expressed by passage-2-expanded cells from both ZDF and ZL rats. None of the cell types expressed the leukocyte marker CD45 (data not shown). Expression of the aforementioned MSC markers was similar for the cells harvested from the ZDF and ZL rats. After culture under standard conditions for up to 7 days, the proliferation of BMMSCs from the ZDF rats was significantly ( $p < 0.001$ ) less than that observed for the BMMSCs from the ZL animals (Figure 1E).



**Figure 1.** Type 2 diabetes mellitus (T2DM) affects the number, clonogenicity, and proliferation of cultured bone marrow-derived multipotent stromal cells (BMMSCs). Formation of fibroblastic colonies (CFU-Fs) in complete medium was assayed using bone marrow mononuclear cells from diabetic (ZDF) and non-diabetic (ZL) rats. (A) Representative images of CFU-F colonies, Scale bar = 0.5 cm (B) The colony forming efficiency (CFE), (C) The average area of each colony shown in Figure 1A, (D) The number of mononuclear cells present in the collected bone marrow, counted after isolation of the BMMSCs from two tibiae and two femurs per rat ( $n = 3$ ), and (E) The number of ZDF-BMMSCs in alpha-Modified Eagle's Medium ( $\alpha$ MEM) containing 10% Fetal bovine serum (FBS), exhibiting lower proliferation over a 7-day period of culture. Values are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The data are from 3 independent wells per condition tested in 3 independent experiments ( $n = 9$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

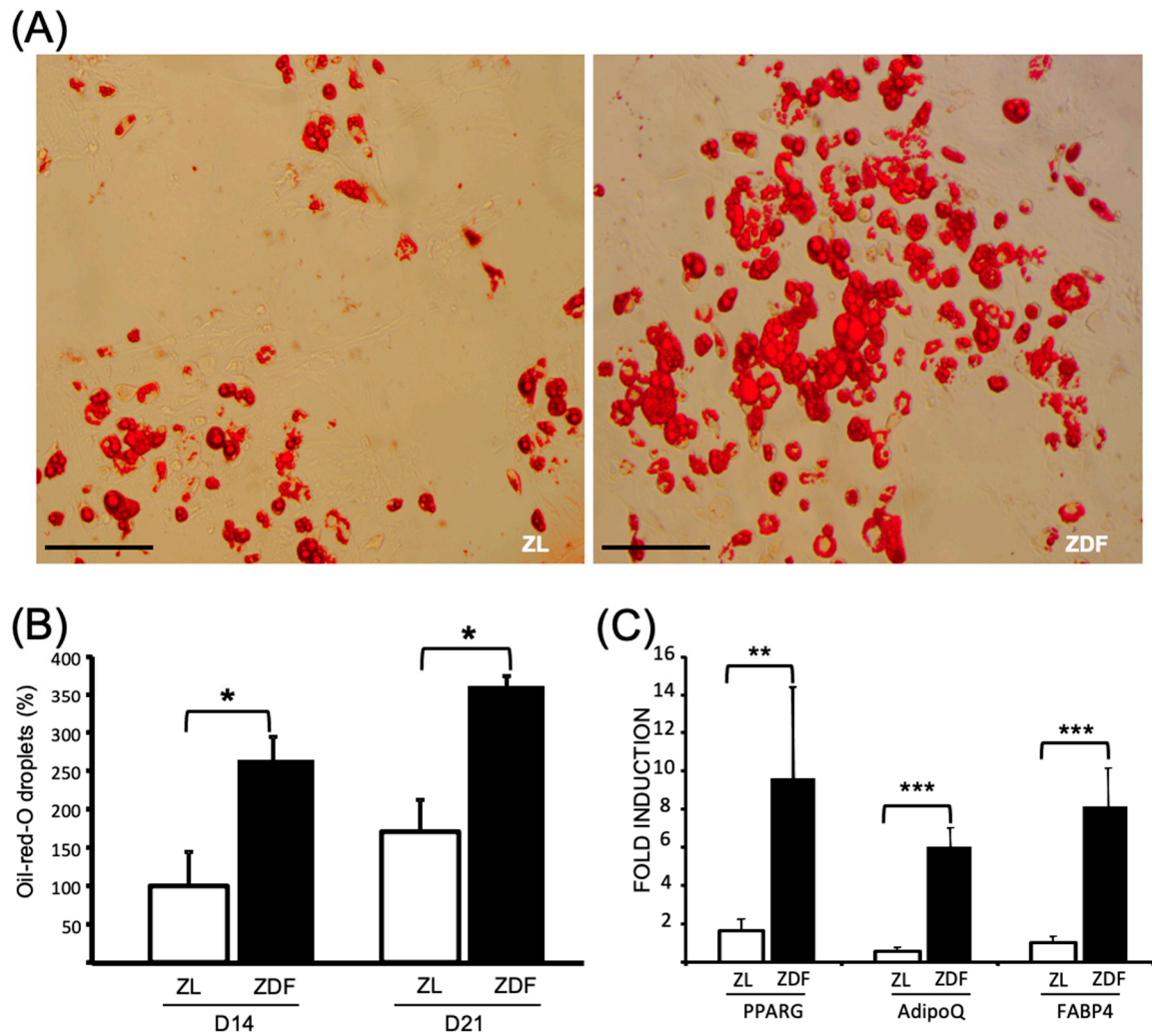
The number of expanded ZDF-BMMSCs adhered to tissue culture polystyrene 2 and 4 h after seeding was significantly ( $p < 0.01$ ) lower (by 45%) than the respective results obtained with the ZL-BMMSCs (Figure 2A). BMMSCs from ZDF rats (which had been cultured in serum-free media for 2 days and then double-labeled with annexin/PI (propidium iodide)) exhibited a significantly ( $p < 0.001$ ) higher level of apoptosis (specifically by 2-fold) than the BMMSCs from the ZL animals (Figure 2B). These results provided evidence that, compared to the BMMSCs from the diabetic ZDF rats, the cells from the non-diabetic ZL rats are more sensitive to serum-deprivation. In terms of their chemotactic capability, the BMMSCs from the ZDF rats exhibited significantly ( $p < 0.001$ ) lower migration (by 25%) than the cells from the ZL control animals (Figure 2C). Furthermore, compared to the results obtained from ZL-BMMSCs, a different profile was observed for the ZDF-BMMSCs in terms of the kinetics of ROS production (Figure 2D).



**Figure 2.** Impaired apoptosis, migration, adhesion, and Reactive Oxygen Species (ROS) production of ZDF-BMMSCs. **(A)** BMMSCs from ZDF and ZL rats were each seeded in 12-well culture plates, fixed using methanol-phosphate buffered saline (PBS) solution, and stained with Giemsa solution. Adherent cells were counted using the data processing software Image J. **(B)** Flow cytometry analysis of apoptosis using cells cultured under serum-free conditions for 48 h and stained with annexine-PI, **(C)** Cell migration was determined using commercially available 24-well Boyden chambers. Cells present on four randomly-chosen, separate areas per membrane were counted in situ. **(D)** Oxidative stress was induced by adding tert-butyl peroxide, then light absorbance ( $\lambda = 485\text{nm}$ ) was measured every 5 min for 40 min. Values are mean  $\pm$  SEM. The data are from 3 independent wells per condition tested in 3 independent experiments ( $n = 9$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.3. T2DM Differently Affects the Differentiation Potential of the In Vitro BMMSCs

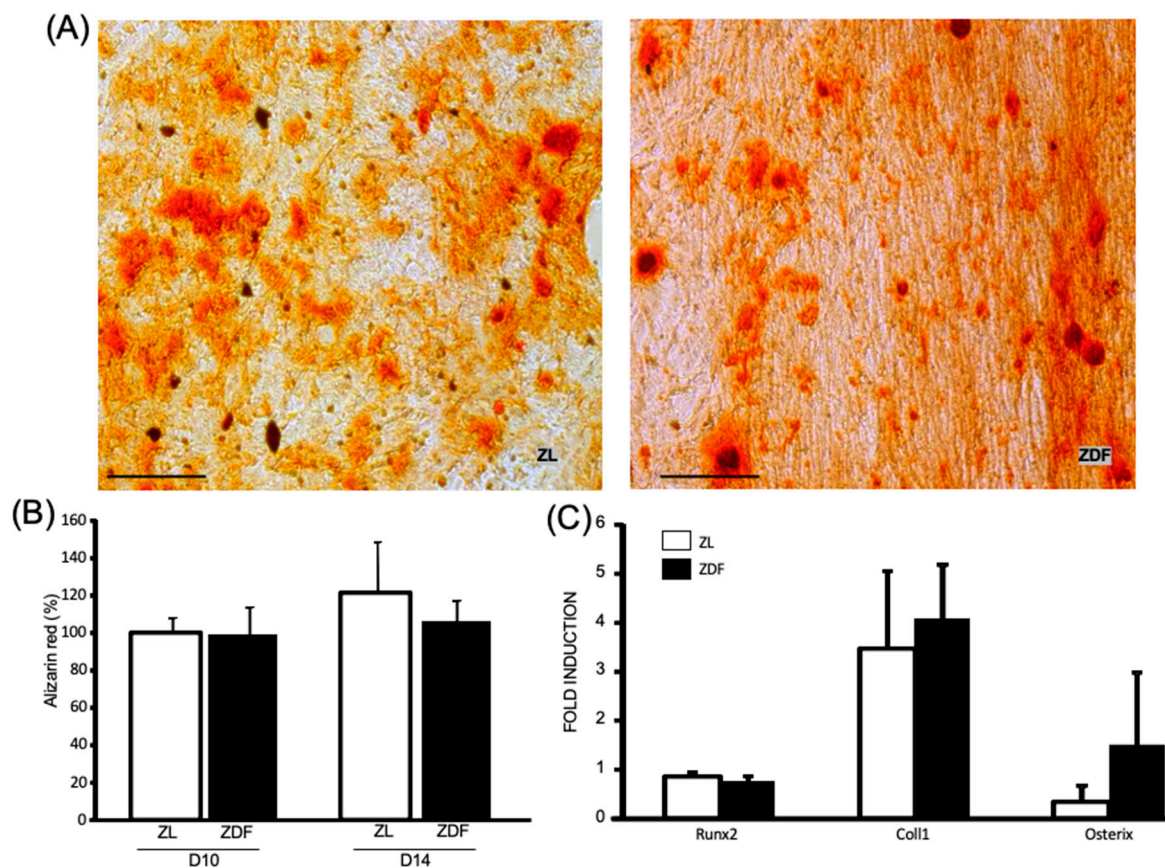
The potential of ZDF- and ZL-BMMSCs to undergo adipogenic differentiation was assessed by culturing these cells under normoglycemic conditions in adipogenic medium for 14 and 21 consecutive days. Under these conditions, the BMMSCs from the ZDF rats contained a significantly ( $p < 0.05$ ) higher number of triglyceride droplets than the BMMSCs from the ZL animals (Figure 3A,B). In addition, analysis of the chosen, select adipogenic markers revealed upregulation of Pparg (by 10-fold), AdipoQ (by 6-fold), and Fabp4 (by 8-fold) in the ZDF-BMMSCs (Figure 3C).



**Figure 3.** Enhanced adipogenic differentiation of the ZDF-BMMSCs. (A) Representative light microphotograph of BMMSCs from ZDF and ZL rats cultured in adipogenic-induction medium for 21 days, Scale bar = 200  $\mu$ m. (B) Oil red-O droplets in BMMSCs after 14 and 21 days of culture measured by spectrophotometer, (C) Expression levels of the *Pparg*, *AdipoQ*, and *Fabp4* genes in the BMMSCs measured by qRT-PCR at day 14. Values are mean  $\pm$  SEM. The data are from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n = 9). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

The potential of ZDF- and ZL-BMMSCs to undergo osteogenic differentiation was assessed by culturing these cells in osteogenic medium for 14 and 21 consecutive days. As evidenced by the results obtained following calcium and alizarin red staining (Figure 4A,B, respectively), after 21 days of cell culture the osteogenic differentiation exhibited by ZDF- and ZL- BMMSCs was similar. The transcription factors *Runx2*, *Col1i*, and *Osterix* were also similarly expressed by the BMMSCs from the ZL and ZDF rats after 14 days of culture (Figure 4C).



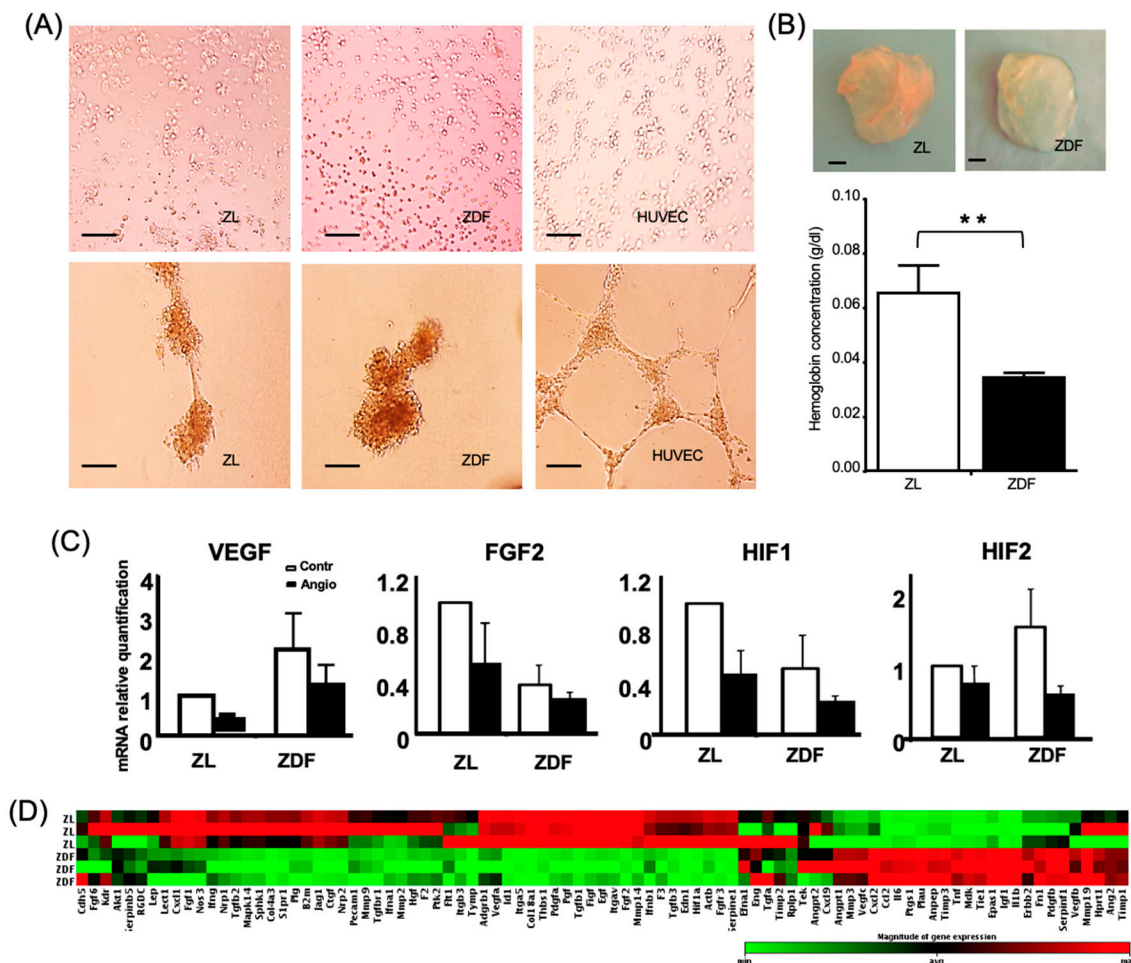


**Figure 4.** Osteogenic differentiation of ZDF- and ZL-BMMSCs. BMMSCs from ZDF and ZL rats were submitted to an osteogenic induction medium. **(A)** Photograph of Alizarin red staining after 21 days of culture in osteogenic medium, **(B)** Dosage of alizarin red staining by spectrophotometry, Scale bar = 200 μm. **(C)** Expression levels of the *Runx2*, *Coll1*, and *Osterix* genes in the BMMSCs measured by qPCR at day 14. Values are mean ± SEM, calculated from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n = 9)

### 3.4. T2DM Reduces the BMMSC Angiogenic Potential

BMMSCs from the ZL and ZDF rats did not differentiate into endothelial cells (Figure 5A). Expression of the chosen, select angiogenic markers, *VEGF*, *FGF2*, *HIF1*, and *HIF2* from ZL and ZDF cells exposed or not to angiogenic medium did not exhibit significant differences (Figure 5C). Moreover, and in contrast to the results obtained with HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, positive control), no tubular structures were formed when the aforementioned cells were cultured on Matrigel for 24 h (Figure 5A). To determine the proangiogenic potential of the BMMSCs from ZDF and ZL rats in vivo, the model of implanted Matrigel plugs was used. Upon implantation of the ZL- and ZDF-BMMSCs seeded in Matrigel plugs in the flank of nude mice for 14 days, the ZDF-BMMSC-containing gels exhibited less angiogenesis than the respective gels containing ZL-BMMSCs. Supporting evidence is provided by the illustration of representative explanted plugs in Figure 5B: the color of the plug seeded with ZDF-BMMSCs is pale, but the one seeded with ZL-BMMSCs is red (evidence of higher blood vessel content). Compared to the ZL-BMMSC-containing specimens, the Matrigel plugs originally seeded with ZDF-BMMSCs exhibited a significant ( $p < 0.001$ ) decrease (by 2-fold) in their hemoglobin content (Figure 5B). Additional evidence corroborating the observed differences was provided by the results regarding the expression of known angiogenesis-related genes in the ZL- and ZDF-BMMSCs cultured under normoglycemic conditions before their seeding on Matrigel plugs. The results of multiplex analysis of 84 genes tested showed that ZDF-BMMSCs differentially expressed antiangiogenic and angiogenic genes (Figure 5D). Specifically, and

compared to pertinent results obtained with ZL-BMMSCs, eleven anti-angiogenic genes, including *Col18a1* (by 3-fold), *Col4a3* (by 8-fold), *F2* (by 2-fold), *Infg* (by 2-fold), *Itga5* (by 3-fold), *Jag1* (by 2-fold), *Pdgfa* (by 2-fold), *S1pr1* (by 3-fold), *Serpine1* (by 3-fold), *TGFb1* (by 3-fold), and *TGFb3* (by 2-fold) were significantly ( $p < 0.05$ ) down-regulated in the ZDF-BMMSCs, while ten pro-angiogenic genes, including *Anpep* (by 3-fold), *MCP-1* (by 3-fold), *Mip-2* (by 3-fold), *IGF-1* (by 5.5-fold), *IL-6* (by 2-fold), *PLAU* (by 2-fold), *Tie1* (by 5.5-fold), and *TNF* (by 4-fold) were significantly ( $p < 0.05$ ) up-regulated in the ZDF-BMMSCs. It should be noted that the observed difference in gene expression level did not affect the lack of differentiation of the BMMSCs into the endothelial lineage in vitro.



**Figure 5.** ZDF-BMMSCs reduced ZL- are more angiogenesis inducing than their counterpart. **(A)** Light micrographs of ZL-, ZDF-BMMSCs, and HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) cultured in an angiogenic medium for a 14-day period and then on a Matrigel for 24 h, Scale bar = 100 μm **(B)** Light micrograph of explanted Matrigel plugs seeded with ZL- and ZDF-BMMSCs (upper panel) and hemoglobin content of those plugs (lower panel) after 14 days implantation in nude mice, Scale bar = 1 mm **(C)** Expression of *VEGF*, *FGF2*, *HIF1*, and *HIF2* from ZL and ZDF-BMMSCs cultured with control (white) or angiogenic induction medium (black), **(D)** Expression of select angiogenic genes in ZDF-BMMSCs relative to the results obtained from ZL-BMMSCs under the same normoglycemic conditions of culture after 14 days, via quantitative PCR. Values are mean ± SEM. n = 3. \*\*  $p < 0.01$ . ZL-BMMSCs (i.e., from control rats). ZDF-BMMSCs (i.e., from diabetic rats).

#### 4. Discussion

Considering that bone marrow mesenchymal stem cells have the capacity to proliferate, differentiate into several lineages, and home in on the sites of injury, they represent a very promising but still untapped cell source for the treatment of impaired diabetic wounds [16]. Published research findings regarding the effects of T2DM conditions on

BMMSCs' functional capacity are few and not conclusive [12,14]; moreover, selection between autologous and allogeneic cells is yet to be discussed [13,17]. These gaps in the current knowledge about T2DM provided motivation and justification for the present comparative study of the differentiation and select functions of BMMSCs from ZDF 13/14-old rats, a model for the short-term, diabetic condition [20], and their ZL littermates as controls. The results provided evidence that BMMSCs harvested from the T2DM bone marrow microenvironment differed from BMMSCs harvested from the non-diabetic milieu as follows: (i) there were fewer cells; (ii) they exhibited impaired functionality but increased adipogenic differentiation when cultured under normoglycemic conditions; and (iii) they had decreased proangiogenic potential after transplantation in a non-diabetic milieu. These results highlight the intrinsic dysfunction of T2DM-BMMSCs and have implications for the potential use of these cells in autologous cell therapies and in tissue engineering.

The limitation in the number of mononuclear cells harvested from the ZDF bone marrow is in line with other literature reports regarding T2DM in (db/db) mice [24]. This may be explained by the depletion of resident stem/progenitor cells due to the disturbed stem cell niche in the bone marrow of the diabetic animals [5,6]. A consequence of the reduced number of BMMSCs may be the diabetes-associated impaired repair of injured tissues [8,24]. Most importantly, compared to ZL-BMMSCs, the ZDF-derived cells exhibited altered functions even when they were cultured *ex vivo* under normoglycemic conditions. Specifically, ZDF-BMMSCs' migration, clonogenicity, and proliferation ability were significantly ( $p < 0.05$ ) decreased, while their apoptosis was increased compared to the respective results obtained with ZL-BMMSCs. These results imply that expansion of T2DM-BMMSCs to reach to sufficient numbers for autologous transplantation is challenging and that these cells may have reduced potential to promote tissue healing when they are administered in autologous cell-therapies.

The reasons for which cultured ZDF-BMMSCs exhibited these intrinsic alterations are not known; it is likely to be associated with the hyperglycemia and glycototoxicity present in the T2DM state. Support for this association comes from studies using *ex vivo*-created diabetic environments. In high glucose culture conditions, the proliferation and migration of healthy BMMSCs are attenuated, while apoptosis is increased due to the involvement of the TGF $\alpha$  p38 MAPK signaling pathway [25] or activation of the GSK3b-mediated cyclin D1 [26]. Such decreased proliferation and migration is restored by treatment with metformin, a first line antihyperglycemic agent which also activates AMPK (AMP-activated protein kinase) [27]. Moreover, studies conducted on BMMSCs harvested from T1DM (Type 1 diabetes mellitus) rats reported limited clonogenicity and/or cell proliferation [28–31] and increased apoptosis [32,33]. Hyperglycemia induces cell damage through ROS overproduction, mitochondrial dysfunction, and aberrant gene expression. It is the “common denominator” in the T1DM and T2DM murine diabetic models. Whereas the T1DM model is one of the insulin deficiency models, the ZDF-T2DM model is associated with insulin resistance and hyperinsulinemia conditions, which may have adverse effects on bone cells [20]. Dyslipidemia is also known to play an important role in BMMSCs' fate [34]. Interestingly, in high-fat diet mice BMMSCs display a higher proliferation rate despite the increase in basal glucose levels [35]. In this regard, the use of hypoglycemic medications in the ZDF rat model could better clarify the role of chronic T2DM-associated hyperglycemia in BMMSC functions. For instance, in ZDF rats, empagliflozin, a SGLT2 inhibitor lowering glucose levels and the resulting glycototoxicity (oxidative stress, AGEs/RAGE signaling (advanced glycation end-products and their receptor)), prevents the development of endothelial dysfunction, despite persisting hyperlipidemia and hyperinsulinemia [36]. In this context, it will be of interest to study the effects of metformin—the most commonly prescribed hypoglycemic drug, whose effects on MSC functionalities have been described from several origins [37]. However, it is challenging to ascertain the exact mechanisms behind hypoglycemic drug effects because of their pleiotropic action.

Taken together, these data provide evidence that T2DM, even in an early stage, has detrimental effects on the BMMSCs which persist in cell culture, and that a return to normo-



glycemic conditions does not restore the “therapeutic” potential of the previously diabetic MSCs. The results obtained corroborate previous reports that diabetic stimuli, particularly hyperglycemia, induce an array of epigenetic modifications leading to a phenomenon called “metabolic memory” [33]. It is worth noting that epigenetic mechanisms include DNA methylation, histone modification, and various miRNA-mediated processes [38]. It has been reported that the profile of circulating miRNA is altered during the natural progression of T2DM, probably reflecting changes in diabetes-related tissues such as pancreas, liver, heart, skeletal muscle, and adipose in ZDF rats [39] and in other T2DM models [40]. Furthermore, growing evidence suggests that, in a T2DM context, the miRNA expression in MSCs is modified, as it has been shown recently that T2DM-adipose derived MSCs, showing reduced viability and proliferation, exhibit significant differences in the expression of miRNAs involved in cell proliferation (*miR-16-5p*, *miR-146a-5p*, and *miR-145-5p*), as well as miRNA and genes responsible for glucose homeostasis and insulin sensitivity (*miR-24-3p*, *140-3p*, *miR-17-5p*, *SIRT1*, *HIF-1 $\alpha$* , *LIN28*, *FOXO1*, and *TGF $\beta$* ) [41]. Further studies are needed to clarify T2DM-induced epigenetic changes in BMMSCs and their functionalities.

Furthermore, the results of the present study provided evidence for a differential potential of ZL- and ZDF-BMMSCs to differentiate into adipogenic and osteogenic lineages *in vitro* under normoglycemic conditions. Compared to ZL-BMMSCs, ZDF-BMMSCs exhibited enhanced adipogenesis, a phenomenon also observed in *db/db* mice [42], in *WNIN/GR-Ob* (mutant) rats [43] and in a patient with T2DM [44], suggesting that the BMMSCs removed from a hyperglycemic and hyperinsulinemic T2DM-state retained the enhanced adipogenic potential. Enhanced adipogenesis has also been shown in healthy BMMSCs cultured in medium complemented with sera isolated from T2DM patients [45], suggesting that the T2DM milieu plays a major role in inducing the differentiation of human BMMSCs. The mechanism behind T2DM-induced adipogenesis is not completely understood. Besides hyperglycemia-increased production of ROS and the modification of antioxidant mechanisms [14], the hyperinsulinemia-induced Nox4-derived oxidants [42] also lead to altered BMMSC differentiation. In the present study, ZDF-BMMSCs exhibited elevated levels of ROS, even when cultured under normoglycemic conditions, suggesting that T2DM milieu may induce permanent cellular alterations involved in ROS production, a condition which may also affect adipogenic differentiation of cells. The increased tendency of diabetic BMMSCs to differentiate into adipocytes is often associated with reduced osteogenic potential. The ZL- and ZDF-BMMSCs tested in the present study exhibited similar osteogenic differentiation. These results are in line with the reports on BMMSCs from an obese T2DM mouse model and from T2DM patients who exhibited increased adipogenic potential, without changing their osteogenic potential [44]. On the contrary, reduced osteogenic differentiation was mainly reported for BMMSCs derived from T1DM murine models [7,28–31]. The exact mechanism underlying this difference is not known. It may be the result of T1DM and T2DM effects on the biological aspects of BMMSCs, as well as the duration of T2DM. Undoubtedly, further studies are needed to elucidate if, and how, the insulinemia and hyperglycemia associated with T2DM may affect BMMSCs.

Concerns remain regarding the angiogenic potential of autologous MSCs in the T2DM environment [46]. The present study also investigated the proangiogenic effects of BMMSCs in the ZDF model. Pertinent results provided evidence for a defective angiogenic potential of ZDF-BMMSCs, lending support to those reported for BMMSCs derived from *db/db* mice [42] and for healthy BMMSCs pre-conditioned with serum from T2DM [47,48]. The decreased angiogenic potential of ZDF-BMMSCs is probably attributed to a dysfunctional signaling of endothelial cells arising from a disturbed balance between pro- and anti-angiogenic factors. Gene analysis of ZDF-BMMSCs cultured under normoglycemic conditions revealed the alteration of angiogenesis-related gene expression. In recent reports, the decreased angiogenic potential of BMMSCs was ascribed mainly to changes in the secretome composition [47,48]. In contrast to these studies, previous studies of our group [23] showed that secretome of ZDF-BMMSCs, implanted under similar conditions,

resulted in increased angiogenesis, suggesting differences in the angiogenic effects between implanted cells and their secretome.

It is plausible that some limitations may have affected the present study. Firstly, in the ZDF rat model used, it is difficult to distinguish the effects of hyperglycemia from those of the obesity-associated dyslipidemia and hypertriglyceridemia. Secondly, in comparison to diet-induced polygenic models, the ZDF rat is a monogenic model in which leptin-signaling deficiency, accounted for the phenotype, does not reflect the complex background and physiopathology of T2DM [49]. On the other hand, in diet-induced polygenic models, used to study the interaction of diet and genes in obesity, “insulinoreistance” and T2DM complications, the choice of rodent strain, composition of high-fat formula, and combination treatment with streptozotocin are not yet standardized, thereby impairing practicability and comparability [50]. In the present study, the ZDF rat model was chosen because it mostly displays the metabolic, microvascular [4,22], and musculoskeletal features of T2DM reported in humans [21]. Moreover, results from our group revealed an altered composition of the secretome and the paracrine effects of BMMSCs [23].

In summary, the present study provided evidence that BMMSCs exhibit impaired functionality *ex vivo* under normoglycemic conditions and/or after their transplantation in a non-diabetic environment. These data highlight the fact that BMMSCs harvested even from the short-term T2DM environment exhibit changes which make them dysfunctional *in situ* and limit their therapeutic potential post-transplantation. The present study further emphasizes the need for further research and/or new approaches to restore the functions of defective MSCs isolated from diabetic subjects.

**Author Contributions:** J.R. conducted the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript; C.D., G.F., R.L., G.P.-D. conducted the experiments and analyzed the data. M.B. and H.P. contributed to the discussion of the results. F.A. directed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

**Institutional Review Board Statement:** The experimental procedures used in the present study were approved by the Ethics Committee of the Paris-Diderot University (N°01610.01/S69), Paris, France.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interests.

## References

1. Schwartz, A.V. Marrow Fat and Bone: Review of Clinical Findings. *Front. Endocrinol.* **2015**, *6*, 40. [[CrossRef](#)]
2. Jiao, H.; Xiao, E.; Graves, D.T. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2013**, *13*, 327–335. [[CrossRef](#)]
3. Marin, C.; Luyten, F.P.; Van Der Schueren, B.; Kerckhofs, G.; Vandamme, K. The Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 6. [[CrossRef](#)]
4. Caliaperoumal, G.; Souyet, M.; Bensidhoum, M.; Petite, H.; Anagnostou, F. Type 2 diabetes impairs angiogenesis and osteogenesis in calvarial defects: MicroCT study in ZDF rats. *Bone* **2018**, *112*, 161–172. [[CrossRef](#)]
5. Spinetti, G.; Cordella, D.; Fortunato, O.; Sangalli, E.; Losa, S.; Gotti, A.; Carnelli, F.; Rosa, F.; Riboldi, S.; Sessa, F.; et al. Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: Implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 510–522. [[CrossRef](#)]
6. Piccinin, M.A.; Khan, Z.A. Pathophysiological role of enhanced bone marrow adipogenesis in diabetic complications. *Adipocyte* **2014**, *3*, 263–272. [[CrossRef](#)]
7. Kim, T.Y.; Schafer, A.L. Diabetes and Bone Marrow Adiposity. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2016**, *14*, 337–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Maxson, S.; Lopez, E.A.; Yoo, D.; Danilkovitch-Miagkova, A.; Leroux, M.A. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 142–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Watt, S.M.; Gullo, F.; Van Der Garde, M.; Markeson, D.; Camicia, R.; Khoo, C.P.; Zwaginga, J.J. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br. Med. Bull.* **2013**, *108*, 25–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **1999**, *284*, 143–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Park, S.R.; Kim, J.W.; Jun, H.S.; Roh, J.Y.; Lee, H.E.; Hong, I.S. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Mol. Ther.* **2017**, *26*, 606–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fijany, A.; Sayadi, L.R.; Khoshab, N.; Banyard, D.A.; Shaterian, A.; Alexander, M.; Lakey, J.R.T.; Paydar, K.Z.; Evans, G.R.D.; Widgerow, A.D. Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes. *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *46*, 1459–1475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Van De Vyver, M. Intrinsic Mesenchymal Stem Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus: Implications for Autologous Cell Therapy. *Stem Cells Dev.* **2017**, *26*, 1042–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mahmoud, M.; Abu-Shahba, N.; Azmy, O.; El-Badri, N. Impact of Diabetes Mellitus on Human Mesenchymal Stromal Cell Biology and Functionality: Implications for Autologous Transplantation. *Stem Cell Rev. Rep.* **2019**, *15*, 194–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Davey, G.C.; Patil, S.B.; O’Loughlin, A.; O’Brien, T. Mesenchymal Stem Cell-Based Treatment for Microvascular and Secondary Complications of Diabetes Mellitus. *Front. Endocrinol.* **2013**, *5*, 86. [[CrossRef](#)]
16. Cao, Y.; Gang, X.; Sun, C.; Wang, G. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 9328347. [[CrossRef](#)]
17. Soria-Juan, B.; Escacena, N.; Capilla-González, V.; Aguilera, Y.; Llanos, L.; Tejedó, J.R.; Bedoya, F.J.; Juan, V.; De La Cuesta, A.; Ruiz-Salmerón, R.; et al. Cost-Effective, Safe, and Personalized Cell Therapy for Critical Limb Ischemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1151. [[CrossRef](#)]
18. Etgen, G.; Oldham, B. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism* **2000**, *49*, 684–688. [[CrossRef](#)]
19. Reinwald, S.; Peterson, R.G.; Allen, M.R.; Burr, D.B. Skeletal changes associated with the onset of type 2 diabetes in the ZDF and ZDSD rodent models. *Am. J. Physiol. Metab.* **2009**, *296*, E765–E774. [[CrossRef](#)]
20. Prisby, R.D.; Swift, J.M.; Bloomfield, S.A.; Hogan, H.A.; Delp, M.D. Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat. *J. Endocrinol.* **2008**, *199*, 379–388. [[CrossRef](#)]
21. Stabley, J.N.; Prisby, R.D.; Behnke, B.J.; Delp, M.D. Type 2 diabetes alters bone and marrow blood flow and vascular control mechanisms in the ZDF rat. *J. Endocrinol.* **2015**, *225*, 47–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zeitoun, D.; Caliapourmal, G.; Bensidhoum, M.; Constans, J.M.; Anagnostou, F.; Bousson, V. Microcomputed tomography of the femur o diabetic rats: Alterations of trabecular and cortical bone microarchitecture and vasculature: A feasibility study. *Eur. Radiol. Exp.* **2019**, *3*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ribot, J.; Caliapourmal, G.; Paquet, J.; Boisson-Vidal, C.; Petite, H.; Anagnostou, F. Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 349–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shin, L.; Peterson, D.A. Impaired therapeutic capacity of autologous stem cells in a model of type 2 diabetes. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 125–135. [[CrossRef](#)]
25. Weinberg, E.; Maymon, T.; Weinreb, M. AGEs induce caspase-mediated apoptosis of rat BMSCs via TNF $\alpha$  production and oxidative stress. *J. Mol. Endocrinol.* **2013**, *52*, 67–76. [[CrossRef](#)]
26. Zhang, B.; Liu, N.; Shi, H.; Wu, H.; Gao, Y.; He, H.; Gu, B.; Liu, H. High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3 $\beta$ . *J. Bone Miner. Metab.* **2016**, *34*, 140–150. [[CrossRef](#)]
27. Raghavan, S.; Malayaperumal, S.; Mohan, V.; Balasubramanyam, M. A comparative study on the cellular stressors in mesenchymal stem cells (MSCs) and pancreatic  $\beta$ -cells under hyperglycemic milieu. *Mol. Cell. Biochem.* **2020**, 1–13. [[CrossRef](#)]
28. Stolzing, A.; Sellers, D.J.; Llewelyn, O.; Scutt, A. Diabetes Induced Changes in Rat Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs* **2010**, *191*, 453–465. [[CrossRef](#)]
29. Zhao, Y.-F.; Zeng, D.-L.; Xia, L.; Zhang, S.-M.; Xu, L.-Y.; Jiang, X.; Zhang, F. Osteogenic potential of bone marrow stromal cells derived from streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Mol. Med.* **2013**, *31*, 614–620. [[CrossRef](#)]
30. Kim, Y.S.; Kang, H.J.; Hong, M.H.; Kang, W.S.; Choe, N.; Kook, H.; Jeong, M.H.; Ahn, Y. Angiopoietin-Like 4 Is Involved in the Poor Angiogenic Potential of High Glucose-Insulted Bone Marrow Stem Cells. *Korean Circ. J.* **2014**, *44*, 177–183. [[CrossRef](#)]
31. Silva, J.C.; Sampaio, P.; Fernandes, M.H.; Gomes, P.S. The Osteogenic Priming of Mesenchymal Stem Cells is Impaired in Experimental Diabetes. *J. Cell. Biochem.* **2015**, *116*, 1658–1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ko, K.I.; Coimbra, L.S.; Tian, C.; Alblowi, J.; Kayal, R.A.; Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C.; Pignolo, R.L.; Graves, D.V. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF $\alpha$ -mediated mechanism. *Diabetologia* **2015**, *58*, 633–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Reddy, M.A.; Zhang, E.; Natarajan, R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia* **2015**, *58*, 443–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ma, C.; Tonks, K.T.; Center, J.R.; Samocha-Bonet, D.; Greenfield, J.R. Complex interplay among adiposity, insulin resistance and bone health. *Clin. Obes.* **2018**, *8*, 131–139. [[CrossRef](#)]
35. Da Silva, S.V.; Renovato-Martins, M.; Ribeiro-Pereira, C.; Citelli, M.; Barja-Fidalgo, C. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. *Obesity* **2016**, *24*, 2522–2532. [[CrossRef](#)]

36. Steven, S.; Oelze, M.; Hanf, A.; Kröllner-Schön, S.; Kashani, F.; Roohani, S.; Welschhof, P.; Kopp, M.; Gödtel-Armbrust, U.; Xia, N.; et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 370–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Smieszek, A.; Kornicka-Garbowska, K.; Szłapka-Kosarzewska, J.; Androvic, P.; Valihrach, L.; Langerova, L.; Rohlova, E.; Kubista, M.; Marycz, K. Metformin Increases Proliferative Activity and Viability of Multipotent Stromal Stem Cells Isolated from Adipose Tissue Derived from Horses with Equine Metabolic Syndrome. *Cells* **2019**, *8*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Berezin, A.E. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2016**, *10*, S176–S183. [[CrossRef](#)]
39. Delić, D.; Eisele, C.; Schmid, R.; Luippold, G.; Mayoux, E.; Grempler, R. Characterization of Micro-RNA Changes during the Progression of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kim, M.; Zhang, X. The Profiling and Role of miRNAs in Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Clin. Res.* **2019**, *1*, 5–23. [[CrossRef](#)]
41. Alicka, M.; Major, P.; Wysocki, M.; Marycz, K. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Isolated from Patients with Type 2 Diabetes Show Reduced “Stemness” through an Altered Secretome Profile, Impaired Anti-Oxidative Protection, and Mitochondrial Dynamics Deterioration. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Yan, J.; Tie, G.; Wang, S.; Messina, K.E.; Didato, S.; Guo, S.; Messina, L.M. Type 2 Diabetes Restricts Multipotency of Mesenchymal Stem Cells and Impairs Their Capacity to Augment Posts ischemic Neovascularization in db/db Mice. *J. Am. Heart Assoc.* **2012**, *1*, e002238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Madhira, S.L.; Challa, S.S.; Chalasani, M.; Nappanveethl, G.; Bhonde, R.R.; Ajumeera, R.; Venkatesan, V. Promise(s) of Mesenchymal Stem Cells as an In Vitro Model System to Depict Pre-Diabetic/Diabetic Milieu in WNIN/GR-Ob Mutant Rats. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ferland-McCollough, D.; Maselli, D.; Spinetti, G.; Sambataro, M.; Sullivan, N.; Blom, A.; Beltrami, A.P. MCP-1 Feedback Loop Between Adipocytes and Mesenchymal Stromal Cells Causes Fat Accumulation and Contributes to Hematopoietic Stem Cell Rarefaction in the Bone Marrow of Patients With Diabetes. *Diabetes* **2018**, *67*, 1380–1394. [[CrossRef](#)]
45. Moseley, K.F.; Doyle, M.E.; De Beur, S.M.J. Diabetic serum from older women increases adipogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Endocr. Res.* **2018**, *43*, 155–165. [[CrossRef](#)]
46. Brewster, L.P.; Robinson, S.; Wang, R.; Griffiths, S.; Li, H.; Peister, A.; Copland, I.; McDevitt, T.; Wang, R. Expansion and angiogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with critical limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* **2017**, *65*, 826–838.e1. [[CrossRef](#)]
47. Rezaie, J.; Mehranjani, M.S.; Rahbarghazi, R.; Shariatzadeh, M.A. Angiogenic and Restorative Abilities of Human Mesenchymal Stem Cells Were Reduced Following Treatment with Serum From Diabetes Mellitus Type 2 Patients. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 524–535. [[CrossRef](#)]
48. Rezaabakhsh, A.; Cheraghi, O.; Nourazarian, A.; Hassanpour, M.; Kazemi, M.; Ghaderi, S.; Faraji, E.; Rahbarghazi, R.; Avci, C.B.; Bagca, B.G.; et al. Type 2 Diabetes Inhibited Human Mesenchymal Stem Cells Angiogenic Response by Over-Activity of the Autophagic Pathway. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 1518–1530. [[CrossRef](#)]
49. Fang, J.-Y.; Lin, C.-H.; Huang, T.H.; Chuang, S.-Y. In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity. *Nutrients* **2019**, *11*, 530. [[CrossRef](#)]
50. Engel, H.; Xiong, L.; Reichenberger, M.; Germann, G.; Roth, C.; Hirche, C. Rodent models of diet-induced type 2 diabetes mellitus: A literature review and selection guide. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2019**, *13*, 195–200. [[CrossRef](#)]

## **Points importants et interface**

- Les CSMs issues des rats ZDF présentent une diminution de leur potentiel : d'adhésion, de survie, de clonogénicité, de prolifération et de migration tout maintenant l'expression des marqueurs spécifiques des cellules souches CD90 et CD105.
- Le microenvironnement diabétique prédispose les CSMs pour une différenciation adipogénique, sans modifier leur potentiel ostéogénique.
- Le potentiel pro-angiogénique des CSMs issues d'un microenvironnement DT2 transplantées en contexte non diabétique est diminué.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) prélevées de la moelle osseuse dans un microenvironnement de DT2, même établi depuis peu, présentent des changements qui les rendent dysfonctionnelles *in situ* et limitent leur potentiel thérapeutique après la transplantation. Dans le contexte diabétique, les cellules se heurtent à un microenvironnement complexe, impliquant différents acteurs, notamment les produits avancés de glycation (AGEs) – générés par l'hyperglycémie chronique – qui induisent un stress oxydatif intracellulaire. Les effets des AGEs sur les CSMs sont peu documentés et controversés. Il nous apparaît donc comme nécessaire de caractériser les effets des AGEs, dont le stress oxydatif induit, au niveau des CSMs issues d'individus sains et DT2. L'utilisation d'antioxydants pourrait rétablir l'équilibre redox et la fonctionnalité de CSMs. Nous avons évalué, en parallèle, le potentiel antioxydant de la N-acétylcystéine pour la régulation du stress oxydatif intracellulaire au niveau des CSMs humaines ou issues d'animaux sains et DT2.



## Chapitre II EFFETS DE COMPOSÉS DU MICROENVIRONNEMENT DT2 (STRESS OXYDATIF, AGEs) ET ETUDE DU POTENTIEL D'UN ANTIOXYDANT DE REFERENCE, POUR REGULER LE STRESS OXYDATIF AU NIVEAU DES CSMs

Article: The protective effect of N-acetylcysteine on antimycin A-induced respiratory chain deficiency in mesenchymal stem cells

Abolfazl Barzegari, Yadollah Omid, **Rebecca Landon**, Virginie Gueguen, Sepideh Parvizpour, Anne Meddahi-Pellé, Fani Anagnostou, Graciela Pavon-Djavid  
Publié dans le journal Chemico-biological interactions

Article: Long standing DT2 modify N-acetylcysteine effects on oxydative stress induced by AGEs in mesenchymal stem cells

**Rebecca Landon**, William Bakari, Abolfazl Barzegari, Guilhem Frescaline, Nathanael Larochette, Olivier Thibaudeau, Hanane El-Hafci, Virginie Gueguen, Graciela Pavon-Djavid, Fani Anagnostou  
En cours de rédaction

Ce chapitre met l'accent sur l'impact du stress oxydatif généré au niveau des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et le potentiel de la N-acetylcysteine pour le contrer. Il est présenté en anglais sous la forme de deux articles : Le premier, « The protective effect of N-acetylcysteine on antimycin A-induced respiratory chain deficiency in mesenchymal stem cells » publié dans le journal Chemico-biological interactions, s'est intéressé au potentiel de la N-acétylcystéine (NAC) pour protéger les CSMs du stress oxydatif générée lors d'une perturbation du métabolisme énergétique mitochondrial. Le second « Long standing DT2 modify N-acetylcysteine effects on oxydative stress induced by AGEs in mesenchymal stem cells » (en cours de rédaction), nous a permis de mieux caractériser les populations cellulaires de la moelle osseuse et du tissu environnant, dans un contexte de DT2 de longue durée. Nous avons aussi étudié les effets des AGEs (« mimant » le microenvironnement DT2 *in vitro*) sur certaines fonctions des CSMs issues d'animaux sains et DT2. Enfin, le potentiel de la N-acétylcystéine à réguler le stress oxydatif chez les CSMs a été investigué.

## Contenu de la section :

<b>ARTICLE: THE PROTECTIVE EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE ON ANTIMYCIN A-INDUCED RESPIRATORY CHAIN DEFICIENCY IN MESENCHYMAL STEM CELLS</b>	<b>62</b>
<b>ARTICLE : LONG STANDING DT2 MODIFY N-ACETYLCYSTEINE EFFECTS ON OXYDATIVE STRESS INDUCED BY AGES IN MESENCHYMAL STEM CELLS</b>	<b>75</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>76</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS</b>	<b>77</b>
2.1 ANIMAL MODEL	77
2.2 HISTOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY	78
2.3 ISOLATION OF RAT BONE MARROW-DERIVED MULTIPOTENT STROMAL CELLS	78
2.4 ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS-EFFECTS ON BMMSCs HARVESTED FROM ZL AND ZDF RATS	79
2.4.1 Cytotoxicity	79
2.4.2 Cell survival and morphology	79
2.4.3 Cell Proliferation	80
2.4.4 Cell Migration	80
2.4.5 Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis	80
2.4.6 Reactive Oxygen Species (ROS) measurement	81
2.5 STATISTICAL ANALYSES	82
<b>3 RESULTS</b>	<b>83</b>
3.1 BIOCHEMICAL PARAMETERS AND BODY WEIGHT IN LONG-STANDING DIABETIC ZDF RATS	83
3.2 LONG-STANDING TYPE 2 DIABETES AFFECTS BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS MICROENVIRONMENT	84
3.3 AGES ALTER SELECT FUNCTIONS OF BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN VITRO	86
3.4 AGES MODULATE DIFFERENTLY SELECT GENES EXPRESSION	88
3.5 EFFECTS OF NAC ON AGES-INDUCED INTRACELLULAR ROS GENERATION	90
<b>4 DISCUSSION</b>	<b>94</b>
<b>POINTS IMPORTANTS ET INTERFACE</b>	<b>97</b>

## **Article: The protective effect of N-acetylcysteine on antimycin A-induced respiratory chain deficiency in mesenchymal stem cells**

### **Résumé**

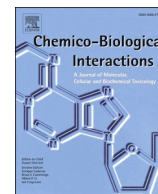
La transplantation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) est un traitement efficace des lésions tissulaires, bien qu'elle soit limitée par la mort précoce des cellules souches dans les premiers jours. La principale raison pourrait être une déficience de la chaîne respiratoire des tissus lésés, liée au stress oxydatif (SO) et à la perturbation du métabolisme énergétique. La perturbation du métabolisme énergétique et le SO inhibent tous deux l'implantation des cellules souches dans le micro-environnement hypoxique, mais d'un autre côté, les fonctions clés des cellules souches sont principalement régulées par leur statut redox cellulaire et leur métabolisme énergétique. Pour cette raison, des stratégies sont développées pour améliorer les propriétés bio-fonctionnelles des CSM, y compris le préconditionnement des cellules souches dans des conditions hypoxiques et la pré-exposition avec des antioxydants. Dans cette étude, la N-acétylcystéine (NAC) a été utilisée pour protéger les cellules du stress oxydatif et la perturbation du métabolisme énergétique a été induite par l'antimycine A (AMA) en bloquant le complexe du cytochrome C. Plusieurs paramètres ont ensuite été analysés, notamment la viabilité cellulaire/l'apoptose, le potentiel membranaire mitochondrial et l'homéostasie moléculaire redox. D'après nos résultats, lorsque les CSMs sont exposées à une chaîne respiratoire déficiente, les cellules ne parviennent pas à éliminer les radicaux libres et le métabolisme énergétique est perturbé. L'utilisation de la NAC a permis d'atténuer les dommages à l'ADN, l'apoptose cellulaire et le stress oxydatif via la voie Nrf2/Sirt3, mais sans aucun effet sur le potentiel de la membrane mitochondriale. Cela signifie que les antioxydants protègent les cellules du SO mais que le problème du métabolisme de l'ATP n'est toujours pas résolu dans les conditions hypoxiques.

**Mots-clés** : Cellule souche mésenchymateuse ; N-acétylcystéine ; Voie de signalisation Nrf2 ; Stress oxydatif ; Sirtuine 3



Contents lists available at ScienceDirect

## Chemico-Biological Interactions

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chembioint](http://www.elsevier.com/locate/chembioint)

Research paper

## The protective effect of *N*-acetylcysteine on antimycin A-induced respiratory chain deficiency in mesenchymal stem cells

Abolfazl Barzegari<sup>a</sup>, Yadollah Omid<sup>b</sup>, Rebecca Landon<sup>c</sup>, Virginie Gueguen<sup>d</sup>, Sepideh Parvizpour<sup>a</sup>, Anne Meddahi-Pellé<sup>d</sup>, Fani Anagnostou<sup>c</sup>, Graciela Pavon-Djavid<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>b</sup> Nova Southeastern University College of Pharmacy, Florida, USA

<sup>c</sup> Paris University, CNRS, INSERM, ENVA, B3OA, F-75010, Paris, France

<sup>d</sup> Université Sorbonne Paris Nord, INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Cardiovascular Bioengineering, 99 Av. Jean-Baptiste Clément, 93430, Villetaneuse, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Mesenchymal stem cell  
*N*-acetylcysteine  
 Nrf2 signaling pathway  
 Oxidative stress  
 Sirtuin 3

## ABSTRACT

Transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) is an effective treatment in tissue injuries though it is limited due to the early death of stem cells within the first few days. The main reason could be a deficiency in the respiratory chain of injured tissues which is linked to the oxidative stress (OS) and disruption of energy metabolism. The disruption in energy metabolism and OS both inhibit the homing of stem cells in the hypoxic micro-environment, however on other hand, the key functions of stem cells are mainly regulated by their cellular redox status and energy metabolism. Because of that, strategies are being developed to improve the bio-functional properties of MSCs, including preconditioning of the stem cells in hypoxic conditions and pretreatment of antioxidants. To achieve this purpose, in this study *N*-acetylcysteine (NAC) was used for the protection of cells from oxidative stress and the disruption in energy metabolism was induced by Antimycin A (AMA) via blocking the cytochrome C complex. Then several parameters were analyzed, including cell viability/apoptosis, mitochondrial membrane potential, and redox molecular homeostasis. Based on our findings, upon the exposure of the MSCs to the conditions of deficient respiratory chain, the cells failed to scavenge the free radicals, and energy metabolism was disrupted. The use of NAC was found to alleviate the DNA damage, cell apoptosis, and oxidative stress via Nrf2/Sirt3 pathway though without any effect on the mitochondrial membrane potential. It means that antioxidants protect the cells from OS but the problem of ATP metabolism yet remains unresolved in the hypoxic conditions.

## 1. Introduction

More than 600 clinical trials involving mesenchymal stem cells (MSCs) have been documented in the National Institute of Health (NIH) clinical trial registry ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). MSCs have been shown to be more efficient than other stem cells in tissue regeneration, however, advances in stem cell therapy are limited due to poor survival and metabolism and cell homing after implantation [1]. Deficiency in the respiratory chain and subsequently the energy restriction and redox

imbalance in the ischemic/damaged tissues are crucial bio-physiological harsh conditions [2,3]. The surviving, and quiescence or apoptosis of transplanted stem cells in these conditions are under question [4,5].

The essential functions of MSCs are regulated by the redox status, mitohormesis, and the energy metabolism [6,7]. Reactive oxygen species (ROS) play a central role in regulating a range of MSC signaling pathways involved in self-renewal capacity, pluripotency, viability, and genomic stability [8]. Therefore, strategies to protect MSCs respiratory chain and support the programmed functions in the *in vivo*

**Abbreviations:** AMA, Antimycin A; ADMSCs, Adipose-derived mesenchymal stem cells; NAC, *N*-acetylcysteine; ARE, Antioxidant response elements; CM-H2DCFDA, 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester; FITC, Fluorescein isothiocyanate; GSH, Glutathione; HIF1 $\alpha$ , Hypoxia-inducible factor 1-alpha; MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Nrf2, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; ROS, Reactive oxygen species; VEGF, Vascular endothelial growth factor; WHO, World Health Organization.

\* Corresponding author.

E-mail address: [graciela.djavid@sorbonne-paris-nord.fr](mailto:graciela.djavid@sorbonne-paris-nord.fr) (G. Pavon-Djavid).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109937>

Received 18 January 2022; Received in revised form 31 March 2022; Accepted 8 April 2022

Available online 14 April 2022

0009-2797/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

transplantation are the challenges for the success of new cellular therapies.

Recently, several methods have been developed to protect MSCs including genetic modification, retaining viability *in vitro*, suitable transplantation, using supporter scaffolds, and preconditioning with antioxidants [9]. Among these, the pretreatment of MSCs with the pineal hormone melatonin showed a strongly increased survival of MSCs after intraparenchymal injection [10]. Another study showed that berberine protects MSCs from apoptosis induced by hypoxia [11]. Other antioxidants demonstrated protective effects on stem cells [4,12–14], however the underlying mechanisms are poorly understood. Another evidence has shown the protective effects of antioxidant on MSCs and the potential mechanisms have been investigated [15]. To improve the efficacy of cell therapy, MSCs were genetically modified with Nrf2 to induce the expression of high levels of endogenous antioxidant enzymes. These cells showed resistance to severe stresses imposed by microenvironment [16].

N-acetylcysteine (NAC) is an endogenous antioxidant molecule that plays several important roles in cellular function and metabolism [17]. The administration of NAC-pretreated human MSCs to a bleomycin-induced model of lung injury in nude mice decreased the pathological grade of lung inflammation and fibrosis while enhancing the retention and proliferation of MSCs and improving the survival rate [18]. The capacity of NAC to protect the cells *in vitro* and the injured tissues *in vivo* could be related to its direct and indirect antioxidant properties [19,20]. The indirect antioxidant effect is explained by its role as a precursor in the synthesis of the native antioxidant, glutathione (GSH), which is a thiol-containing tripeptide that plays a key role in maintaining cellular redox homeostasis because of its high concentration [21,22]. GSH, synthesized in the cytosol, is transported to the cellular compartments including mitochondria, nucleus, and endoplasmic reticulum (ER), where redox buffering is needed for organelle-specific functions [23].

Here, human adipose-derived MSCs (ADMSCs) were cultured under respiratory chain deficiency, and the potential capacity of NAC to protect the cells was studied.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

N-Acetyl-L-cysteine (NAC; A9165), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), antimycin A, dimethyl sulfoxide (DMSO), and isopropanol (563935) were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC (Saint-Louis, MO, USA). 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA), Phalloidin BODIPY(B-607) SYBER green (ABI biosystem, 4472908) and RIPA buffer were purchased from Thermo Fisher Scientific (Eugene, OR, USA). Cell culture reagents were all purchased from GIBCO (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). Antibodies Nrf2 (sc-365949), SOD2 (sc-137254), VEGF (sc-7269), Casp3 (sc-7272), and B-actin (sc-47778) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Bergheimer Str. 89-2 69115 Heidelberg, Germany).

### 2.2. Adipose-derived mesenchymal stem cells

MSCs were isolated from the adipose tissue according to the published protocols [24]. To this end, the cells were aspirated during liposuction from the visceral fat of an overweight 37-year old woman. All related ethical issues were considered in performing the liposuction and the informed consent was obtained from the patient for using her adipose tissue. After characterization with cell surface CD markers and detecting the potential of differentiation to adipocytes and osteoblasts, the cells were cultured in DMEM-F12 low glucose medium which was supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 1% penicillin-streptomycin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3. Cytotoxicity of AMA and protective potentiality of NAC

The MTT assay was used to assess the cell viability [25]. The cells were seeded ( $1 \times 10^4$  cells/well) in a 96-well plate and treated with AMA in the concentrations of 5, 10, 20, 40, and 80  $\mu$ M during 24 and 48 h. After incubation, 200  $\mu$ L MTT solution (0.5 mg/mL) was added to each well and incubated at 37 °C for 4 h after discarding the supernatant, the formazan crystals were dissolved using 200  $\mu$ L Sorenson's buffer (0.1 M glycine, 0.1 M sodium chloride, pH = 10.5). The absorbance of the samples was recorded at 570 nm on a microplate reader (Bio TEK microplate readers, Winooski, USA) and the IC50 was determined.

The MTT assay was repeated to analyze the protective potentiality of NAC against AMA IC50. The cells were seeded at the density of  $10^4$  cells/well in 96-well cell culture plates for 24 h. Then the cells were pretreated with different concentrations of NAC including 1, 2, 4, 8, 14 mM for 24 h to find the optimal concentration required for scavenging the free radicals released by AMA. After 24 h, the NAC-treated cells were treated again with IC50 concentration of AMA at 48 h.

### 2.4. Genotoxicity of AMA and geno-protective potentiality of NAC

The MSCs were pretreated with NAC (8 mM) for 24 h, and then, the IC50 concentration of AMA (40  $\mu$ M) was added for 48 h. The negative control cells were untreated ADMSCs. Various analyses were performed to address the geno-protective potentiality of NAC.

#### 2.4.1. DAPI/phalloidin staining

To fix the MSCs, 4% formaldehyde was added to the cells for 10 min. Then, the cells were washed 3 times with Phosphate Buffer Saline (PBS) solution (pH = 7.4). Afterward, the cells were permeated with Triton X-100 (0.1% w/v) for 5 min, washed again with  $1 \times$  PBS solution, and stained with 5  $\mu$ M solution of phalloidin for 45 min. Then DAPI (200 ng/mL) solution was added for 5 min. After washing, the staining was studied by Cytation™ 5 cell imaging instrument (BioTek, Winooski, USA).

#### 2.4.2. DNA ladder assay

DNA ladder assay was performed according to the literature [26] to determine the DNA single and double strand breaks in the damaged cells under oxidative stress and the inhibitory potential of NAC.

#### 2.4.3. Annexin V/propidium iodide apoptosis assay

To assess the apoptosis, the MSCs were cultured in DMEM-F12 Low glucose medium complemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 1% antibiotics (penicillin-streptomycin), and pretreated with 8 mM NAC at 37 °C and under 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Then the cells were treated with AMA (40  $\mu$ M) for further 48 h. Apoptotic populations of cells were detected using a fluorescein isothiocyanate- (FITC-) annexin V apoptosis detection kit (BD Pharmingen, San Diego, CA) and flow cytometry according to the manufacturer's instructions.

### 2.5. DCFH-DA assay for measurement of intracellular free radicals

To measure the free radicals within the cells, they were pre-treated with NAC (8 mM) for 24 h, then the medium was changed and AMA was added for 12-h treatment (IC50 concentration). To quantify the intracellular ROS, dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA, 10  $\mu$ M) was added at 37 °C for 1 h. The MSCs were detached and washed (PBS, 3x), then the fluorescence was recorded using a BD flow cytometry at excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively. For the complementary test, another sample of cells was monitored using Cytation™ 5 cell imaging instrument (BioTek, Winooski, USA).

### 2.6. Assessment of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ m)

The effect of AMA/NAC on the mitochondrial membrane potential

( $\Delta\psi_m$ ) was measured using rhodamine-123 (Rh-123). Rh-123 is a lipophilic cationic fluorescent dye that selectively enters mitochondria with an intact membrane potential, and is retained/accumulated in metabolically active mitochondria. The cells were pre-treated and treated with NAC (8 mM) and AMA (40  $\mu$ M) for 24 and 12 h, respectively. The cells were then washed with PBS (pH 7.4) and incubated with 5  $\mu$ g/mL Rh-123 at 37 °C for 15 min. Finally, they were washed with PBS and image was captured by Cytation™ 5 cell imaging instrument (Bio-Tek, Winooski, USA).

### 2.7. Redox signaling and mitohormesis under AMA/NAC interplay

We studied the involved molecular mechanisms when the MSCs were under the respiratory chain deficiency and under the eventual protective effects of the intracellular native antioxidant enzymes and NAC. In this respect, the total RNA was extracted using the Trizol reagent from the treated and untreated MSCs. Then, the complementary DNA (cDNA) was synthesized according to the literature [27]. Real-time PCR reactions were performed for four major transcription factors including Nrf2 and downstream antioxidant enzymes, namely RAD54L as the regulator of DNA damage repair, HIF1-A (downstream gene for hypoxia-induced resistance and secretome), and mitochondrial sirtuin3 (SIRT3) as a gene transcription regulator. In real time PCR, the expression fold change was analyzed based on the PCR cycle number (Ct). 18S rRNA was used for the normalization of data as the endogenous control. Relative quantification of gene expression was represented according to the Pfaffl et al. method [28]. Each reaction was performed in triplicate.

### 2.8. Western blot analysis

Protein was extracted using radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer). Then, the SDS PAGE electrophoresis and Western blotting were performed according to a reported protocol [29]. The primary antibodies for membrane staining included: Nrf2 (sc-365949), SOD2 (sc-137254), VEGF (sc-7269), Casp3 (sc-7272), and B-actin (sc-47778) before being incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000). Finally, Pierce™ ECL Western blotting chemiluminescent reagent was used for the detection of protein bands.

### 2.9. Molecular docking and protein/ligand retrieval

To predict other possible interactions and mechanisms involved in the cell behavior under respiratory chain deficiency induced by AMA, the 3D experimental structure of the primarily-studied transcription factors including HIF1, Nrf2, and Sirt3, as well as Cytc as the positive control were retrieved from the RCSB in protein data bank (PDB) format [30]. The structure of crystal water molecules, default ligands, and hetero atoms were removed from the target proteins [31].

The molecular docking study was carried out using the *AutoDock Vina* virtual screening tool [32]. To visualize the protein–ligand interactions, the BIOVIA Discovery Studio Visualizer v19.1.0.18287 (BIOVIA) was employed [33].

### 2.10. Statistical analysis

All data represented at least three independent experiments, expressing mean values and standard deviations (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was conducted, followed by Dunnett's test, between the control cells and each treated group, and Tukey–Kramer *post hoc* test was employed for possible contrast among the groups. The values of \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Cytotoxicity of AMA and protective effect of NAC

In all studies in which the cells were co-treated with AMA and NAC, a NAC pre-treatment was conducted for 24 h before the AMA treatment. The cells treated with AMA (40  $\mu$ M) showed 50% cell viability at 48 h (Fig. 1a). Once pre-treated with NAC (8 mM, 24 h), the AMA (IC50)-treated MSCs were protected, showing over 77% viability (Fig. 1b). The microscopic monitoring (data not shown) showed that the 5, 10, 20, 40, and 80  $\mu$ M concentrations of AMA at 24 h did not affect the morphology of the cells, as well as not inducing the apoptosis on the seeded cells; however, the cell-cell junctions were disrupted and the proliferation was stopped. After 48 h, the morphological changes in the cells and apoptosis were observed (data not shown).

### 3.2. Protective effect of NAC against geno/cyto toxicity of AMA

#### 3.2.1. DAPI/phalloidin staining and DNA ladder assay

These staining techniques are applied for the assessment of genomic DNA fragmentation or DNA damage as a marker of exposure to a genotoxic agent (i.e., AMA). In addition, these techniques were used to evaluate the geno-protective capacities of NAC. The results show in Fig. 2.

#### 3.2.2. Detection of population of apoptotic cells

The population of apoptotic cells was studied using a fluorescein isothiocyanate (FITC) annexin V apoptosis detection kit. When the MSCs were exposed to AMA (40  $\mu$ M) during 48 h, the frequency of apoptotic cells was reported 73% as compared to the control cells at 48-h time point. However, when the cells were pretreated with NAC (8 mM) before AMA treatment, the frequency of the apoptotic cells was markedly decreased to approximately 37% (Fig. 3 a-c). Images of phalloidin cytoskeletal staining showed the morphology of cells under each treatment condition.

### 3.3. Induction of oxidative stress by AMA treatment

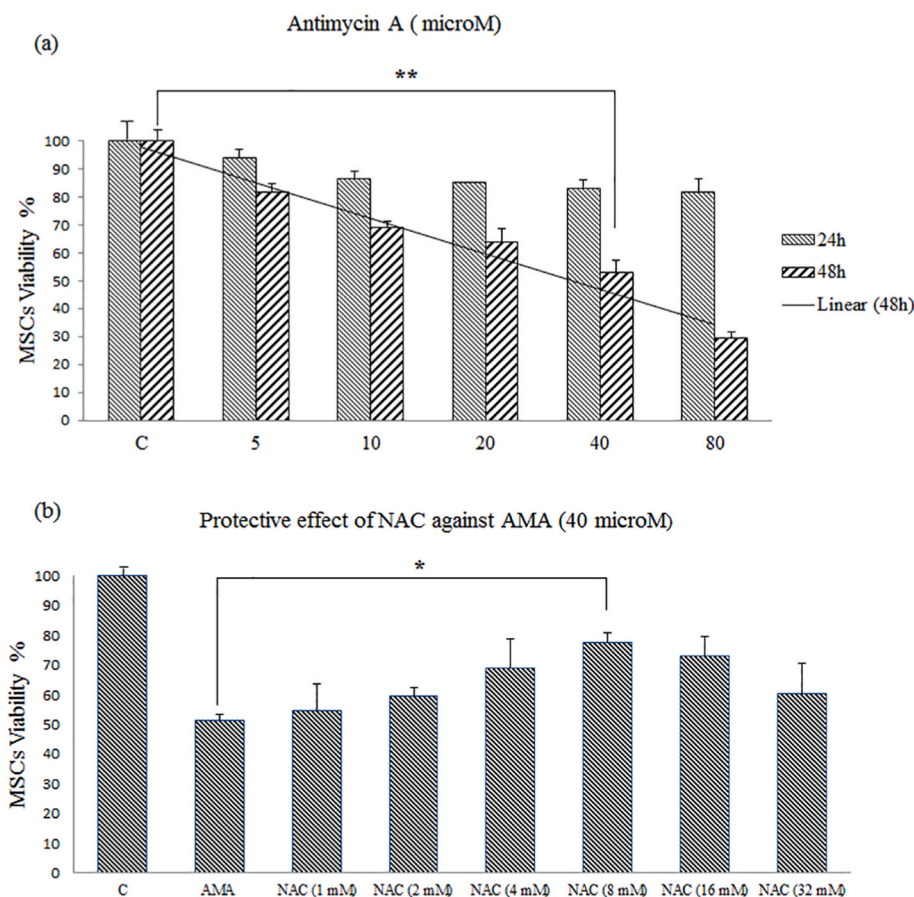
With the aim of investigating the ROS level changes in human MSCs after stress induction by AMA, we used a sensitive probe to detect ROS production and to evaluate changes in cellular ROS levels (Fig. 4-f). The MSCs were pretreated with NAC for 24 h, then ROS generation was measured at 12 h after AMA treatment. The fluorescent microscopic monitoring (Fig. 4 a-c) showed low intensity of ROS in NAC/AMA-treated MSCs compared to the cells only treated with AMA.

In a complementary study, the fluorescent emission was recorded by flow cytometry. The cell fluorescence distribution (expressed as percent of total events) of AMA-treated MSCs revealed the induction of intracellular ROS generation compared to the control MSCs (Fig. 4-e). Pre-treatment with NAC reduced intracytoplasmic ROS (Fig. 4-e) as shown in the flow cytometry analysis.

### 3.4. Measurement of mitochondrial membrane potential

The untreated MSCs showed high fluorescence, indicating polarized mitochondrial membrane (Fig. 5). The AMA-treated cells that blocked Cytochrome C, showed the disruption of H pumps, and a decrease of fluorescence intensity. The notable results were that although NAC decreased the ROS level induced by AMA (Fig. 4-d), it had no effect on mitochondrial polarization, and the cells treated with NAC/AMA showed low fluorescence, indicating non-polarized mitochondrial membrane.





**Fig. 1.** The cytotoxicity of AMA and protective effect of NAC determined by MTT assay. (a); The cells were treated with 5, 10, 20, 40, and 80 microM of AMA. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was observed at 40 microM of AMA. (b) The protective effect of NAC was observed at 8 mM against IC<sub>50</sub> of AMA. Data show the mean values  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. Statistical significance; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

### 3.5. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and redox signaling in AMA/NAC crosstalk

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a transcription factor that binds to the antioxidant response elements (ARE) in the promoter regions of target antioxidant genes, and is mainly required for the coordinated up-regulation of genes in response to oxidative stress [34]. Fig. 6-a displays the increased level of Nrf2 as part of cells' defense response in the AMA-induced oxidative stress. It was expected that Nrf2 will be downregulated slightly by NAC co-treatment, which might have a scavenging impact on intracellular ROS induced by AMA, however it was surprisingly observed that NAC directly affected the cell signaling and had a synergetic effect on Nrf2 expression in normal conditions. The downstream antioxidants including Catalase, NQO1, and SOD2 were upregulated in AMA-treated conditions (Fig. 6-a) but alleviated via NAC treatment (Fig. 6-b).

Excessive oxidative stress is known to induce apoptosis through several signaling pathways. PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways [35]. In addition, apoptosis regulator BAX; accelerates programmed cell death by binding to and antagonizing the apoptosis repressor BCL2 protein. Under stress conditions, BAX undergoes a conformation change that causes its translocation to the mitochondrial membrane, leading to the release of cytochrome C that then promotes the activation of CASP3, thereby triggering apoptosis [36]. The anti-apoptotic potentiality of NAC under oxidative stress was determined via suppression of the apoptotic inducer PTEN, as well as pro-apoptotic genes including BAX and Casp3.

### 3.6. Cellular energy metabolism regulation via Sirt3 and mTOR

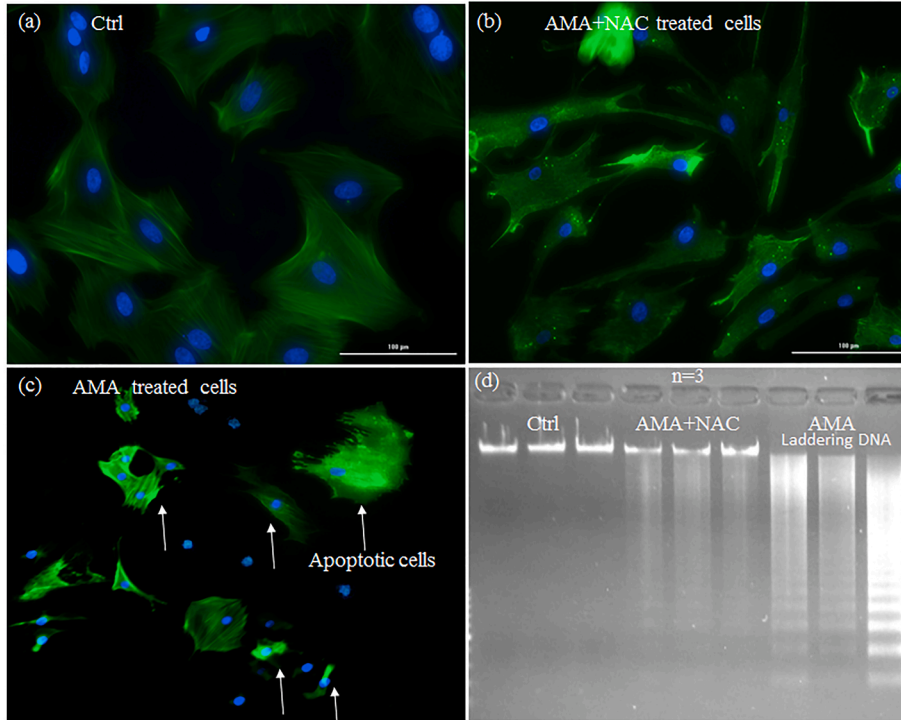
Mitochondrial target proteins are activated by mitochondrial NAD-dependent protein deacetylase through deacetylating the key lysine residues. These target proteins are ACS1, IDH, GDH, SOD2, PDHA1, LCAD, and SDHA, and the ATP synthase subunit ATP5O which mediates the regulation of the cellular energy metabolism [37]. Another vital protein in this interaction is mTOR, a serine/threonine protein kinase, which mainly regulates the cellular metabolism, growth, and survival in response to nutrients, energy, and stress signals. Moreover, mTOR is directly or indirectly involved in the regulation of phosphorylation of at least 800 proteins which are involved in the proliferation, differentiation, and bio-function of stem cells [38]. As Fig. 7-a shows mTOR and Sirt3 were both upregulated by the AMA treatment.

### 3.7. DNA damage and DNA repair pathway

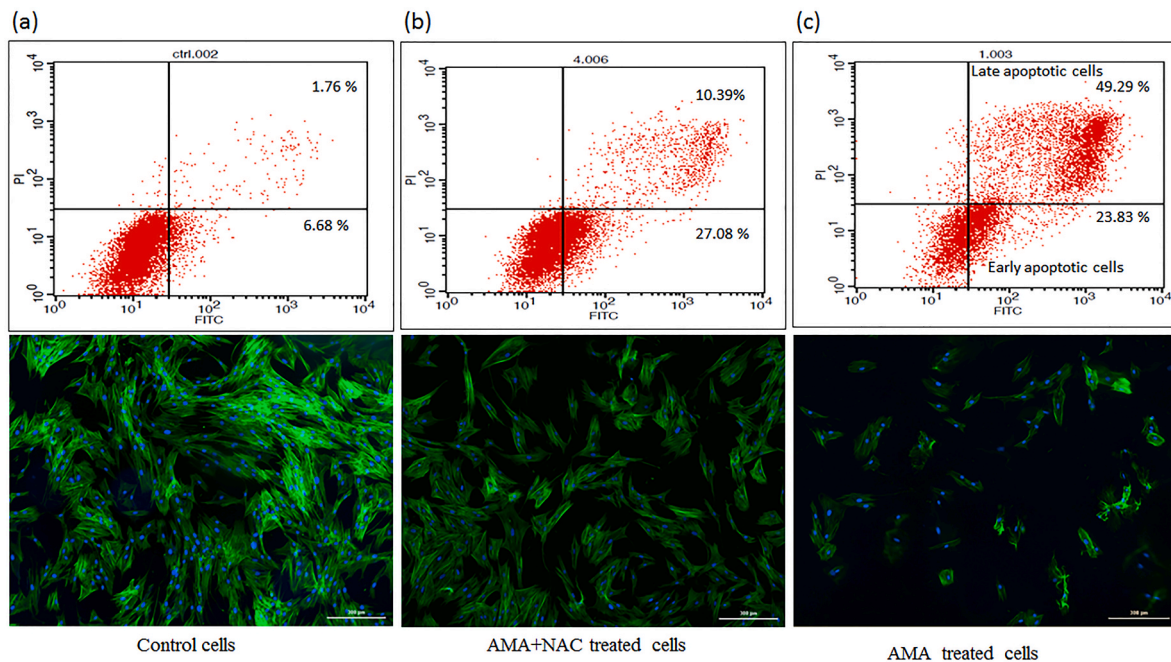
The leading role of RAD54L, the known protein involved in the homologous recombination and repair of DNA, has been verified in the repair of DNA double-strand breaks under oxidative stress [39]. As Fig. 7-b shows AMA induced the expression of RAD54L and it could be concluded that AMA induces DNA damage. The binding of this protein to double-stranded DNA induces a DNA topological change, which is believed to facilitate homologous DNA pairing.

### 3.8. The role of oxidative stress and disruption of energy metabolism in MSCs secretome

Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1- $\alpha$ ) acts as a major



**Fig. 2.** Analysis of the nucleus and cytoplasmic F-actin integrity. Panels a, b, and c respectively show the DAPI/Phalloidin staining of the untreated cells, the cells co-treated with NAC/AMA, and those only treated with AMA. Panel d represents the DNA ladder assay in triplicate. The results show the protective potential of NAC against DNA and cellular damages.

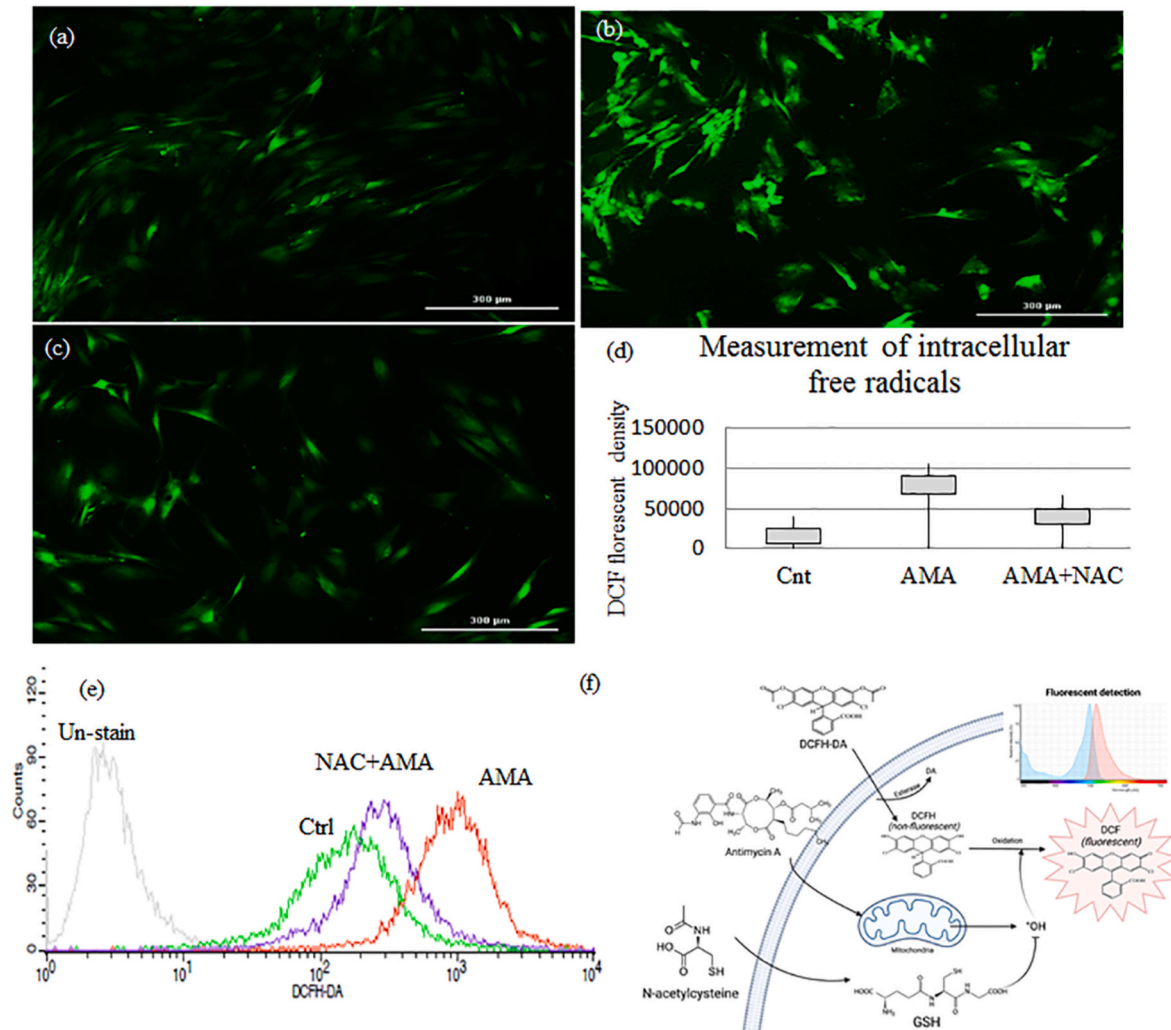


**Fig. 3.** Population of apoptotic cells detected using a fluorescein isothiocyanate- (FITC-) annexin V apoptosis detection kit. When the cells were treated with 40 microM of AMA, the frequency of apoptotic cells was reported 73% as compared to the control cells at 48-h time point. However, when the cells were co-treated with NAC (8 mM) and AMA, the frequency of the apoptotic cells was markedly decreased to approximately 37%.

transcriptional regulator of the adaptive response to hypoxia. There is evidence that this factor, under hypoxic conditions, activates the transcription of more than 40 genes including erythropoietin, glucose transporters, glycolytic enzymes, vascular endothelial growth factor (VEGF), and some other genes whose protein products either increase oxygen delivery or facilitate metabolic adaptation to hypoxia [40].

VEGF is a growth factor which is active in angiogenesis, and is one of the vital downstream genes of HIF1- $\alpha$ . The MSCs secretome importantly affects the cell therapy outcome in damaged tissues [41] and as our results showed, NAC could upregulate VEGF in both normal and AMA-treated cells (Fig. 7-c). Therefore, pretreatment of the MSCs with NAC would protect the transplanted stem cells in hypoxic conditions and





**Fig. 4.** Intracellular ROS detection in AMA/NAC treated cells. Panel (a) represents the fluorescence intensity of untreated control MSCs; panel (b) represents the cells co-treated with AMA and NAC; and panel (c) represents the cells treated with AMA. Panel (d) shows the semi-quantitative image analysis for the generation of intracellular ROS; panel (e) shows the photomicrographs of intracellular ROS generation in MSCs induced by AMA and stained with DCFH-DA; and panel (f) represents the mechanism of intracellular ROS detection by DCFH probe.

enhance the secretome for the repair of tissues.

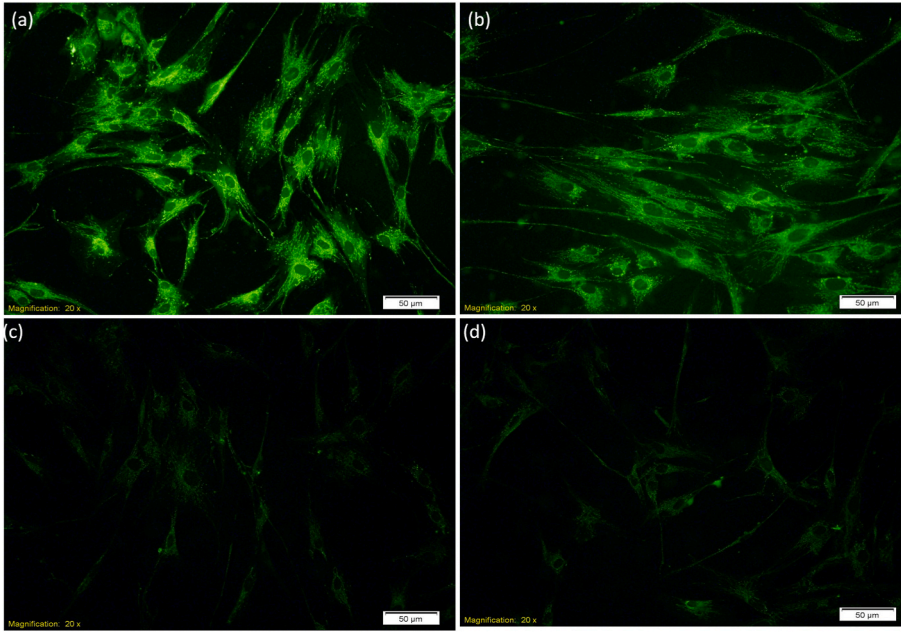
### 3.9. Molecular docking analysis

To screen the binding possibilities of the ligands AMA and NAC to the studied proteins, we used the *AutoDock Vina*, an open-source program for molecular docking [42]. The best binding possibility was identified based on the lowest binding energy (kcal/mol) necessary for the interaction. The X-ray crystal structure of the three human target proteins viz Nrf2, Sirt3, and HIF1- $\alpha$  was downloaded from the data bank and docking was carried out with the ligands AMA and NAC. Cytochrome *c* (CYT C) was used as the control gene. Figs. 8 and 9 illustrate the interactions of the three target proteins with AMA and NAC, respectively. It can be observed from Figures that all three proteins have strong interactions with AMA through building several hydrogen, van der Waals, pi-alkyl, and pi-pi T shaped bonds, while the interaction between the three target proteins and NAC is limited to the hydrogen bonds. The docking scores (Table 1) represent the binding energy calculated for each protein-ligand interaction based on the docking results expressed in kcal/mol. The lower energy illustrates high binding affinity. From the table, it is revealed that all the proteins dock with AMA with higher affinity compared to NAC in the active sites of targeted macromolecules.

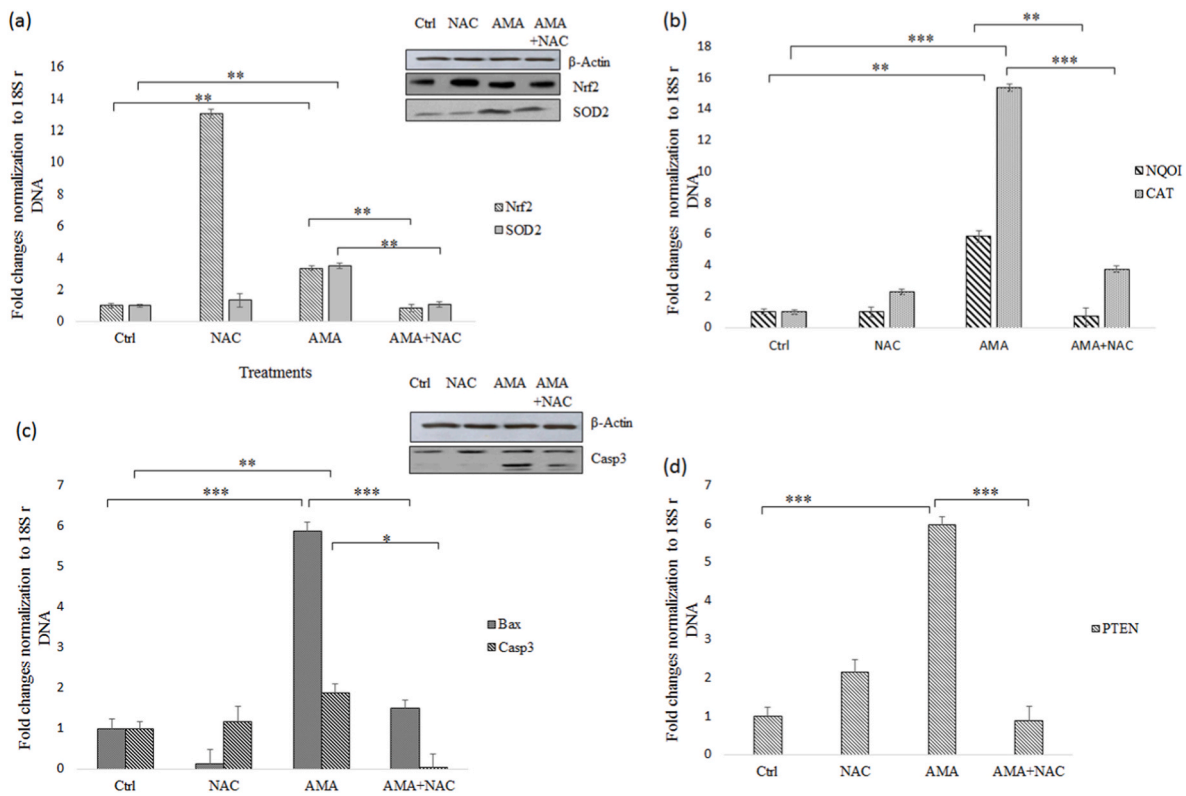
## 4. Discussion

It seems that the cell therapy of damaged tissue has not yielded the expected results. Perhaps one of the reasons has been that the hypoxic conditions in the damaged tissue influence the respiration and therapeutically the secretome [37]. Under the respiratory chain deficiency, the cells encounter two major problems including oxidative stress and energy deficit. Both of the issues could be solved by the stem cells under hard conditions to play their role in repairing [43]. To mimic hypoxia and respiratory deficiency, in this study we used AMA, an inhibitor of cellular respiration, particularly oxidative phosphorylation. AMA molecule binds to the CYT C reductase and causes the disruption of entire electron transport chain and the formation of proton gradient across the inner membrane of mitochondria [44]. This inhibition further results in the formation of toxic superoxide free radical. When the rate of superoxide production exceeds the cellular scavenging mechanisms, overwhelming the cell and cell death occurs [39].

NAC is the *N*-acetyl derivative of the amino acid L-cysteine, and is a precursor for the glutathione synthesis in the cells. Glutathione is mainly known to minimize the lipid peroxidation of cellular membranes as well as mitochondrial oxidative stress. Another essential role of glutathione relates to its impact on signal transduction and control of gene expression within cells, as well as energy metabolism [45].



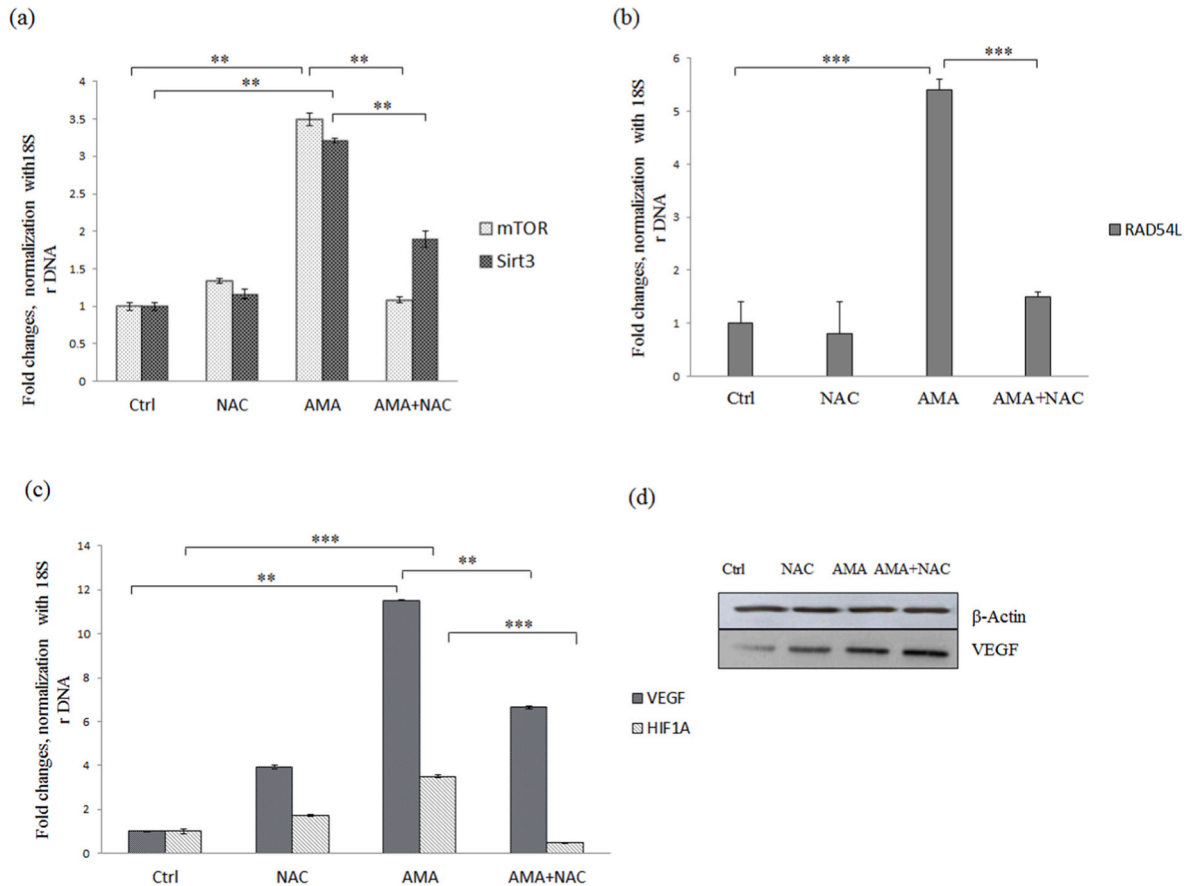
**Fig. 5.** Rhodamine 123 staining for mitochondrial membrane potential. Panel (a) represents the untreated MSCs in which high fluorescence was observed, indicating the polarized mitochondrial membrane. Panel (b) represents the cells treated with NAC in which high fluorescence was seen. It means that NAC does not have any negative affect on the mitochondrial membrane potential. Panel (c) represents the treatment of cells with NAC/AMA. In comparison with the control cells, the polarization of mitochondria was disrupted. Panel (d) represents the AMA-treated cells, in which the disruption of H pumps and the decrease of fluorescence intensity were observed.



**Fig. 6.** Functional expression of intracellular antioxidant genes and pro-apoptotic genes in the MSCs treated with AMA and NAC. (a); RNA and protein profiles of Nrf2 and SOD2 confirming the upregulation under the AMA treatment. The co-treated cells with NAC downregulates intracellular antioxidants significantly. (b); Other downstream antioxidants including Catalase, and NQO1 were upregulated in AMA-treated conditions but alleviated via NAC treatment. (c, d); The pro-apoptotic genes including PTEN, BAX, and CASP3 regulated by AMA and NAC duel. NAC suppresses oxidative stress by antioxidant potentiality and the pro-apoptotic genes under NAC co-treated with AMA are significantly downregulated. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 versus untreated control cells.

Previous studies have reported the enhancement of therapeutic efficacy of transplantation of bone marrow-derived MSCs in rats with severe acute pancreatitis through NAC pretreatment [46]. However, the mechanism of NAC protection has not been completely elucidated yet. In

the present study, NAC dramatically reduced AMA-induced mitochondrial oxidative stress, and thus effectively protected the MSCs. Over cellular studies, DAPI staining and DNA ladder assay revealed that NAC could neutralize the genotoxicity of AMA and protect the cells against



**Fig. 7.** The RNA profile of oxidative stress protective cell signaling. (a); The mRNA profile of Sirt3 and mTOR, the main proteins interplaying in cellular metabolism, growth, and survival in response to nutrients, energy, and stress signals. As the results show, NAC significantly modulates the overexpressed RNA of Sirt3 and mTOR under AMA treatment. (b); The overexpression of RAD54L gene was observed under AMA treatment and the NAC with antioxidant effect inhibited DNA damages, then RAD54L gene was downregulated. RAD54L is a protein, known to be involved in the repair of DNA. (c); The expression profile of HIF1- $\alpha$  gene and its downstream VEGF gene. Antimycin A-induced respiratory chain deficiency induced hypoxia response pathway. HIF1- $\alpha$  and its downstream gene, VEGF, was upregulated under AMA-treatment, and its upregulation was modulated under NAC-treatment due to the combat of free radicals. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001 versus untreated control cells.

apoptosis and DNA damage. As shown in Fig. 2, in the cells stained with DAPI/Phalloidin compared to the untreated cells (Fig. 2 a-c), nuclear deformation and cytoskeleton disruption were seen in the cells treated with AMA (Fig. 2 c), while pretreatment with NAC could inhibit the chromatin remodeling, DNA damage, and cytoskeleton disruption in the AMA-treated MSCs (Fig. 2b). In the DNA ladder assay (Fig. 2d), treatment of the cells with NAC protected them against DNA damage induced by ROS. Flow cytometric analysis of apoptotic cell population demonstrated that the AMA-treated cells showed 73% apoptosis compared to the control cells (~6% related with unstained cells). However, pretreatment of the cells with NAC resulted in a markedly decrease in the frequency of apoptotic cells (approximately 37%).

To study the effects of AMA and NAC on the mitochondria and redox homeostasis, we analyzed the expression of the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (NFE2L2, the so-called Nrf2), which is a basic leucine zipper (bZIP) protein. This protein can regulate the expression of antioxidant enzymes that protect the cells against oxidative stress triggered by injuries [47]. In the results, it was anticipated that NAC will be obliged to downregulate the Nrf2 gene expression significantly due to the scavenging of free radicals and high level of NAC-induced cellular GSH. Nonetheless, surprisingly we observed that in a synergistic effect with AMA, NAC could upregulate the Nrf2 gene; in result of which, the cells could fight against oxidative stress and survive. The upregulation of Nrf2 via NAC is reported in other studies as well. The mechanisms are different. One of the main reported reasons is that Nrf2 has been proven to upregulate the expression of glutathione reductase (GR) [48]. GR

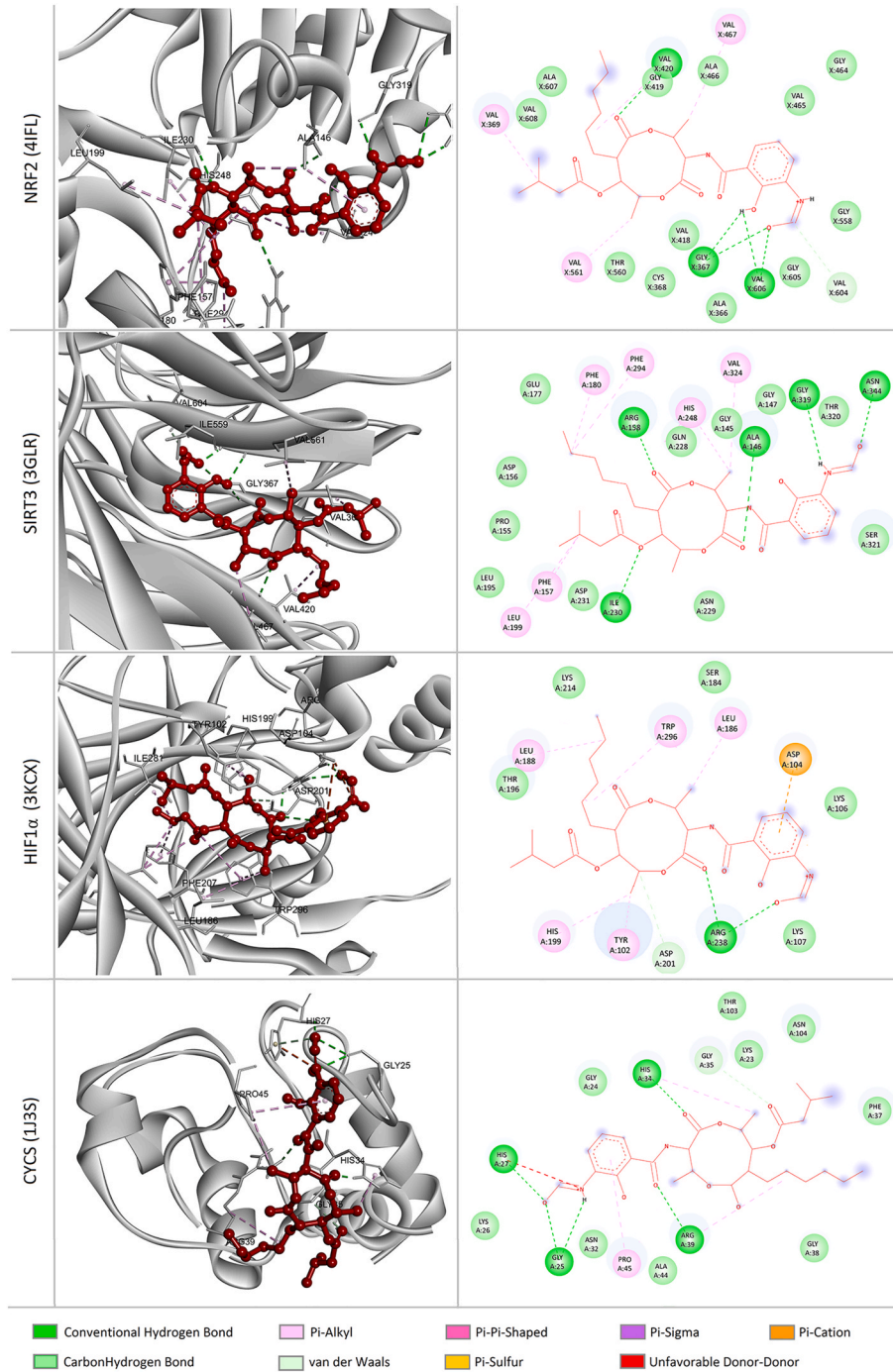
catalyzes the reduction of glutathione disulfide (GSSG) to the sulfhydryl form glutathione (GSH), which is a critical molecule in resisting oxidative stress.

Under AMA-induced stress, the elevated levels of expressions of pro-apoptotic *PTEN*, *casp3*, and *Bax* genes significantly caused the increase of apoptosis rate. Corroborating these findings, the pretreatment of the cells with NAC decreased the expression of these genes. These findings support the possible role of NAC in encouraging cell survival through activating Nrf2 and barring the mitochondria-mediated apoptosis in the MSCs.

Other cellular signaling hubs that were analyzed in this study were mTOR and Sirt3. The overexpression of Sirt3 in the AMA-treated cells increased the respiration and decreased the ROS production. Alongside its known mitochondrial function, some researchers have proposed the existence of a very small pool of active nuclear Sirt3. Based on the reports, this pool consists of the long form of Sirt3, as well as having histone deacetylase activity. Sirtuins represent a potential way to achieve this end and warrant further studies in the MSCs.

The leading role of HIF in the adaptive regulation of energy metabolism, via triggering a switch from mitochondrial oxidative phosphorylation to anaerobic glycolysis has been verified in hypoxic conditions [49]. HIF1- $\alpha$  acts as a major transcriptional regulator of the adaptive response to hypoxia. It also activates the transcription of over 40 genes under hypoxic conditions. Furthermore, HIF causes a reduction in the mitochondrial oxygen consumption through the activation of conversion of pyruvate to acetyl CoA, suppression of mitochondrial



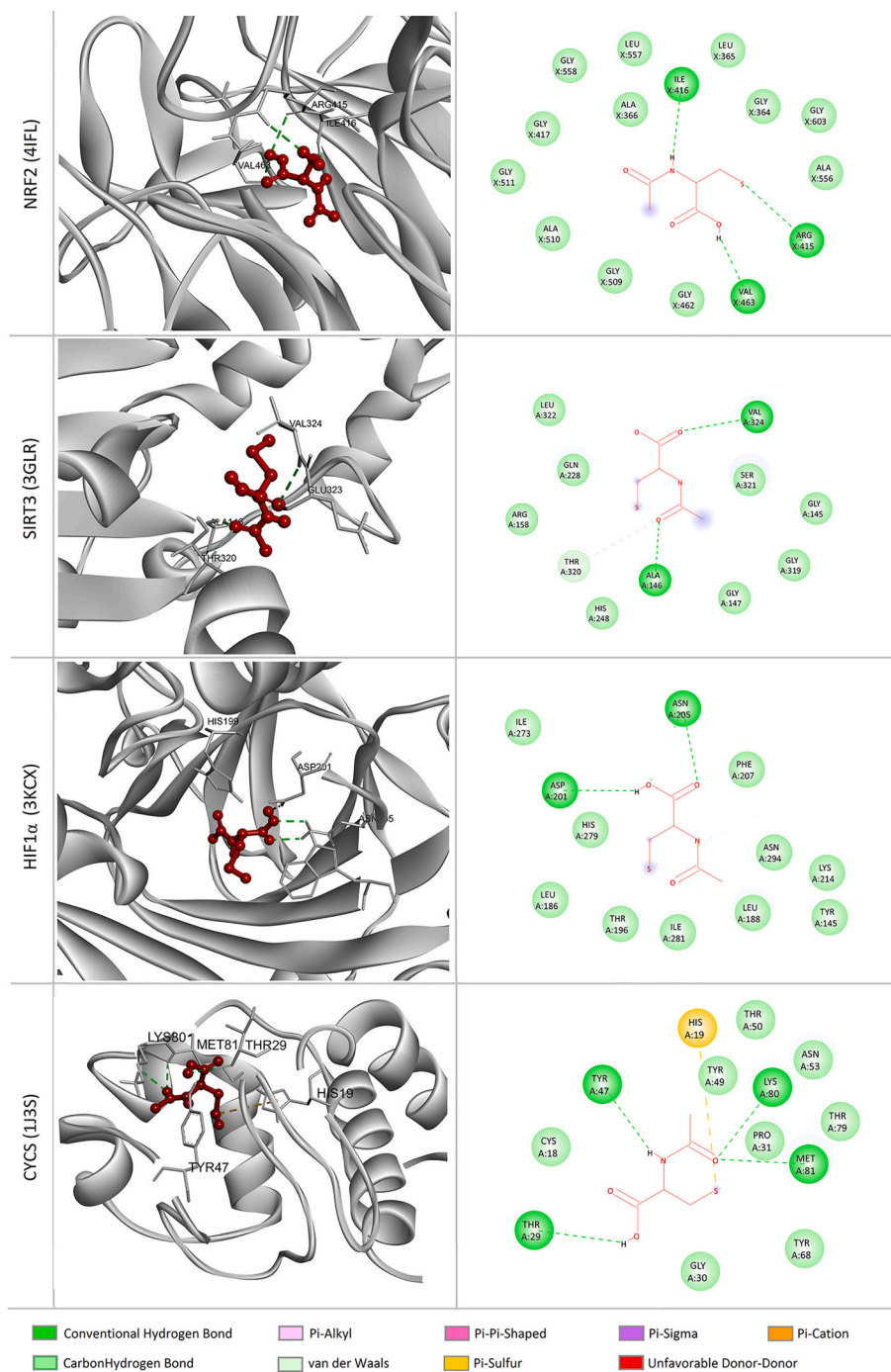


**Fig. 8.** Interactions of Nrf2 (4IFL), Sirt3 (3GLR), and HIF1- $\alpha$  (3KCX) and CYT C proteins with AMA. The 3D-structure of target proteins are shown in gray and that of AMA in red. All three structures have strong interactions with AMA via different kinds of bonds.

biogenesis, and activation of autophagy in mitochondria concomitant with a reduction in ROS production [49].

The secretome from MSCs importantly affects the cell therapy outcome. As our results showed, NAC could upregulate VEGF under both normal and oxidative stress conditions. VEGF is a growth factor that is active in angiogenesis, and is one of the vital downstream genes of HIF1- $\alpha$  [41]. The pretreatment of MSCs with NAC protected the cells in hypoxic conditions and enhanced the expression of VEGF factor. Moreover, the results of this study perhaps were affected by other mechanisms. According to the results, AMA blocked mitochondrial electron transfer chain, and led to ROS generation, thereby causing damage to mtDNA, mitochondrial membrane depolarization, and the

upregulation of pro-apoptotic genes. The prevention of such cellular oxidative damage by NAC was investigated in this study. However, the supporting potentiality of NAC was not enough. The results showed that other complex mechanisms could be involved in the crosstalk between AMA and NAC. It has been reported that NAC activates several cellular signals including activating transcription factor 4 (ATF4) [50], and Notch2 signaling [51] in exposure of xenobiotics. In addition, NAC boosts the mechanisms for detoxification of xenobiotics [52,53]. In this regard, the molecular docking analysis was investigated in this study. CYT C was used as a positive control, for the AMA interaction. AMA exhibited the lowest energy of interaction with the main transcription factors compared to that required for NAC to interact with the same



**Fig. 9.** Interactions of Nrf2 (4IFL), Sirt3 (3GLR), HIF1- $\alpha$  (3KCX), and CYT C proteins with NAC. The 3D-structure of target proteins are shown in gray and that of NAC in red. All three structures have interactions with NAC through hydrogen bonds.

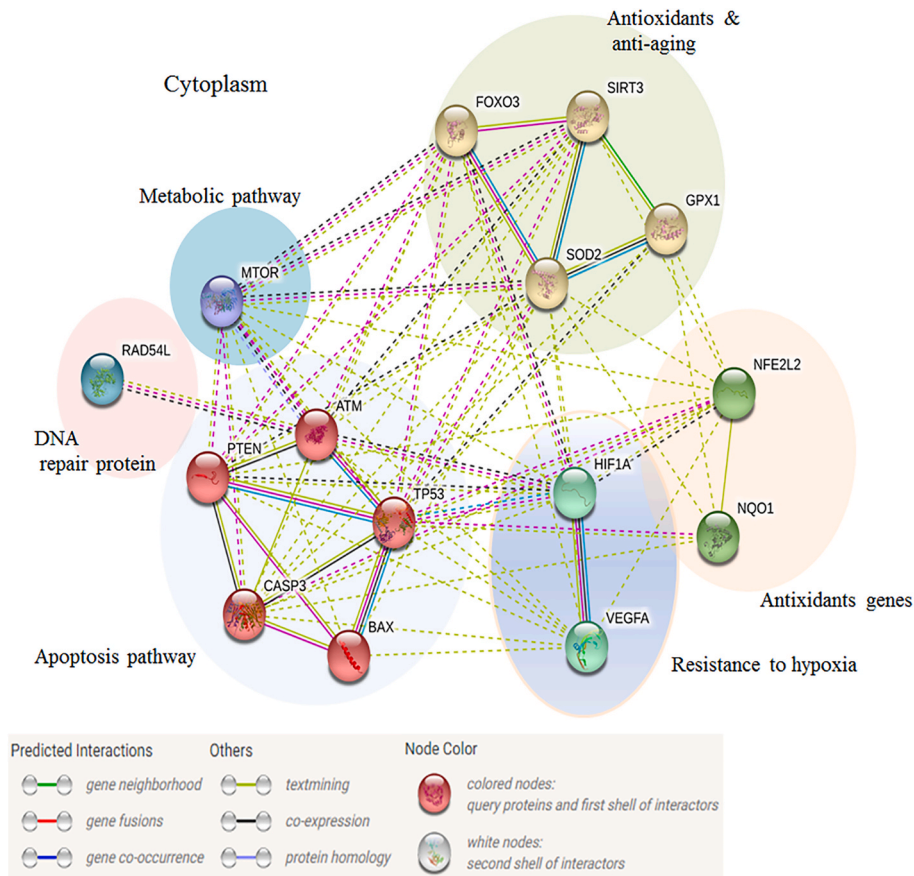
**Table 1**

The binding energy (expressed in kcal/mol) of selected proteins with AMA and NAC. All three proteins dock with AMA with higher affinity compared to NAC.

Gene name	Binding energy Docking Scores (kcal/mol)	
	Antimycin A (AMA)	<i>N</i> -acetyl cysteine (NAC)
<i>SIRT3</i> (3GLR)	-9.1	-4.5
<i>HIF1<math>\alpha</math></i> (3KCX)	-8.2	-4.6
<i>NRF2</i> (4IFL)	-8.0	-5.0
<i>CYT C</i>	-6.5	-4.9

molecules. However, under oxidative stress conditions, the two bonds could be affected if both are placed sterically in neighbouring areas. Further studies should evaluate in-silico the competition of the two molecules (NAC and AMA) and the influence on the biochemical reactions and the biological activities of these molecules.

Furthermore, protein-protein interactions (PPIs) were analyzed in this study using the STRING Database v. 10.5 (<http://www.string-db.org>) (Fig. 10), which consists of the direct and indirect protein associations with redox balance and energy metabolism, collected from different databases. Protein interaction networks were predicted using the medium confidence scores (0.40) and clustered using the MCL clustering algorithm (inflation parameter: 5).



**Fig. 10.** The protein-protein interactions (PPIs) were analyzed using the STRING Database v. 10.5 (<http://www.string-db.org>), which consists of the direct and indirect protein associations with redox balance and energy metabolism, collected from different databases. Protein interaction networks were predicted using the medium confidence scores (0.40) and clustered using the MCL clustering algorithm (inflation parameter: 5) (<https://string-db.org/>). Four transcription factors were involved in this crosstalk: (i); Nrf2; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; The transcription activator that binds to the antioxidant response elements (ARE) in the promoter regions of target genes. Nrf2 is highly required for the coordinated upregulation of genes in response to oxidative stress. (ii); Hypoxia-inducible factor 1-alpha (Hif1- $\alpha$ ) functions as a major transcriptional regulator of the adaptive response to hypoxia. There is evidence that this factor, under hypoxic conditions, activates the transcription of more than 40 genes, including erythropoietin, glucose transporters, glycolytic enzymes, VEGF, and some other genes whose protein products either increase oxygen delivery or facilitate metabolic adaptation to hypoxia. (iii); RAD54L; DNA repair and recombination protein. (iv); RAD54-like; Involved in DNA repair and mitotic recombination.

## 5. Conclusion

In summary, the present study provided evidence for the possible role that NAC plays in the protection of MSCs in hypoxic conditions, and respiratory chain deficiency induced by AMA. Our results showed that antioxidants may only affect the cells via directly scavenging the free radicals and indirectly reducing the oxidative stress via modulation of redox signaling, however energy metabolism remains unresolved and we need other strategies to enhance the energy metabolism in hypoxic conditions as well. These results provide new insights into the designing a new strategy to protect the cells not only from hypoxia-induced damages and oxidative stress, but also to enhance the energy metabolism.

## Authorship statement

**Abolfazl Barzegari:** Methodology, Writing- Original draft preparation. **Yadollah Omid:** Conceptualization. **Rebecca Landon:** Methodology. **Virginie Gueguen:** Data curation. **Sepideh Parvizpour:** Software. **Anne Meddahi-Pellé:** Visualization, Investigation. **Fani Anagnostou:** Validation, Project administration. **Graciela Pavon-Djavid:** Supervision, Review and Editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgment

The authors express their gratitude to Roghayeh Ilghami for

language editing of the paper.

## References

- [1] A. Barzegari, Y. Omid, V. Gueguen, A. Meddahi-Pellé, D. Letourneur, G. Pavon-Djavid, Nesting and Fate of Transplanted Stem Cells in Hypoxic/ischemic Injured Tissues: the Role of HIF1 $\alpha$ /sirtuins and Downstream Molecular Interactions, *BioFactors*, n/a.
- [2] R. Shmulevich, V. Krizhanovsky, Cell senescence, DNA damage, and metabolism, *Antioxidants Redox Signal.* 34 (2021) 324–334.
- [3] M. Dambrova, C.J. Zuurbier, V. Borutaite, E. Liepinsh, M. Makrecka-Kuka, Energy substrate metabolism and mitochondrial oxidative stress in cardiac ischemia/reperfusion injury, *Free Radic. Biol. Med.* 165 (2021) 24–37.
- [4] X. Wang, K. Shen, J. Wang, K. Liu, G. Wu, Y. Li, L. Luo, Z. Zheng, D. Hu, Hypoxic preconditioning combined with curcumin promotes cell survival and mitochondrial quality of bone marrow mesenchymal stem cells, and accelerates cutaneous wound healing via PGC-1 $\alpha$ /SIRT3/HIF-1 $\alpha$  signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 159 (2020) 164–176.
- [5] N. Ishiuchi, A. Nakashima, S. Doi, K. Yoshida, S. Maeda, R. Kanai, Y. Yamada, T. Ike, T. Doi, Y. Kato, Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats, *Stem Cell Res. Ther.* 11 (2020) 1–15.
- [6] L. Ren, X. Chen, X. Chen, J. Li, B. Cheng, J. Xia, Mitochondrial dynamics: fission and fusion in fate determination of mesenchymal stem cells, *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2020).
- [7] E.M. Jeong, J.-H. Yoon, J. Lim, J.-W. Shin, A.Y. Cho, J. Heo, K.B. Lee, J.-H. Lee, W. J. Lee, H.-J. Kim, Real-time monitoring of glutathione in living cells reveals that high glutathione levels are required to maintain stem cell function, *Stem Cell Rep.* 10 (2018) 600–614.
- [8] C.L. Bigarella, R. Liang, S. Ghaffari, Stem cells and the impact of ROS signaling, *Development* 141 (2014) 4206–4218.
- [9] R.-Z. Shi, Q.-P. Li, Improving outcome of transplanted mesenchymal stem cells for ischemic heart disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376 (2008) 247–250.
- [10] C. Mias, E. Trouche, M.H. Seguelas, F. Calcagno, F. Dignat-George, F. Sabatier, M. D. Piercecchi-Marti, L. Daniel, P. Bianchi, D. Calise, Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney, *Stem Cell.* 26 (2008) 1749–1757.
- [11] W. Zhang, X. Su, Y. Gao, B. Sun, Y. Yu, X. Wang, F. Zhang, Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis in vitro, *Biol. Pharm. Bull.* 32 (2009) 1335–1342.



- [12] S. Shaban, M.W.A. El-Husseny, A.I. Abushouk, A.M.A. Salem, M. Mamdouh, M. M. Abdel-Daim, Effects of antioxidant supplements on the survival and differentiation of stem cells, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2017), 5032102, 2017.
- [13] M. Panahi, B. Rahimi, G. Rahimi, T. Yew Low, N. Saraygord-Afshari, E. Alizadeh, Cytoprotective effects of antioxidant supplementation on mesenchymal stem cell therapy, *J. Cell. Physiol.* 235 (2020) 6462–6495.
- [14] R. Ashfaq, A. Mehmood, A. Ramzan, I. Hussain, M.N. Tarar, S. Riazuddin, Antioxidant pretreatment enhances umbilical cord derived stem cells survival in response to thermal stress in vitro, *Regen. Med.* 15 (2020) 1441–1453.
- [15] R. Stavely, K. Nurgali, The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy, *Stem Cells Trans Med.* 9 (2020) 985–1006.
- [16] M. Mohammadzadeh, R. Halabian, A. Gharehbaghian, N. Amirzadeh, A. Jahanian-Najafabadi, A.M. Roushdeh, M.H. Roudkenar, Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity, *Cell Stress Chaperones* 17 (2012) 553–565.
- [17] S. Dodd, O. Dean, D.L. Copolov, G.S. Malhi, M. Berk, N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility, *Expert Opin. Biol. Ther.* 8 (2008) 1955–1962.
- [18] Q. Wang, C. Shen, H. Zhu, W.-G. Zhou, X.-C. Guo, M.-J. Wu, Z.-Y. Xu, J.-f. Jiang, H.-Q. Liu, N-acetylcysteine-pretreated human embryonic mesenchymal stem cell administration protects against bleomycin-induced lung injury, *Am. J. Med. Sci.* 346 (2013) 113–122.
- [19] P. Dekhuijzen, Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease, *Eur. Respir. J.* 23 (2004) 629–636.
- [20] O.I. Aruoma, B. Halliwell, B.M. Hoey, J. Butler, The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid, *Free Radic. Biol. Med.* 6 (1989) 593–597.
- [21] R. Ilghami, A. Barzegari, M.R. Mashayekhi, D. Letourneur, M. Crepin, G. Pavon-Djavid, The conundrum of dietary antioxidants in cancer chemotherapy, *Nutr. Rev.* 78 (2020) 65–76.
- [22] Y. Samuni, S. Goldstein, O.M. Dean, M. Berk, The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1830 (2013) 4117–4129.
- [23] R. Ruffmann, A. Wendel, GSH rescue by N-acetylcysteine, *Klin. Wochenschr.* 69 (1991) 857–862.
- [24] N. Al-Jezani, R. Cho, A.O. Masson, B. Lenehan, R. Krawetz, F.G. Lyons, Isolation and characterization of an adult stem cell population from human epidural fat, *Stem Cell. Int.* (2019) 2019.
- [25] J. Van Meerloo, G.J. Kaspers, J. Cloos, Cell Sensitivity Assays: the MTT Assay, in: *Cancer cell culture*, Springer, 2011, pp. 237–245.
- [26] Y.R. Saadat, N. Saeidi, S.Z. Vahed, A. Barzegari, J. Barar, An update to DNA ladder assay for apoptosis detection, *BioImpacts: BI* 5 (2015) 25.
- [27] V. Rodriguez-Ruiz, A. Barzegari, M. Zuluaga, S. Zunooni-Vahed, Y. Rahbar-Saadat, D. Letourneur, V. Gueguen, G. Pavon-Djavid, Potential of aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) in blocking the oxidative stress by modulation of signal transduction in human vascular endothelial cells, *J. Funct. Foods* 26 (2016) 123–134.
- [28] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45–e45.
- [29] C. Haan, I. Behrmann, A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background, *J. Immunol. Methods* 318 (2007) 11–19.
- [30] K. Stierand, M. Rarey, Drawing the PDB: protein-ligand complexes in two dimensions, *ACS Med. Chem. Lett.* 1 (2010) 540–545.
- [31] S. Kim, P.A. Thiessen, E.E. Bolton, J. Chen, G. Fu, A. Gindulyte, L. Han, J. He, S. He, B.A. Shoemaker, J. Wang, B. Yu, J. Zhang, S.H. Bryant, PubChem substance and compound databases, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D1202–D1213.
- [32] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina, Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455–461.
- [33] F. Ahammad, T.R. Tengku Abd Rashid, M. Mohamed, S. Tanbin, F.A. Ahmad Fuad, Contemporary strategies and current trends in designing antiviral drugs against dengue fever via targeting host-based approaches, *Microorganisms* 7 (2019).
- [34] H. Zhang, K.J. Davies, H.J. Forman, Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging, *Free Radic. Biol. Med.* 88 (2015) 314–336.
- [35] L.-P. Weng, J.L. Brown, C. Eng, PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and-independent pathways, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 237–242.
- [36] K.G. Wolter, Y.-T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.-G. Xi, R.J. Youle, Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis, *JCB (J. Cell Biol.)* 139 (1997) 1281–1292.
- [37] A.E. Dikalova, H.A. Itani, R.R. Nazarewicz, W.G. McMaster, C.R. Flynn, R. Uzhachenko, J.P. Fessel, J.L. Gamboa, D.G. Harrison, S.I. Dikalov, Sirt3 impairment and SOD2 hyperacetylation in vascular oxidative stress and hypertension, *Circ. Res.* 121 (2017) 564–574.
- [38] D. Zhao, J. Yang, L. Yang, Insights for oxidative stress and mTOR signaling in myocardial ischemia/reperfusion injury under diabetes, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2017) 2017.
- [39] P. Selemenakis, D. Maranon, C. Wiese, Synergism between RAD51AP1 and RAD54 during Late Stages of Homologous Recombination DNA Repair, *AAO, 2019.*
- [40] S. Palomäki, M. Pietilä, S. Laitinen, J. Pesälä, R. Sormunen, P. Lehenkari, P. Koivunen, HIF-1 $\alpha$  is upregulated in human mesenchymal stem cells, *Stem Cell.* 31 (2013) 1902–1909.
- [41] D. Zisa, A. Shabbir, G. Suzuki, T. Lee, Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (2009) 834–838.
- [42] D. Seeliger, B.L. de Groot, Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 24 (2010) 417–422.
- [43] A. Tappel, Inhibition of electron transport by antimycin A, alkyl hydroxy naphthoquinones and metal coordination compounds, *Biochem. Pharmacol.* 3 (1960) 289–296.
- [44] N. Dairaku, K. Kato, K. Honda, T. Koike, K. Iijima, A. Imatani, H. Sekine, S. Ohara, H. Matsui, T. Shimosegawa, Oligomycin and antimycin A prevent nitric oxide-induced apoptosis by blocking cytochrome C leakage, *J. Lab. Clin. Med.* 143 (2004) 143–151.
- [45] R. Dringen, B. Hamprecht, Glutathione restoration as indicator for cellular metabolism of astroglial cells, *Dev. Neurosci.* 20 (1998) 401–407.
- [46] Z. Ma, G. Song, D. Liu, D. Qian, Y. Wang, J. Zhou, J. Gong, H. Meng, B. Zhou, T. Yang, N-Acetylcysteine enhances the therapeutic efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in rats with severe acute pancreatitis, *Pancreatol.* 19 (2019) 258–265.
- [47] M. Yamamoto, T.W. Kensler, H. Motohashi, The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis, *Physiol. Rev.* 98 (2018) 1169–1203.
- [48] L. Ji, R. Liu, X.D. Zhang, H.L. Chen, H. Bai, X. Wang, H.L. Zhao, X. Liang, C.X. Hai, N-acetylcysteine attenuates phosgene-induced acute lung injury via up-regulation of Nrf2 expression, *Inhal. Toxicol.* 22 (2010) 535–542.
- [49] N. Goda, M. Kanai, Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism, *Int. J. Hematol.* 95 (2012) 457–463.
- [50] R. Crinelli, C. Zara, L. Galluzzi, G. Buffi, C. Ceccarini, M. Smetana, M. Mari, M. Magnani, A. Fraternali, Activation of NRF2 and ATF4 signaling by the pro-glutathione molecule I-152, a Co-drug of N-Acetyl-Cysteine and cysteamine, *Antioxidants* 10 (2021) 175.
- [51] J. Deng, A.-D. Liu, G.-Q. Hou, X. Zhang, K. Ren, X.-Z. Chen, S.S. Li, Y.-S. Wu, X. Cao, N-acetylcysteine decreases malignant characteristics of glioblastoma cells by inhibiting Notch2 signaling, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38 (2019) 1–15.
- [52] M. Guerini, G. Condò, V. Friuli, L. Maggi, P. Perugini, N-acetylcysteine (NAC) and its role in clinical practice management of cystic fibrosis (CF): a Review, *Pharmaceuticals* 15 (2022) 217.
- [53] M.C. Mendonça, N.P. Rodrigues, J.J. Scott-Fordsmand, M.B. de Jesus, M. J. Amorim, The toxicity of silver nanomaterials (NM 300K) is reduced when combined with N-Acetylcysteine: hazard assessment on *Enchytraeus crypticus*, *Environ. Pollut.* 256 (2020), 113484.

**Article : Long standing DT2 modify N-acetylcysteine effects on oxydative stress induced by AGEs in mesenchymal stem cells**

**Rebecca Landon**, William Bakari, Abolfazl Barzegari, Guilhem Frescaline, Nathanael Larochette, Olivier Thibaudeau, Hanane El-Hafci, Virginie Gueguen, Graciela Pavon-Djavid, Fani Anagnostou

*(En cours de rédaction)*



## 1 Introduction

Diabetes is a major health concern, affecting 536.6 million people worldwide in 2021[1]. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) represent 90% of diagnosed cases and these numbers are greatly underestimated, given that more than 50% of people with T2D are not diagnosed at the onset of the disease. T2DM is a chronic metabolic disease characterized by chronic hyperglycaemia, which, when not tightly controlled, affects numerous cell types, tissues and organs, leading to chronic complications associated with diabetes [9]. T2DM affects bone homeostasis and healing, patients with T2DM having a higher risk of fracture and impaired bone remodeling [34,37]. The alterations in bone tissue are suspected to be partly due to T2DM microenvironment, which affects bone tissue at the structural, cellular and molecular levels, although unlike vascular complications, the mechanisms and consequences are not completely understood.

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) are a unique type of adult stem cells, known for their potential for proliferation, differentiation and paracrine effects (via angiogenic, osteogenic and immunomodulatory factors) involved in bone regeneration [147,212,213]. Diabetic microenvironment (high glucose, inflammation, hypoxic conditions, ROS, AGEs) has deleterious effects on the functionality of BMMSCs [214].

At the cellular and molecular level, hyperglycemia promote the accumulation of advanced glycation products (AGEs) which are highly involved in diabetes and T2DM-complications [215]. AGEs induces changes in matrix components [44,45] and in the functionality of bone tissue cells. In addition to direct changes in protein structure and function, damage caused by AGEs occurs through the binding of AGEs to the receptor for advanced glycation products (RAGE), mediating intracellular production of reactive oxygen species (ROS) [87,104]. ROS, while playing an important role in the development of T2DM, also plays an essential role in cellular homeostasis and regulate a range of MSC signaling pathways [216]. In T2DM the redox balance of cells chronically shift towards a more pro-oxidant state [124]. However, the effects of AGEs and oxidative stress on the functionality of stem cells is not yet clear and remains under investigation [170].

In previous studies, using ZDF rats – a T2DM rodent model- we provided evidence that the T2DM microenvironment impairs BMMSCs expansion and select functions *ex vivo* [217]. Moreover, we demonstrated that the use of N-acetylcysteine, a natural antioxidant, is able to alleviate the DNA damage, cell apoptosis, and oxidative induced by free radicals in MSCs from healthy environment [218]. The aim of this study was therefore (i) To assess changes in long-

standing T2DM on BMMSCs environment in the aged ZDF rat model (ii) to explore the effects of the AGEs on select functions and ROS production of BMMSC harvested from both longstanding T2DM and healthy microenvironment and (iii) to assess the antioxidant potential of NAC on AGES-induced ROS.

Better understanding of the impact of T2DM microenvironment on BMMSCs from healthy or diabetic and strategies to protect MSCs from oxidative stress are essential for the development of new cellular therapies in T2DM.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Animal Model**

Adult 24-week-old male, obese Zucker fa/fa rats (ZDF) and their lean fa/+ littermates (ZL) were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The animals were housed under standard laboratory conditions and were manipulated and euthanized in accordance with the "European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals". The research protocols and the experimental procedures used in the present study were approved by the Ethics Committee of the Paris-Diderot University (N°01610.01/S69), Paris, France.

On the day of the sacrifice, blood samples were collected and the humeri, tibia and femur were dissected. The diabetic status was evaluated by measuring glycated hemoglobin in blood and glucose and fructosamine levels in plasma (Architect Automat; Abbott, France). Alkaline phosphatase, cholesterol, triglycerides, ultra-HDL, LDL-C, calcium potassium, phosphorus and sodium levels in plasma were measured using standard methods (Architect Automat; Abbott, France).

## 2.2 Histology and immunohistochemistry

To assess bone-marrow histological parameters, ZDF and Lean rats humeri were collected, fixed in 10% neutral-buffered formalin for 24h, decalcified with EDTA 177 g/L, pH 7.0–7.3 (Osteosoft, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at 4°C for 4 weeks, and then embedded in paraffin.

For the bone-marrow adiposity analysis, sagittal sections were prepared (5 microns thickness) and stained with Trichrome Masson. Images from two sections per sample were obtained using standard light microscopy and were blindly analyzed. Adipocyte cell number, diameter and surface were determined using x40 magnification in an area 1 mm below the growth plate on 2 random regions of interest (1310,68 x 822,81  $\mu\text{m}$ ) with Fiji (ImageJ).

For the analysis of osteocytes, decalcified mi-diaphysis cross-sections (5 microns thickness) were prepared. Cleaved caspase-3 immunohistochemistry was realized accordingly to a previously established protocol at the laboratory. Briefly, sections treated with citrate buffer were incubated with a TBST blocking solution for 1h at 37°C. Next, they incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with the primary antibody pro caspase 3 cleaved (1/200 in Signal Stain Antibody Diluent) followed by Signalstain® Boost IHC Detection Reagents (HPR, Rabbit #8114S), and SignalStain Dab Substrate Kit (#8058S). After immunostaining, sections were counterstained with Harris hematoxylin and mounted with coverslips. Two sections per sample were blindly analyzed using x40 magnification to count the total number of osteocytes, the total number of empty lacunae, and the number of cleaved caspase-3 positive osteocytes per bone area onto 6 random regions (171.23 x 171.23  $\mu\text{m}$ ), on endosteal and periosteal sites, with Fiji (ImageJ). The number of caspase 3 positive lacunae was reported on the total of lacunae on each ROI.

## 2.3 Isolation of Rat Bone Marrow-derived Multipotent Stromal Cells

BMMSCs were obtained from the femurs and tibiae as previously described [217]. Briefly, bones were harvested, their respective epiphyses were removed and bone marrow was flushed with alpha-Modified Eagle's Medium ( $\alpha\text{MEM}$ ) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells from ZL- and ZDF rats were seeded separately at a density of  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>, and cultured at 37°C with culture medium ( $\alpha\text{MEM}$ ) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) and 1% (v/v) and penicillin/streptomycin antibiotic/antimycotic solution (ATB/ATM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) (complete medium) in a humidified 5% CO<sub>2</sub> / 95% air environment. The non-adherent cells were removed after 2 days of culture. Fibroblastic

colonies (CFU-F) were formed on day 5 of culture and all pooled on day 12 (passage 1). For both ZL- and ZDF-BMMSCs expansion cells were grown until 70% confluent, then trypsinized using a 0.005% trypsin/EDTA solution, and seeded at  $10 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>. During cell culture, media were replaced twice a week. BMMSC (passages 3-4) were used for all the experiments in the present study. The BMMSC origin was assessed using fluorescence-activated cell sorting and monitoring for expression of the CD29 (clone Hmb1-1; eBioscience), the CD45 (clone OX1; eBioscience), and the CD90 markers (clone HIS51; Life Technology), as well as their differentiation into the osteogenic and adipogenic lineages. As previously described, cells (passage 2) harvested from the ZDF exhibit similar MSC markers (CD90 et CD105) profile to that harvested from ZL rats MSC markers None of the cell types expressed the leukocyte marker CD45 [17].

## 2.4 Advanced Glycation Endproducts-effects on BMMSCs harvested from ZL and ZDF rats

### 2.4.1 Cytotoxicity

BMMSCs harvested from ZL and ZDF rats were separately seeded at  $10 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> on 96-well plates and cultured in  $\alpha$ MEM+ 2%FBS+1%ATB for 24h. Then media was changed to a serum-free  $\alpha$ MEM medium containing different concentrations of AGEs-BSA (CALBIOCHEM, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) varying from 0 to 200 $\mu$ g/mL, and cells were cultured for 48 hours. After medium removal, cells were rinsed with PBS, dried and frozen at -70°C. The number of cells was assessed with CyQUANT® (molecular probe, Invitrogen™), according to manufacturer instructions. Briefly, cells were thawed, and incubated with 200 $\mu$ L of GRdye mixt a 1,5X (prepared in Lysis buffer) for 5 min. Cell lysate fluorescence was measured (~480 nm excitation and ~520 nm emission; FL600, Bio-Tek®) to measure DNA content and reported to a standard curve to determine the number of cells.

### 2.4.2 Cell survival and morphology

ZDF- and ZL-BMMSCs in 2%FBS culture medium were separately seeded at  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 8 well glass slide chamber (lab-tek® II Chamber Slide™, Nunc™, thermos Fisher Scientific). After 24h, the media was changed to a serum-free  $\alpha$ MEM medium containing different concentrations of AGEs-BSA varying from 0 to 200 $\mu$ g /mL, and cells were cultured for 48 hours. The adherent cells were fixed using 4% formaldehyde, then permeabilized with triton 100X at 0,1% in PBS. Cells were stained with Phalloidin solution 1/100 in PBS (Alexa

Fluor™ Plus 555 Phalloidin, ThermoFisher) and mounted with coverside. 4 random spots per condition were photographed using a confocal microscope (1,7 x 1,3 µm) and adherent cells were counted using the data processing software Image J (National Institute of Health, US).

### 2.4.3 Cell Proliferation

Cells in  $\alpha$ MEM+ 2%FBS+1%ATB were each seeded at the density of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on 96-well plates. Following cell adhesion, the culture media was changed to complete culture media containing 100-200µg/mL of AGEs-BSA. Cell proliferation was determined at different time points, up to ten days of culture. The cells were rinsed with PBS, the plates were stocked a -70°. The cell proliferation was assessed using CyQUANT® (molecular probe, Invitrogen™), as previously described according to manufacturer instructions.

### 2.4.4 Cell Migration

BMMSC migration was determined using commercially-available 24-well Boyden chambers (Corning Costar, Cambridge, MA, USA). In the upper compartment of each chamber were placed the ZDF or ZL cells ( $75 \times 10^3$  cells/ 100 µL) in serum-free  $\alpha$ MEM (migration medium) and the bottom one 0.6 mL of complete culture medium containing 100 µg/mL AGEs-BSA. The cell migration experiments were conducted in a humidified, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air environment, overnight. The cells that had traversed, but still adhered to the other side of the membrane separating the two Boyden compartments, were fixed using 4% paraformaldehyde and then stained in situ with the May Grunwald-Giemsa stain. Each membrane was then excised, mounted on a glass slide, and visualized using a digital microscope (VHX-2000; Keyence). The cells present on five randomly chosen, separate areas per membrane were counted in situ (ImageJ).

### 2.4.5 Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis

BMMSC were cultured in complete culture media containing different AGEs concentrations varying from 0 to 100µg/mL. RNA was extracted from cells with Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. After RNA purification and quantification using spectrophotometry (NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using the SuperScript™ II RT Kit

(Invitrogen). qRT-PCR was performed using an iCycler thermocycling apparatus (MyiQ™ Single-Color RT-PCR; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) in the presence of 500ng of cDNA, TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the following specific TaqMan probe primers: Recombinant Interleukin 1 beta (IL1beta), TNF superfamily member 11 (RANKL), chemokine C-X-C motif ligand 1 (Cxcl1); Runt-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (PDZ and LIM domain 3 ALP); Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg); insulin-like growth factor 1 (IGF-1), hypoxia-inducible factor 1 (Hif-1 $\alpha$ ). After the activation of DNA polymerase at 95 °C for 10 minutes, cDNA was amplified by performing 40 two-step PCR cycles: a 15-second denaturation step at 95 °C, followed by a 60-second annealing, and an extension step at 60°C. Each sample tested was run in triplicate. As an internal control for the gene expression measurements, was used 18S RNA endogenous control (house-keeping gene with a constant expression level) All data were subsequently analyzed using MyiQ™ Software (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Quantitation of gene expression was performed using the comparative threshold cycle method ( $\Delta\Delta Ct$ ). All reagents were supplied from Applied Biosystems Inc.: 18 s (Hs 99999901\_s1), IL-1 $\beta$  (Rn 00580432\_m1), RANKL (Rn 00589289\_m1), Cxcl1 (Rn 00578225\_m1), Runx2 (Rn 01512298\_m1), Alpl (Rn 01516028\_m1), Pparg (Rn 00440940\_m1), IGF-1 (Rn 00710306\_m1), Hif-1 $\alpha$  (Rn 00577560\_m1), Ager (Rn 00584249\_m1)

#### 2.4.6 Reactive Oxygen Species (ROS) measurement

ROS were quantified using oxidation-sensitive probes, the dichloro-dihydro-fluorescein diacetate DCFH-DA (DCFH-DA, Thermo Fischer Scientific) for intracellular ROS (iROS) and Dihydroethidium probe (DHE ThermoFisher) for mitochondrial ROS (mROS) detection. Cells were seeded at  $3 \times 10^3$  cells/well in complete culture medium on 96-well plates until 80% confluency ( $\approx 1 \times 10^4$  cells/well). Then they were exposed to AGEs-BSA (100 $\mu$ g/mL) for 15 min and incubated in the dark with DCFH-DA (5  $\mu$ M) or DHE (5  $\mu$ M) at 37°C for 30 minutes excluding the blank wells. Mitochondrial ROS were induced by incubation of stressor antimycin A (200  $\mu$ M) excluding the blank wells. Fluorescence for DCFHDA ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 485 /530nm) and DHE ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =500/580 nm) probes was monitored after 60 min in a plate reader fluorimeter (FL600)

To evaluate the capacity of N-acetylcysteine (NAC) to protect cells of AGEs-induced ROS production, cells were pre- or co-treated with NAC. Cells were seeded at  $1 \times 10^4$  cells/well in

complete culture medium on 96-well culture plates. After 24h, medium was removed and cultures were rinsed with PBS. Oxidative stress was induced by adding AGEs-BSA (100  $\mu$ M) to the supernatant medium of each well. For the pre-treatment experiments, cells were incubated with NAC (2,5-10mM) overnight, before the oxidative stress induction. For the co-treatment experiments, NAC at 10 mM was added at the same time as the oxidative stress induction. After discarding the supernatant, cells were incubated with 10 $\mu$ M DCFH-DA for 1h at 37°C ( $\alpha$ MEM phenol red-free). Oxidative stress was also induced by the addition of stressors AAPH (25mM), t-BuOOH (100  $\mu$ M) as previously published [211]. Fluorescence for DCFHDA ( $\lambda$  ex/ $\lambda$ em= 485 /530nm) and DHE ( $\lambda$  ex/ $\lambda$ em=500/580 nm) probes was monitored every 5 min during 60 min in a plate reader fluorimeter (FL600), fluorescence was directly correlated to ROS release by the ZDF- and ZL-BMMSCs.

## 2.5 Statistical Analyses

Each experiment was performed in triplicate and at least three separate times using different cell preparations. Numerical data were reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). For time-dependent experiments, analysis of variance (ANOVA) was used for unpaired two-tailed samples, and the experimental data were compared to their respective controls. For time-independent experiments, Student's t-tests were used for unpaired two-tailed samples, and the experimental data were compared to their respective controls. P values less than 0.05 were considered statistically significant.



### 3 Results

#### 3.1 Biochemical parameters and body weight in long-standing diabetic ZDF rats

Compared to -ZL rats, type 2 diabetic ZDF rats displayed a significant ( $p < 0.05$ ) increase of serum glucose, fructosamine and HbA1c level (specifically, by 1.46-fold, 0.46-fold and 3.10-fold, respectively) (tableau II-1). Besides dysglycemia, diabetic rats exhibited significantly ( $p < 0.05$ ) higher levels also of dyslipidemia markers (total cholesterol (1.46-fold), triglycerides (1.46-fold), LDL-C (1.33-fold) and ultra-HDL (1.75-fold). In addition, the level of circulating alkaline phosphatase was significantly higher (by 3.40-fold), whereas calcium, phosphorus, sodium and potassium levels were unaffected.

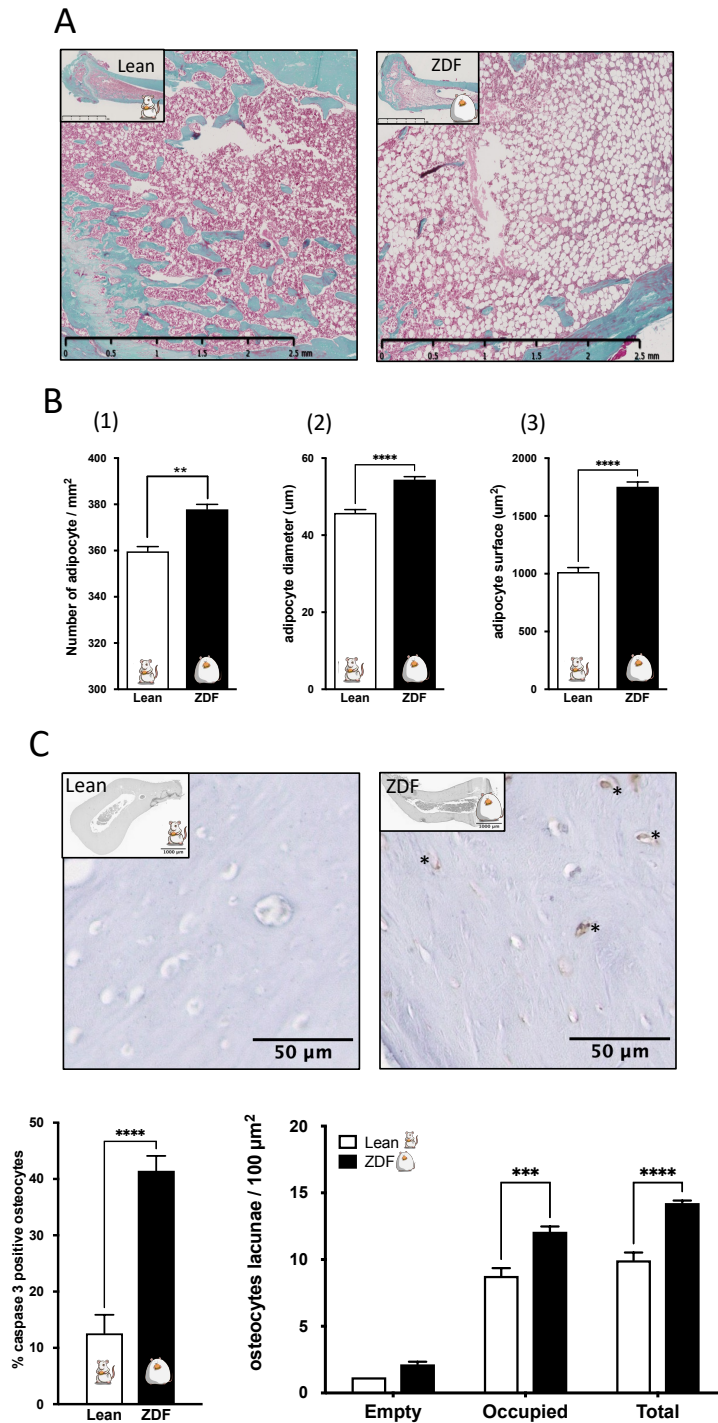
**Tableau II-1** Blood parameters in ZDF and Lean rats. Values are from 3 independent experiment,  $n=9$  rats/condition. \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$  and \*\*\*\* $p<0.0001$

	Lean		ZDF		ZDF vs Lean
	Mean	SEM	Mean	SEM	p value
Glycated hemoglobine (%)	2,90	0,23	11,90	2,01	**
Alkaline Phosphatase (U/L)	77,00	3,87	339,50	47,10	***
Glucose (mmol/L)	16,55	1,39	40,68	1,30	****
Cholesterol (mmol/L)	2,21	0,06	5,43	0,23	****
Triglycerides (mmol/L)	1,24	0,11	3,05	0,23	****
Fructosamine (mmol/L)	0,23	0,01	0,33	0,01	****
Ultra HDL (mmol/L)	0,63	0,02	1,73	0,03	****
LDL-C (mmol/L)	1,00	0,06	2,33	0,19	****
Phosphorus (mmol/L)	1,91	0,10	2,04	0,18	ns
Calcium (mmol/L)	2,55	0,04	2,61	0,08	ns
Sodium (mmol/L)	138,11	1,12	134,22	1,64	ns
Potassium (mmol/L)	4,97	0,38	4,67	0,55	ns



### 3.2 Long-standing Type 2 Diabetes affects bone marrow mesenchymal stromal cells microenvironment

To assess changes in long-standing T2DM on BMMSCs environment in the ZDF rat model we investigated various parameters of bone marrow cellularity. In the bone marrow of ZDF rats humeri, the number of adipocytes per mm<sup>2</sup> of bone marrow tissue area was higher (by 5%;  $p < 0.005$ ), the adipocyte diameter and surface were increased (respectively by 18.8% and 72.6%;  $p < 0.0001$ ) compared to that of ZL rats (Figure II-1 A, B). The number of mononuclear cells harvested from the bone marrow of diabetic animals was significantly ( $p < 0.05$ ) lower (by 30%) than the cells from non-diabetic rats (data not shown). The number of caspase 3 positive osteocytes were also significantly increased (by 229%;  $p < 0.0001$ ) in the ZDF group (Figure II-1 C). Moreover, the number of osteocyte lacunae, counted manually and normalized to the bone area in the cross-sectional histological sections of humeri cortical bone, was significantly higher (by 30.1%;  $p < 0.0001$ ) in the ZDF group compared to the ZL group.



**Figure II-1.** Type 2 diabetes mellitus (T2DM) affects the bone marrow. (A) Representative images of decalcified histological sections of humeri from 24 week old Lean and ZDF rats. Masson trichrome staining, Standard error of the mean (SEM). The data are from 3 independent rats per condition (ZDF and Lean), ImageJ analysis scale bar = 2,5 mm (B) Number, diameter and surface of adipocyte cells present in the bone marrow, analysed with ImageJ on histological sections of humeri from ZDF and Lean rats (n=3) (C) Representative images and analysis of immuno-histochemistry staining for caspase 3 on humeri from ZDF. Analysis caspase 3 positive osteocytes and osteocytes lacunae occupation on cortical bone from humeri of Lean and ZDF rats. Values are mean  $\pm$  SEM from 3 to 5 independent region of interest from 3 histological sections per rats (n < 9). \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001.

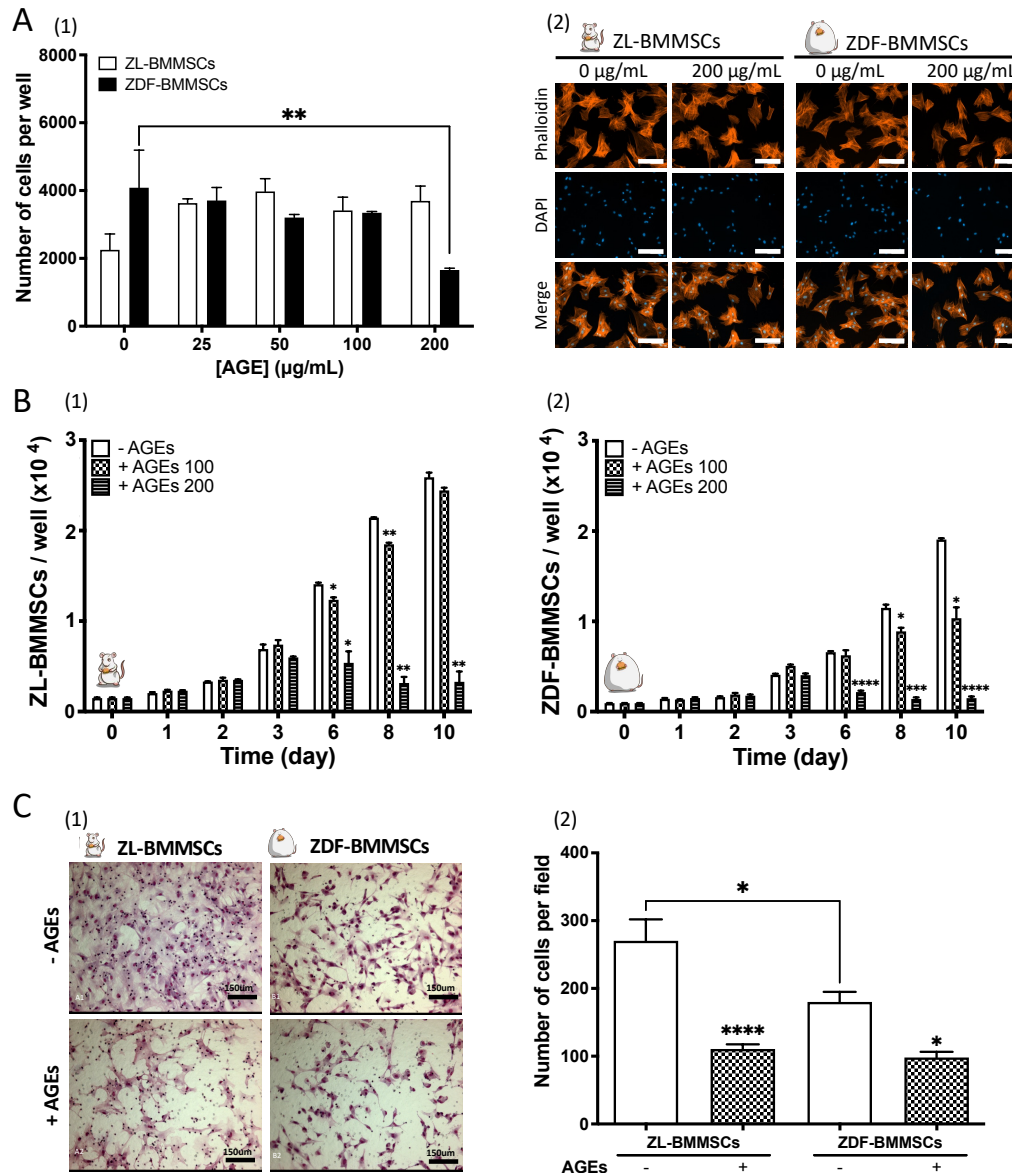
### 3.3 AGEs alter select functions of bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro

AGEs formation and accumulation in bone tissue have been reported as a characteristic feature of local T2DM microenvironment. Therefore, AGEs effects were investigated on the functionality of the BMMSC harvested from ZL rats in comparison to that on cells harvested from long-standing T2DM -ZDF rats.

To evaluate AGEs effect on BMMSCs survival, cells harvested from ZL and ZDF rats were cultured under normoglycemic conditions in the presence or absence of AGEs up to 200µg/mL added in a culture medium containing 2% FCS for 2 days (Figure II-2 A). Under these conditions, AGEs did not affect the number of ZL- BMMSCs but had a cytotoxic effect on ZDF-BMMSC, with a significant ( $p < 0.01$ ) decrease in cell number (by 55%). Next, to assess the effect of AGEs on proliferation, BMMSCs were cultured under normoglycemic conditions in the absence or presence of increasing concentrations of AGEs added in a culture medium containing 10% FCS for up to 10 days. The addition of AGEs significantly ( $p < 0.001$ ) reduced the number of BMMSCs harvested from both ZL and ZDF rats (Figure II-2 B). The AGEs effect on BMMSCs proliferation was dose-dependent and more pronounced on cells harvested from ZDF rats in comparison to that from ZL ones. AGEs at 100 µg/mL reduced ZL-BMMSCs number 1 by 12.2% ( $p < 0.1$ ) from the 6th day (Figure II-2 B1) and by 22.73% to 45.72% ( $p < 0.1$ ) from the days 8 to 10 (Figure II-2 B2).

Increase of AGEs concentration to 200µg/mL, led to an inhibition of proliferation of both ZL- and ZDF- BMMSCs. In comparison to the BMMSCs cultured without AGEs cell number was reduced, by 87.29% ( $p < 0.01$ ) for ZL-BMMSCs and 92.13% ( $p < 0.0001$ ) for ZDF\_BMMSCs at day 10. (Figure II-2 B). Migration potential of both ZL-BMMSCs and ZDF-BMMSCs was studied in the presence of AGEs (100µg/mL) added, in the culture medium, in the bottom compartment of Boyden chambers. At the end of the experiment, the migrated cells were stained and observed using a digital microscope. Migrated BMMSC from both ZL and ZDF were evenly distributed on the surface of the membrane. Migrated ZL-BMMSCs were predominantly polygonal in shape with a spread-out cytoplasm, regardless of the AGEs presence. In contrast, migrated ZDF-BMMSCs displayed a wider variety of shape including expanded, starlike or even rounded shapes (Figure II-2 C1). Compared to ZL-BMMSCs, migration potential of ZDF-BMMSCs was significantly reduced (by 33.42%;  $p < 0.1$ ). The presence of AGEs in the bottom compartment of the chamber decreased by 59.03% ( $p < 0.0001$ ) migrated ZL-BMMSCs and by 45.48% ( $p < 0.1$ ) migrated ZDF-BMMSCs (Figure 2 II-C2).

To summarize, the findings showed that AGEs effects on select functions of BMMSCs cultured *in vitro* under normoglycemic conditions are dependent on the microenvironment (in which they have been harvested) or to which they are exposed.



**Figure II-2.** Impaired cell survival, proliferation, and migration of ZDF-BMMSCs treated with AGEs in normoglycemic condition. (A) Cell survival assessed by cell counting (1) and phalloidin stain (2) after 48h exposure to AGEs-BSA in normoglycemic condition, for both BMMSCs from ZL and ZDF rats. White label corresponds to 200µm (B) Cell proliferation analysed up to 10 days for BMMSCs from ZL (1) and ZDF (2) rats, when treated with concentrations of 0 - 100 or 200µg/mL AGEs-BSA, in complete media (C) ZL- and ZDF-BMMSCs migration potential to complete media containing AGE-BSA 100µg/mL, (1) pictures of migrated cells on the lower side of the membrane (MGG-staining), (2) Cells counted on five randomly-chosen, separate areas per lower side of membrane using ImageJ. Values are mean ± SEM. Cell counting were performed through DNA assay in end points, using Cyquant® fluometric kit. Cell migration was determined using commercially available 24-well Boyden chambers. The data are from 3 independent wells per condition representative of 3 independent experiments (n = 9). \* p < 0.1; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001.

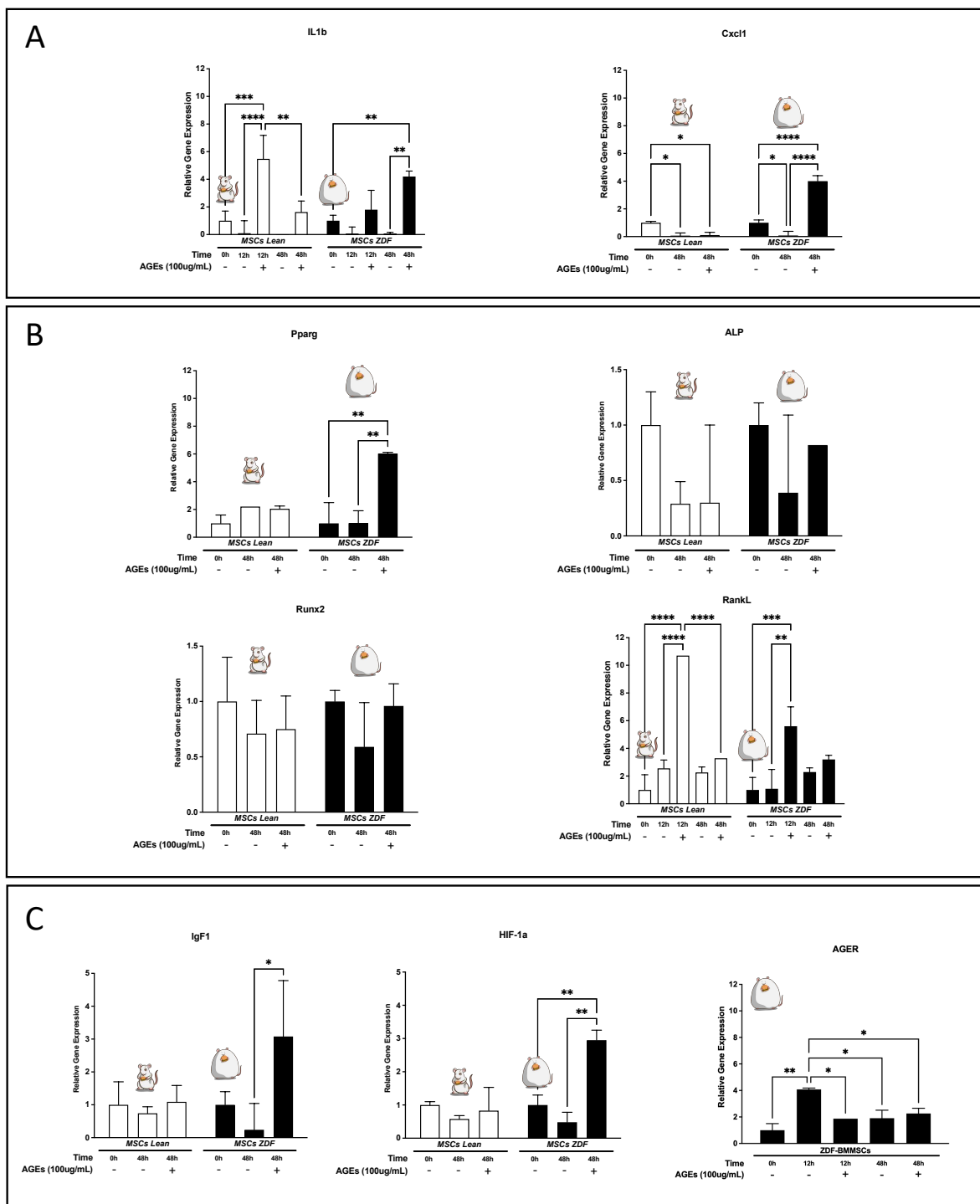
### 3.4 AGEs modulate differently select genes expression

BMMSCs harvested from T2DM-microenvironment have shown modified gene expression profile [217]. Therefore, we investigated the AGEs-BSA effect on ZL-BMMSCs and we compared it to that on ZDF-BMMSCs. To this aim cells were cultured in the absence or presence of AGEs (100µg/mL) added in a culture medium containing 10% FCS under normoglycemic conditions during 12h and 48h. In ZL-BMMSCs, exposition to AGEs for 12h led to significant up-regulation of IL1b (by 4.48-fold;  $p < 0.001$ ) and RankL (by 9.70-fold;  $p < 0.0001$ ) gene expression, followed by a return to “basal” expression level at 48h (Figure II-3 A, B). The expression of cxcl1 gene was down regulated (by 0.9-fold;  $p < 0.05$ ) at 48h, regardless of the presence of AGEs in ZL-BMMSCs (Figure II-3 A). In ZDF-BMMSCs AGEs induced an up-regulation of IL1b (by 3.2-fold;  $p < 0.01$ ) at 48h and modulated the expression of Cxcl1 with an upregulation (by 3-fold;  $p < 0.0001$ ) at 12h, whereas without AGEs a down regulation (by 0.9-fold;  $p < 0.05$ ) similar to that in ZL-BMMSCs, was observed at 48h (Figure II-3 A). Moreover, AGEs also induced an up-regulation of RankL (by 4.6-fold;  $p < 0.001$ ) at 12h.

Furthermore, under these experimental conditions and in the absence of differentiation factors, AGEs modified the expression of select adipogenic marker only in ZDF-BMMSCs. For instance, after 48h exposition, AGEs led to a significant up-regulation of Pparg (by 5-fold;  $p < 0.01$ ) but no significative change in select osteogenic markers ALP and Runx2 expression was observed. (Figure II-3 B). In ZDF-MSCs, AGEs also induce an up-regulation of diabetic microenvironment-related genes IGF-1 by 11.83-fold;  $p < 0.05$ ) and HIF-1 $\alpha$  (by 1.95-fold;  $p < 0.01$ ) (Figure II-3 C) after 48h -exposure.

Moreover, ZL- and ZDF-BMMSCs showed differences in AGEs-specific Receptor (AGER) gene expression when cultured under normoglycemic conditions in the absence and presence of AGEs (100µg/mL). At t0, the AGER gene was expressed only in ZDF-BMMSCs. In the absence of the AGEs, the AGER expression was increased (by 3.08-fold;  $p < 0.01$ ) at 12h and then decreased to that level observed at t0. However, in the presence of the AGEs, a retroinhibition of AGER gene expression was observed in ZDF-BMMSCs at 12h (Figure II-3 C). No expression of Adipoq was quantified, indistinctively of the cell type or treatment (data not shown)

These results showed that AGEs may have a pro-inflammatory role and that they led to a different gene expression profile, including that of AGER in BMMSCs from the diabetic ZDF rats compared to that of non-diabetic ones.

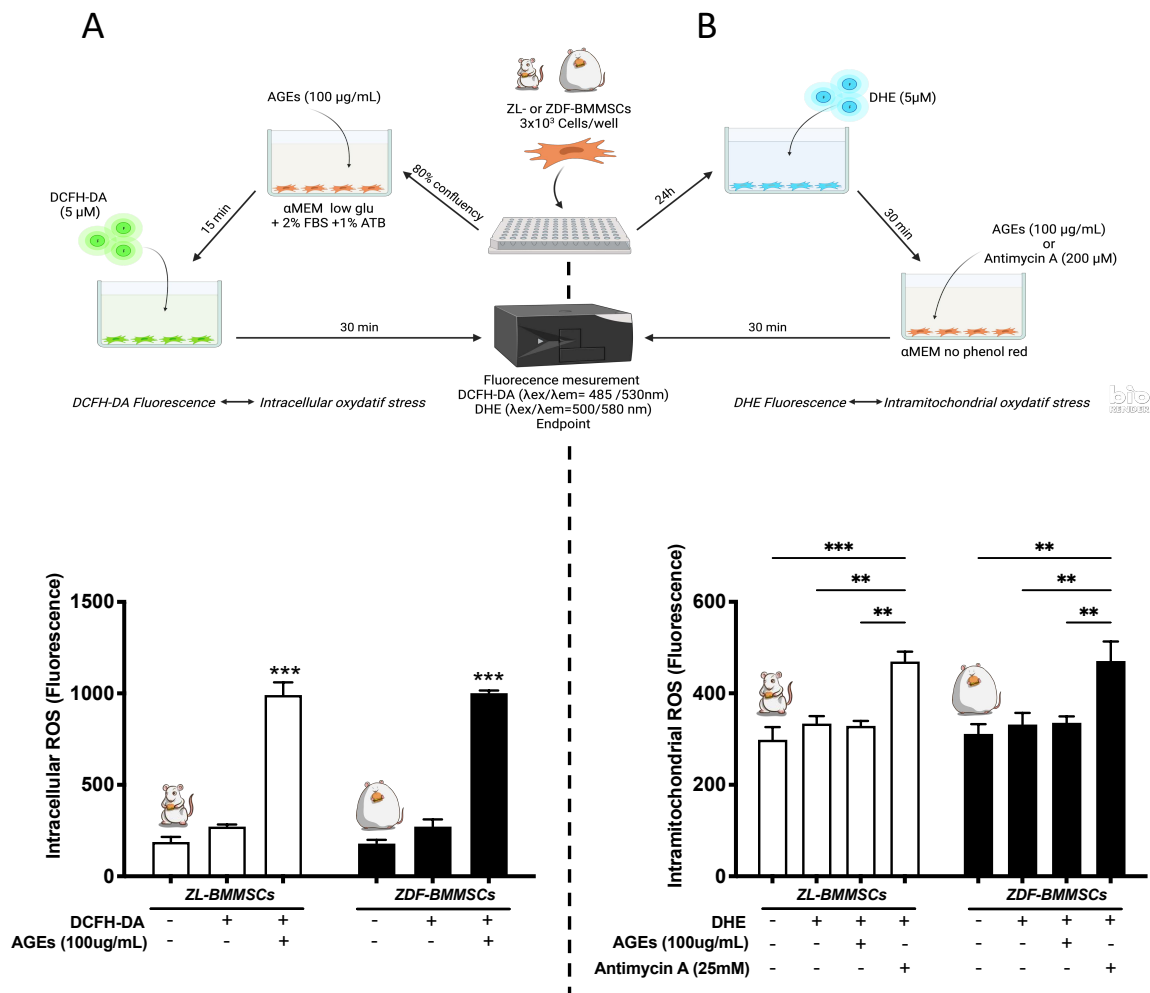


**Figure II-3.** Expression of select inflammation related genes IL1b, Cxcl1 (A), Adipo- Osteogenic- related genes Pparg, ALP, Runx2, RankL (B), and diabetic microenvironment related genes IGF-1, HIF-1 $\alpha$ , AGER from ZL (white) and ZDF-BMMSCs (black) cultured with 0 or 100 $\mu$ g/mL of AGEs-BSA under normoglycemic conditions for 12 and 48h. Values are mean  $\pm$  SEM. (n = 3). The expression fold change is analyzed based on the PCR cycle number (Ct). 18S rRNA was used for the normalization of data as the endogenous control. Relative quantification of gene expression was represented according to the Pfaffl et al. method. Each reaction was performed in triplicate. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001



### 3.5 Effects of NAC on AGEs-induced intracellular ROS generation

The interaction of AGEs with their receptor activates several signal transduction pathways that induce the production of reactive oxygen species (ROS) [87]. Therefore, ROS generation was evaluated in both ZL- and ZDF-BMMSCs, cultured in the presence (100 µg/mL) and the absence of AGEs, under normoglycaemic conditions for 15 min. DCFH-DA, and DHE probes were used to evaluate intracellular ROS (iROS) and mitochondrial (mROS) respectively. AGEs added in the medium led to an important increase (by 270%;  $p < 0.001$ ) of iROS (Figure II-4 A). In contrast to Antimycin A (AMA), used as a positive control to block the respiratory chain in mitochondria, AGEs had not a significant effect on mROS generation (Figure II-4 B) suggesting an intracytoplasmic localization of AGEs-induced ROS. Moreover, ZL- and ZDF-BMMSCs exhibited similar levels of AGEs- and AMA- induced iROS and mROS.



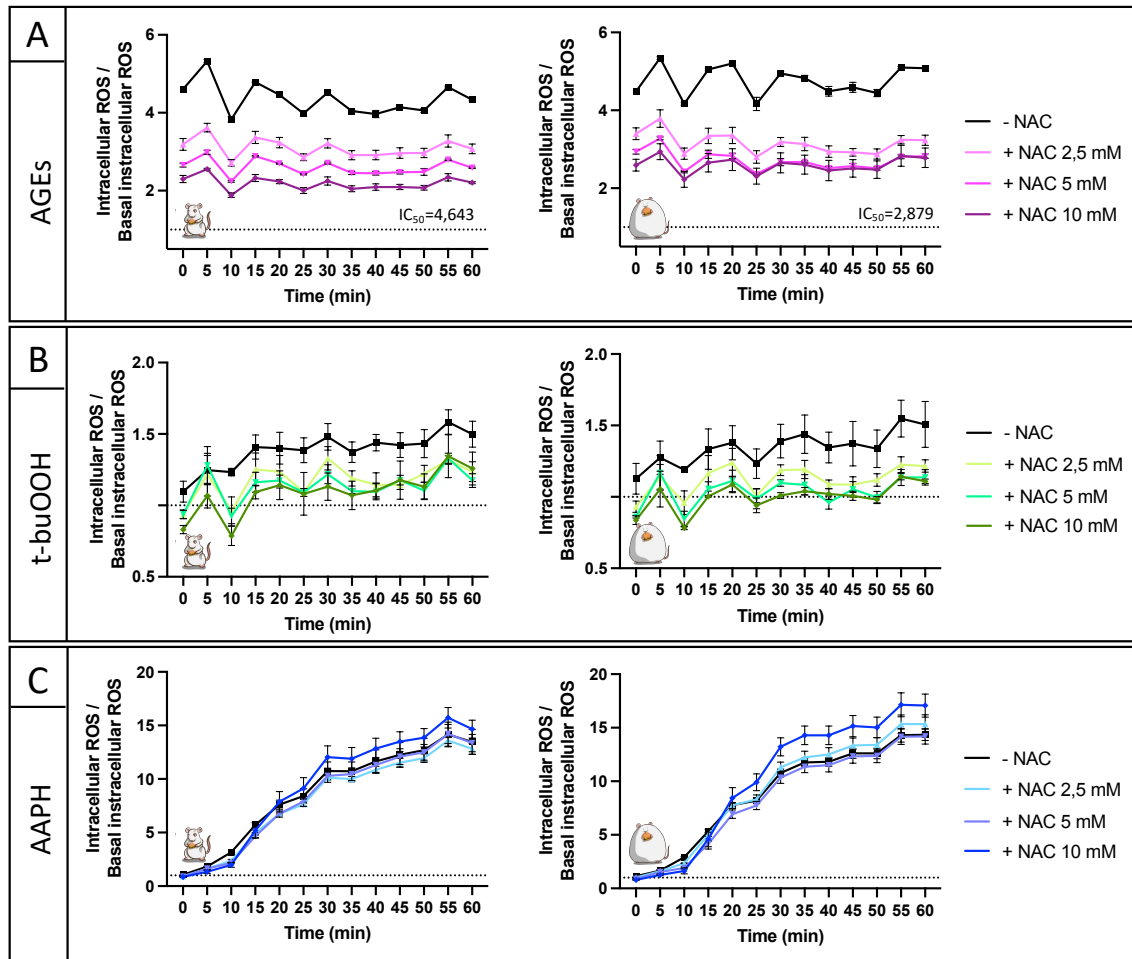
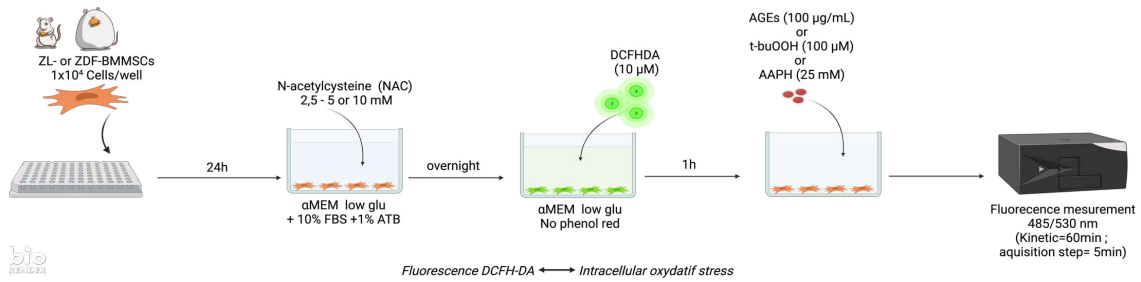
**Figure II-4.** Intracellular reactive oxygen species (ROS) measurement in ZDF-MSCs and Lean-MSCs when exposed to 100µg/mL of AGEs-BSA; Values are mean ± SEM. (n = 3). Intracellular ROS measurement were performed in endpoint with DCFH-DA (A) or DHE (B) fluorescent probes. Antimycin A was used as positive control to block respiratory chain for DHE measurements. The data are from 3 independent wells per condition representative of 2 independent experiments (n = 6). \*\*\*  $p < 0.001$

In order to further characterize the AGEs-induced (iROS), and the potential of an antioxidant to alleviate it, both ZL- and ZDF-BMMSCs were pre- or co-treated with N-acetylcysteine (NAC). Di-tert-butyl-peroxide (t-buOOH) and AAPH were used as control stressors to generate iROS. For the pre-treatment experiments, cells, were incubated with increasing concentrations of NAC overnight, before the oxidative stress induction. For co-treatment experiments, simultaneously with the oxidative stress inducer was added 10 mM NAC.

In ZL-BMMSCs and ZDF-BMMSCs, AGES-induced iROS increased from the beginning of the test (>4 times greater than basal stress) and remained at high levels during 1h (Figure II-5 A). NAC pretreatment significantly ( $p < 0.0001$ ) reduced iROS in a dose-dependent manner in both cell populations; ROS scavenging was found to be more than 40% for 10 mM NAC. The antioxidant activity of NAC was dose dependent in both cell lines; however, lower concentrations of NAC were required to protect ZDF-BMMSCs compared to ZL-BMMSCs (IC<sub>50</sub> 2.9 vs. IC<sub>50</sub> 4.6). iROS levels induced by t-buOOH were lower than those induced by AGEs and increased weakly to reach a plateau after 15 min in both populations (approximately at 1.5 times the basal stress) (Figure II-5 B). In cells pretreated with NAC, a reduction in iROS was observed with a more pronounced effect in ZD-BMMSCs. The generation of -iROS by AAPH was close to the basal level at t=0 and showed a linear progression with time. After 60 min of incubation, a strong signal was observed almost 15 times higher than the basal stress state corresponding to an iROS production more important than those observed with t-buOOH or AGEs. Pretreatment with NAC did not protect the cells, in fact, the level of iROS remained high in both cell types (Figure II-5 C).



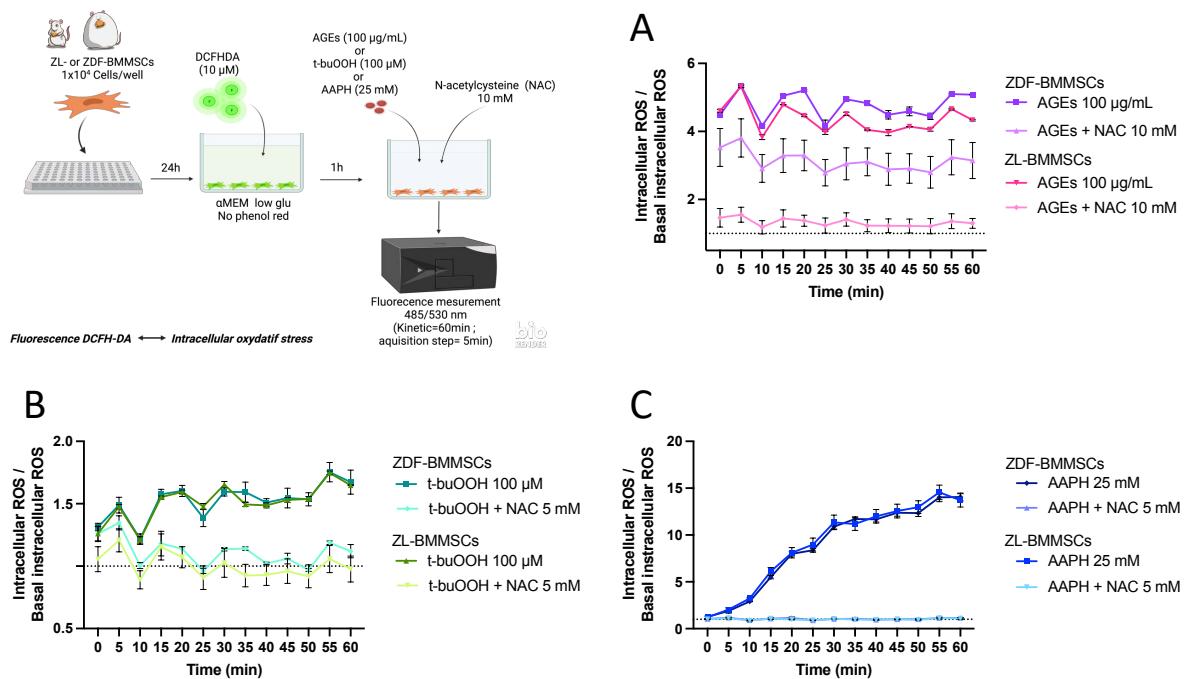
Chapitre II - EFFETS DE COMPOSÉS DU MICROENVIRONNEMENT DT2 (STRESS OXYDATIF, AGES) ET ETUDE DU POTENTIEL D'UN ANTIOXYDANT DE REFERENCE, POUR REGULER LE STRESS OXYDATIF AU NIVEAU DES CSMs



**Figure II-5.** N-acetylcysteine (NAC) pre-treatment impact on intracellular reactive oxygen species (ROS) measurement in ZDF-MSCs and ZL-MSCs, when exposed to (A) 100 $\mu$ g/mL of AGES-BSA; (B) 100 $\mu$ M di-tert-butyl-peroxide (t-buOOH) and (C) 25mM AAPH; Values are mean  $\pm$  SEM. (n = 3). Intracellular ROS measurement were performed in kinetic for 60min with DCFH-DA fluorescent probe. The data are from 3 independent wells per condition representative of 2 independent experiments (n = 6). \*\*\* p < 0.001

In order to evaluate cellular protection against oxidative stress by antioxidant co-treatment, ZL and ZDF-BMMSCs were exposed to both the iROS inducer (AGES, t-buOOH and AAPH) and the antioxidant NAC (10mM) (Figure II-6). The level of iROS induced by AGEs was significantly reduced by NAC in ZL- and ZDF-BMMSCs (by respectively ~70% and ~28%;  $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ ) (Figure II-6 A). ZL-BMMSCs were protected then by NAC co-treatment at 10mM, however protection was 2.5 times less effective on ZDF-BMMSCs for all kinetic time points.

NAC co-treatment protected both cell types of stress generated by t-buOOH and AAPH and maintained cellular basal stress state by inhibiting ( $p < 0.0001$ ) the generation of iROS (Figure III- 6 B,C).



**Figure II-6.** Impact of N-acetylcysteine (NAC) at 10mg/mL cotreatment on reactive oxygen species (ROS) measurement in ZDF-MSCs and ZL-MSCs, when exposed to (A) 100μg/mL of AGES-BSA; (B) 100uM t-buOOH and (C) 25mM AAPH; Values are mean ± SEM. (n = 3). Intracellular ROS measurement were performed in kinetic for 60min with DCFH-DA fluorescent probe. The data are from 3 independent wells per condition representative of 2 independent experiments (n = 6). \*\*\*  $p < 0.001$

In conclusion, iROS generation by AGEs is instantaneous, lasts for at least 60 min at level superior to that observed by t-buOOH and inferior to that by AAPH (commonly used oxidant stressors). Moreover, whereas the iROS generation was similar in both ZL- and ZDF-BMMSCs, modulated differently in response to the NAC, an antioxidant agent. Indeed, the pre-treatment with NAC reduced iROS production in both ZL- and ZDF-BMMSCs in a dose

dependent manner but the cotreatment showed better antioxidant potential on ZL-BMMSCs than in ZDF-BMMSCs.

## 4 Discussion

It has been demonstrated that hyperglycemia-mediated accumulation of AGEs and ROS may deleteriously affect the BM-MSC, which play a key role in bone homeostasis and *in situ* wound healing and used in tissue engineering to regenerate bone. However, how does AGEs impact the BMMSC function and how does T2DM induce such excess of ROS still need further investigation.

In the present study we report that long-standing T2DM leads to substantial modifications of bone marrow cellular composition. At first, compared to the non-diabetic, bone marrow adiposity in ZDF diabetic rats was significantly increased and resulted rather from adipocytes hypertrophy and hyperplasia. This finding was consistent with earlier reports in TALLYHO/JngJ obese mice [219] and in T2DM patients [220] and indicated that T2DM microenvironment induces a shift in BMMSC differentiation phenotype, favoring adipogenesis than osteogenesis [221]. The expansion of the bone marrow adiposity may be correlated with the significant and consistent decrease in the number of mononuclear cells harvested from the bone marrow of diabetic animals compared to that from non-diabetic ones, observed in the present study. Moreover, in the ZDF model previous studies of our group have been shown that T2DM-BMMSCs cultured *in vitro*, exhibit dysfunctional profile and an increased propensity to differentiate into adipocytes associated with the up-regulation of PPAR $\gamma$  and Adiponectin (ADIPOQ) [217] which are master regulators of adipocyte differentiation and metabolism. Similar results have been obtained in other T2DM rodent model and human T2DM-BMMSCs raising questions on BMMSCs function *in situ* for the bone homeostasis as well as on their use in the bone tissue cellular therapy and tissue engineering [222].

The regulation of the exact function of bone marrow adiposity in the T2DM context are largely unknown. In the present study, the osteocyte lacunae density was significantly higher and that of the apoptotic osteocytes dramatically (by 229%;  $p < 0.0001$ ) increased in the ZDF group compared to the ZL group. These data fit to that reported an increased lacunar density [223], sclerostin protein expression in the tibia of streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats [224] and a substantial accumulation of injured osteocytes with a proinflammatory signature in FED mice [225]. Our findings indicate a potential relationship between osteocytes and bone marrow adipose tissue but the exact roles that hyperglycemia play remains to be clarified.

AGES accumulate rapidly during hyperglycemia and induce oxidative stress; they are used in the present study to mimic T2DM microenvironment *in vitro*. The concentrations of AGES ranged from 50 to 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to reflect concentrations which are observed in diabetic patients [226]. Our results showed that AGES at 100 or 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  negatively impacted select functions of both non diabetic ZL- and T2DM ZDF- BMMSCs. In ZL-BMMSCs exposure to AGES resulted in a significant decrease of their viability, proliferation and migration (100-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). This is in line with other literature reports on rat BMMSCs [227–229] and human BMMSCs and adipose-derived stem cells harvested from a “non-diabetic” microenvironment [172,230]. In addition, AGES altered in ZL-BMMSCs the expression profile of genes relative to inflammation (IL1b) and differentiation (RankL). Similar observations have been reported regarding the expression of select chemokines/cytokines in human BMMSCs [229]. Interestingly, in non-diabetic rats BMMSCs, hyperglycaemic culture medium promotes cytokines expression and induces overexpression of RAGE while the use of the FPS-ZM1, an antagonist with strong affinity to RAGE, countered these effects [7]. The observed deleterious effects of AGES on ZL-BMMSCs could be correlated to that observed on ZDF-BMMSCs, harvested from a diabetic microenvironment. Indeed, compared to ZL-BMMSCs, ZDF-BMMSCs cultured *ex vivo* and under normoglycemic conditions exhibit also a reduced viability, proliferation and migration [217]. However, it is not known whether AGES-caused BMMSCs changes of functionality are permanent and further studies on the transient or not AGES effects on MSCs could be relevant to this topic.

Moreover, our results showed for the first time that ZDF-BMMSCs, derived from a T2DM microenvironment, were more “sensitive” to the AGES exposure. AGES affects more strongly their viability, proliferation and migration potential than their counterparts derived from ZL controls. Moreover AGES-induced gene profile also varied between the two cell populations. Especially, compared to ZL-BMMSCs, in ZDF-BMMSCs exposed to AGES (100mg/mL), the expression of Cxcl1, IGF-1 and HIF-1 $\alpha$  was increased. In addition, in ZDF-BMMSCs AGES had a significant ( $p<0,05$ ) inhibitory effect on the expression of RAGE. These findings suggest that longstanding T2DM induce changes that affect expression of RAGE and pathways involved in the AGES -mediated effects.

Direct modifications to the structure and function of proteins, lipids or nucleic acids, are caused by AGES [96–98], their interactions with their receptor RAGE induce the production of reactive oxygen species (ROS) in many types of cells [103]. Furthermore, Heidari et al observed that T2DM promotes the production of AGES and advanced oxidation protein products,

independently of glycaemic control and patient age [91]. Redox homeostasis plays an important role in preserving stem cell viability as well as reducing stem cell senescence. Production of ROS excess leads to oxidative stress and reduces stem cell proliferation and differentiation[231,232] In order to evaluate the different responses of diabetic ZDF-BMMSC cells compared to those of normal cells (ZL-BMMSC), we induced oxidative stress with AGEs and with stressors known to induce excess of mitochondrial ROS (mROS) by blocking the mitochondrial respiratory chain (AMA) or produce intracellular ROS (iROS) in the cell cytoplasm (AAPH, t-buOOH). The results showed that the two cell types react in a similar manner to induced stress and that stress induced by AGEs probably involves production of cytoplasmic iROS, however in our study we have no evidence of production the mROS. In a very recent study, Gu et al. showed that an AGEs precursor (Glycolaldehyde) leads renal mesangial cell to apoptosis though a mitochondrial dysfunction [233]. The oxidative stress generated could depend on both the type of AGEs and the cell type studied. Further studies on MSCs would therefore be relevant to elucidate the signalling pathways leading to impaired functionality of MSCs exposed to AGEs.

NAC is a potent inhibitor of ROS and has been widely used to block oxidative stress and its detrimental effects on stem cells [234,235]. We have previously shown a possible role for NAC in the protection of human adipose-derived MSCs under hypoxic conditions [236]. The ability of NAC to preserve cells cultured in vitro and injured tissues in vivo could be linked to its direct [237] and indirect [236,238] antioxidant properties. While the direct antioxidant effect is linked to ROS scavenging, the indirect antioxidant effect is probably due to its role as a precursor in the synthesis of GSH, a thiol-containing tripeptide that plays a key role in maintaining redox homeostasis.

In our study, the direct effect of NAC in blocking iROS showed that after one hour the two cell populations were maintained at the basal state of stress in the presence of NAC when the stress was induced by AAPH or t-buOOH. However, when stress is induced by AGEs, the presence of NAC was able to reduce the stress of diabetic cells by only 28%, while the reduction was 70% in normal cells. The indirect effect was studied by preconditioning cells with NAC overnight. In these conditions, NAC blocks iROS produced by the addition of AGEs in both cell types, however there is no significant decrease in iROS when stress is induced by AAPH or t-buOOH. Our results showed that diabetic cells were more sensitive to preconditioning NAC than normal cells.

## **Points importants et interface**

*Article 1 : « The protective effect of N-acetylcysteine on antimycin A-induced respiratory chain deficiency in mesenchymal stem cells »*

- L'antimycine A induit un dysfonctionnement du métabolisme énergétique des CSMs humaines ; la surexpression de HIF-1 $\alpha$ , une apoptose, avec une déformation du noyau, une rupture du cytosquelette, la surexpression des gènes liés à l'apoptose (PTEN, Casp3, Bax) ; une dépolarisation de la membrane mitochondriale et des dommages au niveau de l'ADN.
- La NAC restaure la survie des CSMs humaines soumises à un dysfonctionnement du métabolisme énergétique mitochondrial et protège l'ADN des dommages oxydatifs.
- La NAC n'a pas permis de restaurer le métabolisme énergétique mitochondrial.

*Article 2 : « Long standing DT2 modify N-acetylcysteine effects on oxydative stress induced by AGEs in mesenchymal stem cells »*

- Le DT2 de longue durée, affecte les populations cellulaires de la moelle osseuse et du tissu osseux environnant. La moelle osseuse est plus adipogénique et le réseau ostéocytaire est impacté.
- Les CSMs issues d'un microenvironnement DT2 sont plus « sensibles » aux AGEs, qui affectent plus fortement leur survie, prolifération et potentiel de migration que leurs homologues issues d'individus sains.
- Les AGEs génèrent un stress oxydatif intracellulaire très rapidement, constant, qui n'implique pas les mitochondries et ce, indépendamment de l'origine des CSMs
- La NAC diminue fortement le stress oxydatif intracellulaire généré par les AGEs.
- Les CSMs issues du microenvironnement DT2 ne présentent pas la même réponse à la NAC que leurs homologues issues d'individus sains

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) prélevées de la moelle osseuse, présentent des modifications qui les rendent dysfonctionnelles en présence d'AGEs. L'origine diabétique des CSMs, amplifie l'effet néfaste sur la survie, de la prolifération et de la migration et modifie l'expression génique en présence d'AGEs. Le stress oxydatif généré par les AGEs pourrait être en partie responsable du dysfonctionnement des CSMs. La NAC régule le stress oxydatif intracellulaire au niveau des CSMs diabétiques et saines. De plus, la NAC restaure la survie des CSMs humaines soumises à des conditions « mimant » l'environnement hypoxique *in vitro* et elle protège des dommages oxydatifs sur l'ADN. L'utilisation des CSMs en thérapie cellulaire dans un contexte diabétique nécessite de trouver un moyen de protéger les cellules du stress oxydatif.

## Chapitre III POTENTIEL DE L'ASTAXANTHINE POUR RETABLIR L'EQUILIBRE REDOX DES CSMs, DANS LE CONTEXTE DT2, ET LA REPARATION OSSEUSE

Revue : Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications

Rebecca Landon, Virginie Gueguen, Hervé Petite, Didier Letourneur, Graciela Pavon-Djavid, Fani Anagnostou  
Publié dans le journal Marine drugs

Article : The protective effect of Astaxanthin on MSCs mediated osteogenesis, in diabetes type 2 context

Rebecca Landon, William Bakari, Abolfazl Barzegari, Nathanael Larochette, Olivier Thibaudeau, Hanane El-Hafci, Virginie Gueguen, Graciela Pavon-Djavid, Fani Anagnostou  
En préparation

Ce chapitre met l'accent sur l'utilisation de complexes antioxydants à base de Cyclodextrine-Astaxanthin (CD-A) pour la réparation osseuse. Il est présenté sous la forme hybride avec dans un premier temps, une revue bibliographique en anglais « Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications » publiée dans le journal Marine Drugs, qui met en avant l'intérêt de l'astaxanthine, un antioxydant naturel très puissant, dans un contexte diabétique. Dans un second temps nous présenterons des résultats de synthèse, caractérisation et effets *in vitro* de complexes CD-A en normoglycémie sur des CSMs de moelle osseuse issues ou non d'un microenvironnement DT2. Enfin nous présenteront des résultats préliminaires d'implantation de complexes CD-A *in vivo* dans un modèle de défaut osseux sub-critique chez le rat non diabétique Wistar.

## Contenu de la section :

<b>REVIEW: IMPACT OF ASTAXANTHIN ON DIABETES PATHOGENESIS AND CHRONIC COMPLICATIONS</b>	<b>100</b>
<b>ARTICLE : THE PROTECTIVE EFFECT OF ASTAXANTHIN ON MSCS MEDIATED OSTEOGENESIS, IN DIABETES TYPE 2 CONTEXT</b>	<b>121</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>122</b>
<b>2 MATERIEL ET METHODES</b>	<b>123</b>
<b>2.1 SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DES COMPLEXES CD-A</b>	<b>123</b>
2.1.1 <i>Synthèse</i>	123
2.1.2 <i>Caractérisation</i>	124
2.1.3 <i>Test de la capacité antioxydante contre les radicaux d'oxygène (ORAC)</i>	125
<b>2.2 EFFET DES CD-A SUR LES CSMs IN VITRO</b>	<b>125</b>
2.2.1 <i>Évaluation de la cytotoxicité par MTT</i>	125
2.2.2 <i>Mesure de l'activité antioxydante intracellulaire des CD-A</i>	126
2.2.3 <i>Expression génique</i>	126
<b>2.3 ÉTUDE IN VIVO</b>	<b>127</b>
2.3.1 <i>Synthèses des hydrogels</i>	127
2.3.2 <i>Animaux et modèle expérimental</i>	128
2.3.3 <i>Protocole chirurgical</i>	128
2.3.4 <i>Analyse micro-CT</i>	129
2.3.5 <i>Histologie</i>	131
<b>3 RESULTATS</b>	<b>132</b>
<b>3.1 CARACTERISATION</b>	<b>132</b>
3.1.1 <i>Capacité antioxydante des CD-A contre les radicaux d'oxygène</i>	133
<b>3.2 EFFET DES CD-A SUR LES CSMs IN VITRO</b>	<b>133</b>
3.2.1 <i>Cytocompatibilité des complexes CD-A</i>	133
3.2.2 <i>Effet antioxydant des CD-A sur les ROS intracellulaires</i>	135
3.2.3 <i>Effet de CD-A sur l'expression de gènes relatif à l'ostéogénèse et l'inflammation</i>	139
<b>3.3 ÉTUDE IN VIVO</b>	<b>141</b>
3.3.1 <i>Analyse micro-CT</i>	141
3.3.2 <i>Histologie</i>	142
<b>4 DISCUSSION ET CONCLUSION</b>	<b>143</b>
<b>5 ANNEXE</b>	<b>146</b>
<b>6 POINTS IMPORTANTS</b>	<b>147</b>



## **Review: Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications**

*Revue : Impact de l'Astaxanthine sur la pathogénèse du diabète et les complications chroniques associées*



### **Résumé**

Le stress oxydatif joue un rôle essentiel dans l'apparition, la progression et le développement des complications chroniques du diabète sucré. Il a été démontré que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) induites par l'hyperglycémie réduisent la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas, altèrent la sensibilité et la signalisation dans les tissus répondant à l'insuline, et modifient la fonction des cellules endothéliales à la fois dans le diabète de type 1 et de type 2. En tant que puissant antioxydant sans effets secondaires, l'astaxanthine (ASX), un caroténoïde xanthophylle, a été suggérée pour contribuer à la prévention et au traitement des pathologies associées au diabète. L'ASX réduit l'inflammation, le stress oxydatif et l'apoptose en régulant différentes voies, bien que le mécanisme exact ne soit pas bien défini. D'après plusieurs études menées sur des modèles animaux de diabète de type 1 et de type 2, l'ASX administré par voie orale ou parentérale améliore la résistance à l'insuline et la sécrétion d'insuline, réduit l'hyperglycémie et exerce des effets protecteurs contre la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. Cependant, un soutien expérimental plus important est nécessaire pour définir les conditions de son utilisation. De plus, son efficacité chez les patients diabétiques est peu étudiée. Dans la présente étude, nous avons cherché à identifier les effets biologiques actuels et les mécanismes sous-jacents de l'ASX sur les troubles métaboliques associés au diabète induits par les ROS et les complications qui en découlent. Le développement d'une recherche approfondie pour mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués et pour identifier le dosage et la voie d'administration de l'ASX les plus efficaces est jugé nécessaire.

**Mots-clés :** ROS ; antioxydant ; astaxanthine ; complication du diabète ; diabète sucré ; néphropathie diabétique ; neuropathie diabétique ; rétinopathie diabétique ; hyperglycémie ; résistance à l'insuline ; stress oxydatif.

Review

# Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications

Rebecca Landon <sup>1</sup>, Virginie Gueguen <sup>2</sup>, Hervé Petite <sup>1</sup>, Didier Letourneur <sup>2</sup> ,  
Graciela Pavon-Djavid <sup>2</sup>  and Fani Anagnostou <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR7052-INSERM U1271, Laboratory of Osteoarticular Biology, Bioengineering and Bioimaging, Paris Diderot University, 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris, France; rebecca.landon@inserm.fr (R.L.); herve.petite@univ-paris-diderot.fr (H.P.)

<sup>2</sup> INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Cardiovascular Bioengineering, Sorbonne University Paris Nord, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, 93430 Villetaneuse, France; virginie.gueguen@sorbonne-paris-nord.fr (V.G.); didier.letourneur@inserm.fr (D.L.); graciela.pavon@univ-paris13.fr (G.P.-D.)

<sup>3</sup> Service of Odontology, Hôpital Pitié-Salpêtrière APHP, U.F.R. of Odontology, Denis-Diderot University, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

\* Correspondence: fani.anagnostou@univ-paris-diderot.fr; Tel.: +33-(0)1-57-27-85-70

Received: 15 June 2020; Accepted: 7 July 2020; Published: 9 July 2020



**Abstract:** Oxidative stress (OS) plays a pivotal role in diabetes mellitus (DM) onset, progression, and chronic complications. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species (ROS) have been shown to reduce insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells, to impair insulin sensitivity and signaling in insulin-responsive tissues, and to alter endothelial cells function in both type 1 and type 2 DM. As a powerful antioxidant without side effects, astaxanthin (ASX), a xanthophyll carotenoid, has been suggested to contribute to the prevention and treatment of DM-associated pathologies. ASX reduces inflammation, OS, and apoptosis by regulating different OS pathways though the exact mechanism remains elusive. Based on several studies conducted on type 1 and type 2 DM animal models, orally or parenterally administrated ASX improves insulin resistance and insulin secretion; reduces hyperglycemia; and exerts protective effects against retinopathy, nephropathy, and neuropathy. However, more experimental support is needed to define conditions for its use. Moreover, its efficacy in diabetic patients is poorly explored. In the present review, we aimed to identify the up-to-date biological effects and underlying mechanisms of ASX on the ROS-induced DM-associated metabolic disorders and subsequent complications. The development of an in-depth research to better understand the biological mechanisms involved and to identify the most effective ASX dosage and route of administration is deemed necessary.

**Keywords:** astaxanthin; diabetes mellitus; oxidative stress; hyperglycemia; diabetes complication; diabetic retinopathy; diabetic neuropathy; diabetic nephropathy; insulin resistance; antioxidant; ROS

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM), the most common metabolic disease, has become a major health concern with increasing prevalence worldwide. Currently, 463 million people (9.3% of adults aged 20–79 years) are living with diabetes around the world. A further 1.1 million children and adolescents under the age of 20 live with type 1 diabetes (T1DM) [1]. This number is projected to increase to 578 million by 2030. The financial burden of DM is also staggering. The cost of the total diabetes-related healthcare is estimated to be around \$760 billion and has been projected to reach up to \$825 billion in the next 10 years. DM is a chronic disease that is recognized by hyperglycemia (HG) resulting from impaired insulin

secretion, inappropriate insulin action, or both. The insulin deficit leads to high levels of blood glucose (HG), which, if not tightly controlled, leads to disabling and life-threatening health complications including cardiovascular diseases, retinopathy, neuropathy, nephropathy, and prolonged/incomplete wound healing [1]. Moreover, DM increases bone fragility and impaired bone healing [2,3]. The main categories of DM are type 1 (T1DM), type 2 (T2DM), and gestational DM. From these three types, T2DM is the most common type, accounting for around 90% of all diabetes worldwide.

The development of DM and its complications are known to be associated with oxidative stress (OS) and low-grade chronic inflammation [4]. OS, an imbalance between cellular oxidant and antioxidant systems, results from the overproduction of free radicals and associated reactive oxygen species (ROS). HG upregulates the markers of chronic inflammation and contributes to increased ROS generation, which ultimately involves DM complications including vascular dysfunction [5]. Moreover, an increased level of ROS reduces insulin secretion and impairs insulin sensitivity and signaling in insulin-responsive tissues [5]. Proper treatment of HG and inhibition of ROS overproduction is, therefore, crucial for delaying the DM onset and progression as well as for preventing its subsequent complications.

Recent advances in biological properties of antioxidants such as carotenoids have suggested that these compounds are not only able to prevent but also able to ameliorate diabetes and its subsequent complications [6]. In particular, astaxanthin (ASX) (3,3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta'$ -carotene-4,4'-dione), a xanthophyll carotenoid [7], has been reported to exhibit multiple biological activities including modulation of OS and inflammation through free radical quenching [8] and activation of endogenous antioxidant systems via modulation of gene expression [9,10] and has numerous advantages compared to some other carotenoids. Due to its unique structure, ASX is incorporated in the lipid bilayer of cellular membranes, without damaging it, and prevents lipid-based oxidation [11]. Moreover, its bioactivity is by far higher than other carotenoids such as  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene [12], and  $\alpha$ -tocopherol [13,14]. It has therefore attracted considerable interest because of its potential pharmacological effects including antidiabetic, anti-inflammatory, and antioxidant activities properties and anti-inflammatory; antidiabetic; as well as its neuro-, nephro-, and retinoprotective and cardiovascular effects [6].

Given the crucial role of OS and inflammation in the pathogenesis and subsequent complications of DM, in this review, we aimed to analyze the biological effects and the underlying mechanisms of ASX on the prevention and the treatment of DM-associated pathologies.

## 2. Pathophysiology of Diabetes-Related Metabolic Disorders and Complications Focus on the Hyperglycemia–Oxidative Stress Interactions

T1DM and T2DM are complex conditions characterized by elevated blood glucose levels due to impaired insulin production and/or to a reduced insulin sensitivity and function. T1DM is caused by the autoimmune-mediated destruction of Langerhans-islet- $\beta$ -cells and is mainly associated with failure in insulin production, while T2DM is associated with chronic abnormalities of carbohydrate and fat metabolisms in which triggering various pathways induces impaired insulin secretion from the pancreatic  $\beta$ -cells, insulin resistance, reduced glucose utilization in peripheral tissues, and increased hepatic glucose production [15]. In both T1DM and T2DM, chronic HG leads to macro- and microvascular complications [16]. Today, it is admitted that OS and ROS are involved in the pathogenesis of impaired insulin secretion from the pancreatic  $\beta$ -cells, insulin resistance development, and endothelial dysfunction in both T1DM and T2DM [15–17] and are deeply altered by oxidation DNA, RNA, protein, and lipid molecules which can be used as possible markers for disease progression [16].

In diabetes-related pathologies, ROSs play a central role in the interactions involving metabolic control, OS, and inflammation [4,18]. ROSs are a family of species including molecular oxygen and its derivatives: superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), nitric oxide (NO), peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), hydroxyl (HO), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hypochlorous acid (HOCl), and lipid radicals. Out of these molecules, superoxide has been the initial oxygen free radical, which is then converted into other more reactive species that can impair cell function. They are produced in aerobic metabolism at very low levels and play a crucial role in cell signaling homeostasis [19]. ROSs are mainly produced

in the mitochondrial electron transport chain (ETC), endoplasmic reticulum (ER), peroxisomes, and microsomes [4]. Overproduction and/or insufficient removal of excessive ROS by endogenous antioxidant systems result in damage to cellular proteins, membrane lipids, and nucleic acids, thereby leading to OS. Besides antioxidant components such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH), different cellular compartments (nucleus, cell membrane, and mitochondria) contribute differently to the ROS balance [18].

In HG conditions and/or fatty acid oxidation, therefore, ROS overproduction causes cellular dysfunction, apoptosis, and inflammation in several insulin targets including the pancreas, liver, kidney, nerves, and vasculature [17,18].

For instance, in T1DM, the generated ROS under metabolic or autoimmune stress in the cells of the pancreatic microenvironment may enhance damage of pancreatic  $\beta$ -cells, thereby reducing insulin secretion [17]. Regarding T2DM, HG-induced ROS production is considered a major contributor to damage and disease progression. HG leads to glucose autooxidation, alters mitochondrial dynamics, and enhances ROS production. The induced OS reduces insulin secretion and impairs insulin signaling in target tissues [20]. ROS overproduction is also the underlying contributor to the development of vascular complications of DM [18]. Specifically, in the HG-induced vascular damage, several mechanisms are involved: (1) increased flow of glucose mediated by the activation of the polyol pathway, (2) increased intracellular formation of advanced glycation end-products (AGE), (3) increased expression of the AGE receptor and activation of the ligands, (4) protein kinase C (PKC) isoforms activation, and (5) hyperactivity of the hexosamine pathway. Today, it has been widely accepted that all of these pathogenic mechanisms stem from the HG-induced overproduction of the superoxide anion radical ( $\bullet\text{O}^{2-}$ ) in the mitochondrial ETC.

Specifically, high levels of blood glucose increase AGE formation and subsequent OS [21]. AGE accumulation has been related to diabetes as well as its associated complications, although the signaling pathways and underlying mechanisms are not yet clearly defined. AGEs, via their receptors including AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H, AGE-R3/galectin-3, lectin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1), as well as receptor for advanced glycation end products (RAGE) mediate ROS production and increase the intracellular levels of oxygen derivatives such as  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}^{2-}$ , and NO. AGE interaction with its receptor RAGE induces an increase of NADPH oxidase (NOX): NOX1, NOX2, and NOX4 mRNA levels and activates it. In addition, it activates the mitochondrial respiratory chain, microsomal enzymes, and xanthine oxidase and enhances the release of arachidonic acid metabolites [21]. Moreover, AGE-induced ROS upregulates the expression and activities of antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase (GPx), and SOD. AGE-induced increased ROS formation also modulates the signal transduction pathways such as RAS/MEK/extracellular signal-related kinases 1/2 (ERK1/2), phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt), or p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) p21RAS; enhances nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) translocation and activation; and finally induces inflammation, apoptosis, and proliferation by NOD-like receptor protein 3 (NLRP-3) inflammasome and the production of several cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) [21]. Many studies have shown increased circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in rodents and T2DM patients [22]. These cytokines impair insulin signaling and peripheral glucose uptake and contribute to insulin resistance, lipolysis, and hepatic glucose production.

### 3. Astaxanthin: Biological Effect on Diabetes Onset, Progression, and Chronic Complications

#### 3.1. General Aspects of Astaxanthin: Structure, Sources, Bioactivity, and Administration Toxicity

##### 3.1.1. Sources and Chemical Structure of Astaxanthin

ASX is one of the most powerful carotenoids with antioxidant activity which is produced naturally or chemically. Natural sources of ASX include various microorganisms and marine animals such as yeast, microalgae, trout, salmon, krill, shrimp, and crayfish; complex plants; and some birds. ASX is not

synthesized in the human body but is ingested in the diet, in particular by seafood [23]. Commercialized ASX is often extracted from *Phaffia rhodozyma*, *Blakeslea trispora*, and *Haematococcus pluvialis* as well as is produced by chemical synthesis. *H. pluvialis*, the main source of natural ASX for human consumption, is a unicellular green microalga which accumulates ASX under environmental stress conditions such as starvation, irradiation, high salinity, temperature, or light [24,25]. ASX was authorized in 1987 by the United States Food and Drug Administration (US FDA) as a fish feed additive and then was approved as a dietary supplement in 1999 [26]. ASX has also been registered as a fish feed additive by the European Food Safety Authority (EFSA). According to the Novel Foods Regulation (EU) 2015/2283, ASX from *H. pluvialis* has an acceptable daily intake in human up to 8 mg [27]. The *H. pluvialis*-extracted ASX included in human dietary supplements has been proven to be safe and accepted by the US FDA at daily doses of 2–12 mg [28,29].

ASX (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotene-4,4'-dione, molecular formula  $C_{40}H_{52}O_4$ , molar mass 596.84 g/mol) is a xanthophyll carotenoid which is composed of 40 carbon atoms organized in two oxygenated  $\beta$ -iononetype rings joined by a polyene chain [7,30,31]. The conjugated double bond chain acts as a strong antioxidant by electron donation and by reacting with free radicals [32]. Hydroxyl acid on terminal rings can react with fatty acids and can form monoesters and/or diester. In nature, ASX can also exist conjugated with proteins (e.g., salmon muscle or lobster exoskeleton). Interacting with fatty acids or proteins stabilizes ASX, which in its free form is unstable and particularly susceptible to oxidation; therefore, this form is mainly produced synthetically or from yeast [32]. ASX can be naturally found in stereoisomers, geometric isomers, and free and esterified forms. Moreover, synthetic ASX may have different conformations including chiral ((3S, 3'S) or (3R, 3'R)) or meso forms (3R, 3'S); however, the chiral stereoisomers are the most prevailing forms. In addition, the polyene chain double bond can be organized as two different conformations: cis or trans. Trans-isomers remain the most widespread form due to the thermodynamic instability of cis carotenoids [11].

### 3.1.2. Administration Doses and Toxicity Studies

Solving ASX stability drawbacks and parenteral administration problems are of crucial importance for the development of ASX-based therapy. In order to encapsulate, deliver, protect, and/or enhance its in vivo stability, several vectors including polymeric systems, lipid-based carriers, and inclusion complex using cyclodextrins have been proposed [33,34]. A polymeric matrix or a coating layer around a particular compound provides a physical barrier, preserves its biological activity, and enhances its physicochemical stability [23,35,36]. Lipid-based carriers based on microemulsion, nanoemulsion, or an association of both referred as solid lipid nanoparticles or nanostructured lipid carriers were shown to stabilize ASX [33,37,38]. A clinical trial revealed the improvement of ASX bioavailability when incorporated into a lipid-based carrier [39].

Nanoemulsions formulated with ASX and  $\alpha$ -tocopherol were administered locally to streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice wounds; a faster wound closure was seen. The tissue composition in the presence of nanoemulsion was characterized by an abundance of inflammatory cells, fibroblast formation, and collagen syntheses [40]. Cyclodextrins and natural macrocyclic oligosaccharides were also proposed as an encapsulation system of choice to solubilize ASX due to their toroid-shaped structures combining a rigid lipophilic cavity to a hydrophilic outer surface [41,42]. The noncovalent association of the latter with cyclodextrin improves its solubility in water, bioavailability, stability [43], and release [44,45]. The local delivery of cyclodextrin–ASX complexes from biocompatible polyvinyl alcohol-dextran hydrogels was shown to block OS [36]. In addition, in an ischemic rat model, the same systems neutralized excessive ROS and modulated the expression of endogenous antioxidant genes, suggesting that local release of ASX may reduce the damage to tissues by activating endogenous antioxidant pathways [42].

After oral administration, ASX esters are hydrolyzed selectively during absorption within the intestine and are transported through circulation to the tissues [46]. Due to the presence of polar ends in its structure, ASX can be absorbed better than other nonpolar carotenoids such as lycopene and



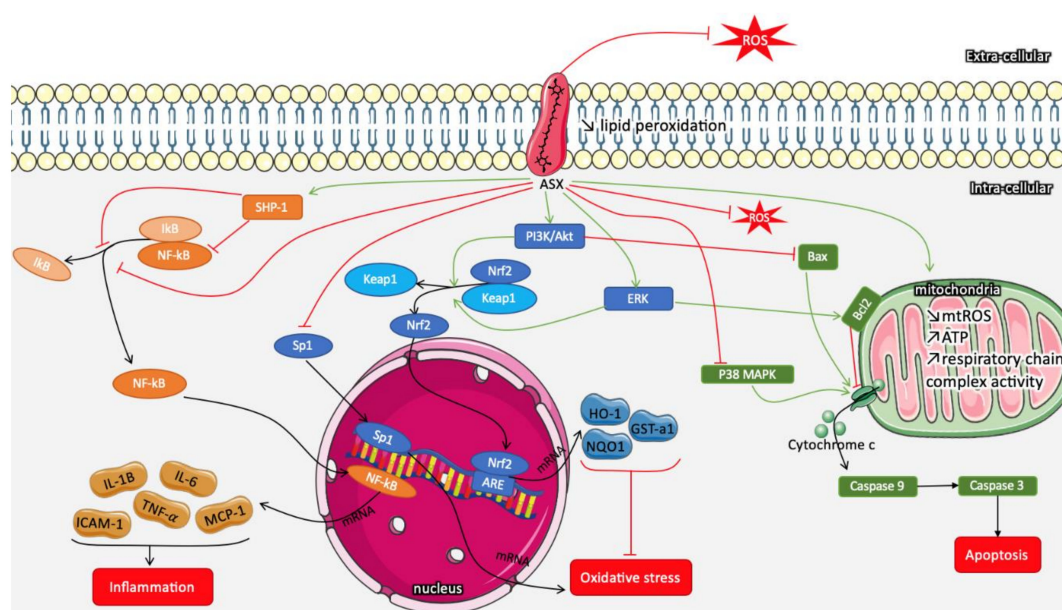
$\beta$ -carotene [24]. However, its limited solubility in digestive fluids compromises the uptake by intestinal epithelial cells and its final secretion to lymph as chylomicrons [47,48]. The mechanism involved in absorption, metabolic conversion of ASX, and excretion is not completely elucidated. Besides the chemical structure, the absorption and bioavailability of ASX are influenced by a variety of parameters such as age, gender, smoking, fat, food intake, and so on [49]. Various studies have tested dosages of natural ASX ranging from 1–4 mg/day to 100 mg/day of synthetic ASX and reported a nonlinear dose response for plasma concentrations as well as a lower bioavailability of esterified ASX [49].

From a safety perspective, studies on oral administration of natural ASX have not documented negative effects [27]. For instance, oral administration of high doses (up to 1240 mg/kg/day) over a long period of time (90 days) in rats did not exhibit any toxic effect [50]. In addition, in humans, natural ASX ranging from 8 to 45 mg/day over 4 to 12 weeks showed low adverse effects [51]. ASX has an excellent clinical safety, even when compared to the placebo in randomized studies, at low (up to 12 mg) or high (up to 100 mg) doses of daily administration [27]. Nowadays, only natural ASX has been reported as a human dietary supplement [7], and although in vivo preclinical studies on rats tested the actual safe human doses at least 100–800 times, no critical adverse effect was observed. Safety parameters and specific dose activities in humans should therefore be investigated [52].

Since 2010, 34 clinical studies have been reported on the use of ASX [53], from which 22 have been completed until now. ASX has mainly been tested as a dietary supplement alone or in combination with other molecules for safety and pharmacokinetic information or on various pathologies associated to OS (e.g., stroke, infertility, hyperlipidemia, skin aging, and cognitive dysfunction). Currently, two studies are recruiting to investigate the potential of antioxidant therapy (ASX combined with lutein, zeaxanthin, vitamin C, vitamin E, zinc, and copper as a daily administered drug) for diabetic retinopathy (unpublished data, clinical trials N° NCT03310359 and N° NCT03702374). The study of antioxidant therapy involving ASX for diabetic retinopathy has been completed; however, the results have not been published yet. Emerging clinical studies using ASX for diabetic complications treatment reflect the medical interest for this antioxidant.

### 3.1.3. Bioactivity of Astaxanthin

At cellular and molecular levels, ASX acts against oxidative damage through various mechanisms (Figure 1) including quenching singlet oxygen, scavenging radicals, inhibiting lipid peroxidation, and regulating OS-related gene expression [54]. ASX's antioxidant potential is largely attributed to its interactions with cell membrane lipids [55]. In contrast to other carotenoids, such as lycopene and  $\beta$ -carotene, ASX, thanks to its polar structure, is incorporated in the membrane without disorganizing it, decreases lipid hydroperoxide levels, and does not exhibit harmful pro-oxidative effects [56]; in fact, ASX inhibition of lipid peroxidation is related to its ability to trap ROS within and on both sides of the membrane [57,58]. Growing evidence suggests that ASX improves mitochondrial function by reducing mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) production and by increasing ATP production, mitochondrial content, and respiratory chain complex activity [59].



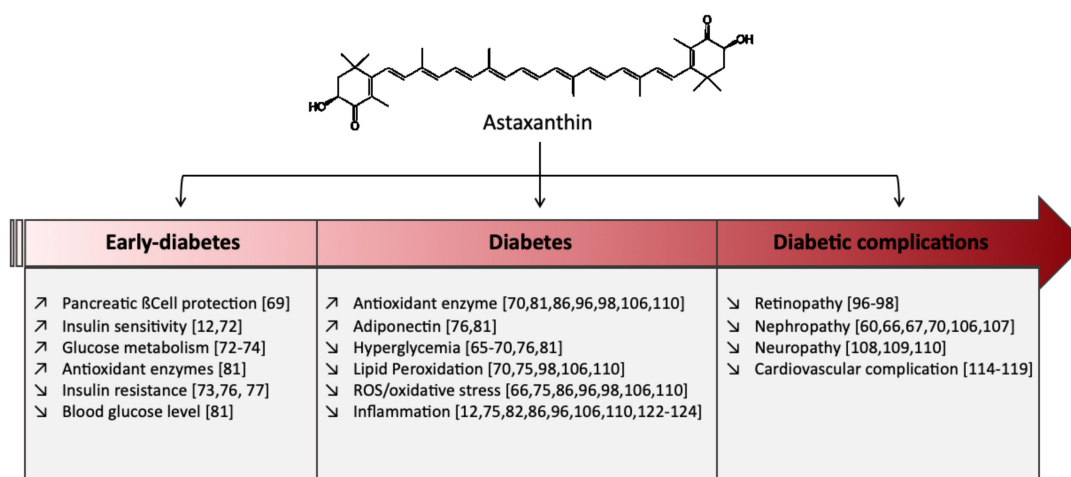
**Figure 1.** Schematic representation of molecular pathways implied in the protective potential of astaxanthin (ASX): Due to its membrane penetrance, ASX has both intra- and extracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging actions. Moreover, in the phospholipid membrane, the ASX polyene chain participates in the reduction of lipid peroxidation. Through the regulation of different pathways, ASX reduces inflammation, oxidative stress, and apoptosis. Red arrows indicate inhibitory action, and green arrows show enhancement action.

Parallel to natural scavenging, in STZ-induced diabetic rats (12 weeks), ASX regulates intracellular OS by mainly activating MAPK, PI3K/Akt, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathways [60]. Activation of PI3K/Akt and ERK pathways facilitates the dissociation and translocation of Nrf2 to the nucleus. Nrf2/ARE increases the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) quinone dehydrogenase 1 (NQO1), and Glucathione S-transferase alpha1 (GST- $\alpha$ 1) and leads therefore to an endogenous antioxidant response [52]. ASX was proven to ameliorate early brain injury by the activation of Nrf2/ARE signaling pathways in an experimental subarachnoid hemorrhage rat model [61]. In addition, ASX inhibits the specificity protein 1 (Sp1)/N-Methyl-d-aspartic acid (NMDA) receptor subunit 1 (NR1) pathway, which is involved in intracellular ROS production [54,59].

ASX, through PI3K/Akt and ERK activation, also regulates the Bax/Bcl2 pathway, which reduces cytochrome c release from mitochondria and decreases caspase 3-related apoptosis (reduction of mitochondrial permeabilization). In endothelial cells, under OS, ASX treatment significantly activates PI3K/Akt and reduces the expression of both endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and Bax genes [34]. Moreover, ASX decreases caspase-associated apoptosis by modulating the p38 MAPK pathway [62]. Finally, ASX modulates inflammatory response by inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines (e.g., interleukin-1B (IL-1B), interleukin-6 (IL-6), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)) through the activation of reactive oxygen species (SHP-1), which suppresses NF- $\kappa$ B expression and I $\kappa$ B degradation. ASX also has a direct inhibitory effect on I $\kappa$ B liberation, preventing the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and increasing the anti-inflammatory effect [10,52,63]. The ASX pleiotropic effect was also related to decreased expression of ER markers [64]. For instance, in human liver hepatocellular carcinoma (HepG2), ASX reduces the expression of molecules such as glucose-regulated protein 78 (GRP78), growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34), C/EBP homologous protein (CHOP), activating transcription factor 4 (ATF4), activating transcription factor 6 (ATF6), and X-box binding protein 1 (XBP1), which are involved in ER stress-induced apoptosis.

### 3.2. Antidiabetic Effects of Astaxanthin

ASX has shown some beneficial effects on the prevention and treatment of diabetes [6]. These effects depend on how advanced the disease is as well as on the type of complications observed. Figure 2 summarizes the main effects described in the literature. For example, in clinical studies, oral administration of ASX (8 mg/day for 8 weeks) to patients with T2DM significantly reduced the fructosamine and plasma glucose concentrations [65]. ASX also improves glucose metabolism and reduces blood pressure in patients with T2DM.



**Figure 2.** Beneficial effects of astaxanthin at different developmental stages of diabetes mellitus (DM) and its complications.

The antidiabetic effect of ASX has been studied in different animal models with variable outcomes (Figure 2) though the underlying mechanisms have not been clearly elucidated. Oral administration of ASX significantly reduced fasting blood glucose in db/db mice, a well-known obese model for T2DM [66–69]. A long-term administration of ASX (35 mg/kg for 12 weeks) showed that hypoglycemic effect is linked with a lower malondialdehyde (MDA) content and enhanced SOD activity in serum [70]. In the same animal model, in the presence of ASX (1 mg/day for 18 weeks), pancreatic  $\beta$ -cells were protected against glucose toxicity as they preserved their ability to secrete insulin. The non-fasting blood glucose level was also significantly reduced [69]. Kitahara et al. reported that ASX can also prevent pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction by protecting them from ER stress-mediated apoptosis [71]. In pancreatic  $\beta$ -cells mouse insulinoma (MIN6), palmitate-treated, ASX on the one hand reduced MCP-1 and, vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion through the, c-Jun N-terminal kinases (JNK) and PI3K/Akt pathways and on the other hand attenuated ER stress by reducing CHOP and by upregulating the expression of GRP78, which is an ER chaperone [71].

Besides the glucose-lowering effect, animal studies have demonstrated that ASX improves insulin sensitivity and glucose uptake, thereby lowering insulin resistance, the hallmark of T2DM. Arunkumar et al. [72] reported that ASX (6 mg/kg per day for 45 days) significantly lowered plasma glucose and insulin levels in HFFD (high fat fructose diet)-fed mice and improved insulin sensitivity. Moreover, ASX potentiates post-receptor insulin signaling events by enhancing the autophosphorylation of insulin receptor- $\beta$  (IR- $\beta$ ), IRS-1 associated PI3-kinase step, phospho-Akt/Akt ratio, and GLUT-4 translocation in skeletal muscles [72]. Yasuhiro Nishida et al. also showed improved glucose metabolism by enhancing glucose incorporation into skeletal muscles in ASX-treated HFD mice [73]. In this study, ASX administration significantly ameliorated insulin resistance and glucose intolerance through the regulation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation in the muscle, independent of its antioxidant activity. In addition, it stimulated muscle mitochondrial biogenesis [73].



Furthermore, ASX improves glucose metabolism by increasing glycogen reserves in the liver [74]. It modulates the activity of metabolic enzymes such as hexokinase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-bisphosphatase, and glycogen phosphorylase. It also promotes the IRS-PI3K-Akt pathway of insulin signaling by decreasing serine phosphorylation of IRS proteins. In STZ-induced diabetic rat, a well-known T1DM model, the treatment with ASX (50 mg/kg body weight/day; 18 days), significantly decreased the levels of AGEs, ROS, and lipid peroxidation in the liver of diabetic rats. These results suggested that the inhibitory effect of ASX on diabetes-induced hepatic dysfunction could be linked to the blocking of AGE formation and further anti-inflammatory effect [75].

Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia are strongly associated with obesity, dyslipidemia, and hypertension in the metabolic syndrome. The effect of ASX was also evaluated on several parameters of metabolic syndrome [6,76]. Hussein et al. reported that a 22-week ASX administration (50 mg/kg/day) in SHRcp (spontaneous hypertensive rat (SHR)/NDmcr-cp (cp/cp)) rats reduced the fasting blood glucose level and improved insulin sensitivity and lipid metabolism parameters including serum adiponectin [76]. Further, it has been shown that ASX administration for 10 weeks prevented and reversed hepatic insulin resistance and ameliorated hepatic steatosis in both genetically (ob/ob) and high-fat-diet-induced obese mice [77]. Moreover, these results were associated with enhanced insulin-stimulated phosphorylation of the insulin receptor (IR)- $\beta$  subunit (p-IR $\beta$ ) and Akt (p-Akt) in the livers of CL (cholate)+ASX mice compared with CL mice [77]. ASX may also modulate interactions of peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR $\gamma$ ) with transcriptional intermediary factor 2 (TIF2), steroid receptor coactivator-1 (SRC-1), 3T3-L1 cell differentiation, and lipid accumulation. PPAR $\gamma$  activation results in changes in adipokine production and in decreased inflammation of adipose tissue, thereby leading to improved insulin sensitivity in the liver and skeletal muscle [12]. Besides PPAR $\gamma$ , ASX activates peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR $\alpha$ ), known to play a role in the regulation of lipid and cholesterol homeostasis [78,79]. ASX diluted in flaxseed oil has been shown to reduce hepatic steatosis as well as hepatic triglycerides and total cholesterol in high-fat diet-fed Sprague–Dawley rats [80]. More specifically, it reduces fatty acid synthesis by increasing PPAR $\alpha$  activity and by lowering lipogenic transcriptional factors and other lipogenic enzymes. Ravi Kumar et al. described the effect of ASX administration combined with squalene in mice fed with high-fat-high-sucrose diet on glucose/triglyceride levels. Blood glucose levels were decreased while adiponectin levels and mRNA expression of Sod1 and GPx were increased, underlining a possible benefit of utilizing the two drugs together for the management of obesity/diabetes [81]. ASX significantly reduces also the expression of ER stress markers (eIF2 $\alpha$  (Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha), PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), and Bip (immunoglobulin heavy chain-binding protein)) in high fat fructose fed mice. eIF2 $\alpha$  and PERK are implicated in lipogenesis (that also exacerbate ER stress). and Bip stimulates mitochondrial ROS production [82].

Interestingly, recent studies have shown that oral administered ASX n-octanoic acid diester, a more stable ASX formulation, in high-fat and high-sucrose diet-fed mice improves insulin resistance by modulating gut microbiota [83]. Moreover, it has also been reported that changes in the gut microbiota induced by *Xanthophyllomyces dendrorhous*-derived ASX administration in high fat fed mice were correlated with changes to some extent in triglyceride and total cholesterol plasma levels [83,84].

On the contrary, some other studies reported no significant influences on glucose/insulin metabolism. For instance, Chan et al. reported no significant hypoglycemic effect of ASX [85]. Preuss et al. examined several parameters of metabolic syndrome in Zucker fatty rats (ZFR); they failed to show an ASX effect on insulin sensitivity [86] at low doses and observed a modulation of glucose-insulin metabolism and nitric oxide at relatively high doses [86]. Differences in administered doses and/or animal species used among several studies are plausible explanations of the variation in results and stands for a need to further investigate.

### 3.3. Astaxanthin: Protective Effects on Diabetes Complications

OS is a common denominator link for the major pathways involved in the pathogenesis of diabetic micro- as well as macrovascular complications [87]. Hyperglycemia induces the overproduction of mitochondrial superoxide in endothelial cells of both large and small vessels as well as the myocardium. In microvasculature, the intracellular, increased superoxide production causes vascular damage via multiple metabolic pathways including AGE accumulation, AGE receptors, the protein kinase C (PKC) pathway, the polyol pathway, and the hexosamine pathway activation [88]. Inflammation may also play a key role in the development and the progression of diabetes complications [89]. In diabetic macrovascular complications and in the heart, vascular damage appears to be a consequence of increased oxidation of fatty acids, resulting in part in pathway-specific insulin resistance [88].

Owing to its molecular structure, ASX is one of the few antioxidants that can move throughout the body and can provide protection to all of our cells. ASX may help in preventing and treating diabetic microvascular complications by modulating OS, inflammation, and apoptosis through free radical quenching [8]. Although the exact mechanism remains elusive, ASX has been reported to exert beneficial effects in preventing DM complications including retinopathy, nephropathy, neuropathy, and wound healing in numerous diabetic models in animal studies. The recommended dose for reaching positive outcomes with diabetic complications should be addressed in adequate human trials that would evaluate the efficacy and safety of ASX considering the bioavailability, individual response, metabolism, tissue delivery, and possible toxicity.

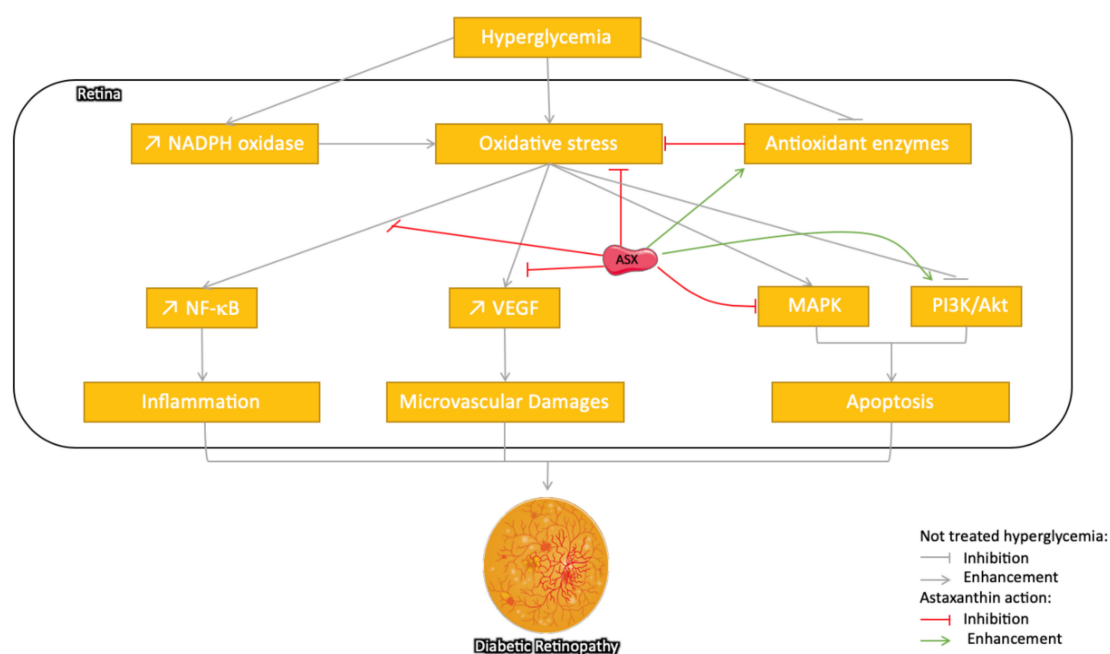
#### 3.3.1. Astaxanthin: Protection against Diabetic Retinopathy

Astaxanthin has recently been reviewed to have a beneficial pleiotropic effect in the prevention and treatment of several ocular diseases due to its anti-inflammatory, antioxidant, and metabolism regulatory effect [90]. Diabetic retinopathy (DR) is one of the major microvascular complications of diabetes and the most frequent cause of acquired blindness in adults [91]. It is a slow progressive chronic disease, and its prevalence is augmented by the duration of diabetes. The pathophysiology of diabetic retinopathy is complex, as many metabolic changes affect different cell types in the retina. Chronic HG increases OS in the retina and its capillary cells, leading to microvascular damage and retinal dysfunction [92]. HG contributes to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) overexpression, leading to cytosolic ROS increase and mitochondrial membrane damage. In retina, OS can activate metabolic pathways including PKC, AGEs, hexosamine pathway, polyol pathway, p38 MAPK pathway, and autophagy pathway can and alter the expression of growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) [93]. It can also activate the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) transcription factor, leading to the upregulation of pro-inflammatory cytokines that contribute to retinal cell damage and subsequent development of DR [94]. The diabetic environment also compromises the superoxide scavenging system by decreasing the activity of antioxidant enzymes such as SOD, glutathione reductase, glutathione peroxidase, catalase GSH, and manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity, as well as by altering enzymes responsible for DNA and histone modifications [92].

Several studies have reported the protective effect of ASX on DR (Figure 3). In cultured human retinal pigment epithelial cells, ASX reduced the high-glucose exposure-induced increased intracellular level of AGEs, ROS, lipid peroxidation, the mRNA expression of VEGF and matrix metalloproteinase-2 (MMP2), and cell proliferation [95]. In STZ rats, oral administration of ASX plays a protective role in the retinal function and architecture, and so, it prevents DR. ASX reduced the levels of OS mediators (e.g., 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, nitrotyrosine, and acrolein), increased the levels of antioxidant enzymes (heme oxygenase-1 and peroxiredoxin), and decreased inflammatory mediators (intercellular adhesion molecule-1, monocyte chemoattractant protein-1, and fractalkine), which may be mediated by downregulation of the NF- $\kappa$ B transcription factor [96].

An inhibitory effect of ASX has also been recently reported on aldose reductase (AR) activity, a key enzyme in the polyol pathway involved in the pathogenesis of diabetic complications including DR in the gerbil (*Gerbillidae* family, *Psammomys obesus* species) animal models for T2DM [97]. In db/db mice,

ASX improved oscillatory potentials (OPs) and the levels of OS markers including superoxide anion, MDA (a marker of lipid peroxidation), 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG, indicator of oxidative DNA damage), and MnSOD (manganese superoxide dismutase) in the retinal tissue [98]. Thus, it was suggested that ASX as an antioxidant possibly improved DR by the regulation of intracellular OS, which mediates pathological cell functionality (VEGF level, inflammation, and excessive cell proliferation).



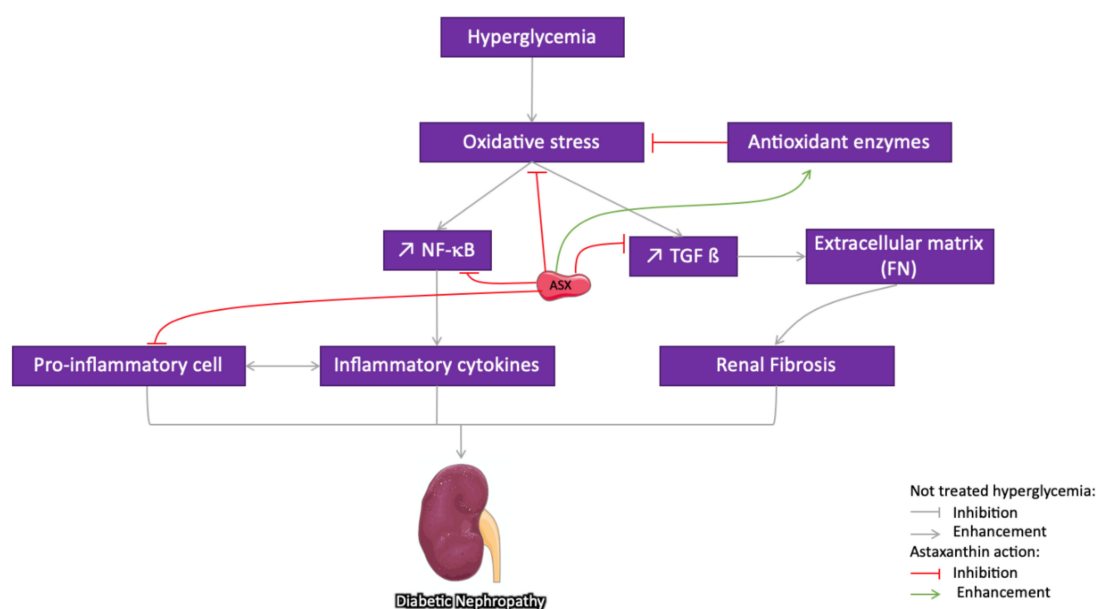
**Figure 3.** Schematic representation of different pathways suggested for the protective effect of astaxanthin on diabetic retinopathy (DR) via its ROS scavenging potential and reduced oxidative stress induced by the enhanced antioxidant and the downstream pathways activated in hyperglycemic states: In parallel, ASX inhibits inflammation through the nuclear factor-kappa (NF- $\kappa$ B) pathway, microvascular damages through vascular endothelial growth factor (VEGF) production, and finally apoptosis through the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B PI3K/Akt pathways. The grey arrow indicates different pathways implied in the development of the pathology, the red arrow indicates the inhibitory/regulatory effect, while the green ones represent a stimulatory effect.

### 3.3.2. Astaxanthin Protection against Diabetic Nephropathy

Diabetic nephropathy (DN), also called diabetic kidney disease, is a microvascular complication resulting from lesions in the renal glomeruli and tubuli [99]. It is strongly associated with poor glycemic control [100]. The ROS-related increase of HG induces the recruitment of inflammatory cells [101], the production of inflammatory cytokines [102], and an increased expression of NF- $\kappa$ B [103]. Renal inflammation has been reported to contribute to nephropathy development. ROS overproduction has been also associated with TGF- $\beta$  and excessive extracellular matrix (ECM) deposition, leading to the progression of renal fibrosis [104].

Several animal studies have reported the nephroprotective effect of ASX and proposed that it should be explored further as a potential remedy for the prevention and treatment of DN (Figure 4). In DN, HG-induced oxidative stress is mainly responsible for the disease progression. Chronic exposure to glucose induces an increase in AGEs that activate the transcription factor NF- $\kappa$ B and the protein kinase C (PKC) system through cellular RAGEs, leading to the inflammation and augmentation of synthesis of the ECM constituents [105]. It has been shown that ASX administration for 12 weeks to db/db mice reversed the HG-induced increased urinary albumin and decreased OS markers such as 8-hydroxydeoxyguanosine [66]. In diabetic rats, dietary supplementation with ASX (20 mg/kg daily)

has shown direct favorable effects against renal dysfunction with a return to physiological levels of creatinine and uric acid and a significant reduction in urea level, along with partial reversal of glomerular hypertrophy [67]. ASX increases the activity of antioxidant enzymes such as SOD and catalase and reduces the generated MDA in the serum. It has been also reported that the ASX accumulated in the mitochondria of human mesangial cells suppresses HG-induced ROS production and inhibits the activation of transcription factors and the production of COX-2, MCP-1, and TGF $\beta$ 1 [106]. ASX may partially interfere with the pathogenesis of DN by reducing the accumulation of ECM components as it regulates the overproduction of fibronectin (FN) and TGF- $\beta$ 1 and can prevent renal fibrosis [60]. Recently, it has been revealed that the renoprotective effect of ASX on DM partially depends on the signaling of the redox-regulated transcription factor Nrf2–ARE that exerts major effects in protecting against oxidative damage [60]. Moreover, in the cultured HG-treated glomerular mesangial cells and in db/db mice, ASX upregulates the Cx43 protein level and inhibits c-Src activity. Furthermore, it promotes the nuclear translocation of Nrf2 and increases the expression level of its downstream protein heme oxygenase-1 and superoxide dismutase 1 [70]. According to a recent report, administration of ASX-s-allyl cysteine biconjugate to SZT-treated rats protected the antioxidant status of kidney and plasma and curbed the progression of secondary complications of DM [107].

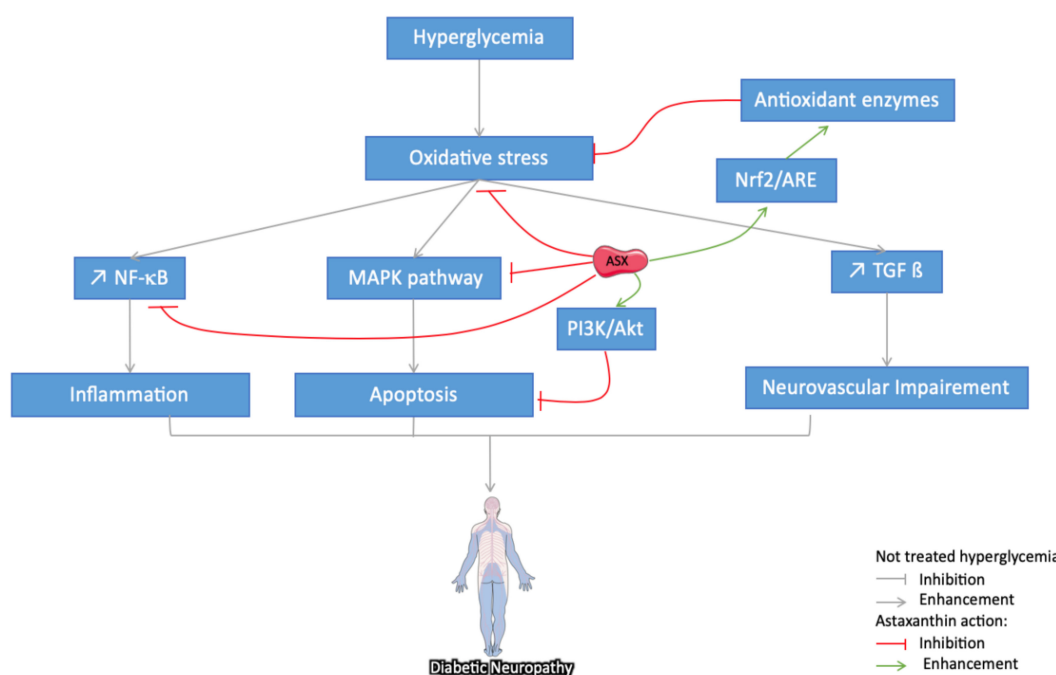


**Figure 4.** Schematic representation of different pathways suggested for the protective effect of astaxanthin (ASX) on diabetic nephropathy (DN): Through its ROS scavenging and antioxidant potential, ASX reduces oxidative stress and the downstream pathways activated in the development of the disease. In addition, ASX directly inhibits NF- $\kappa$ B translocation and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) production as well as reduces inflammation and fibrosis, which are strongly implied in DN. The grey arrow indicates different pathways implied in the DN development, the red arrow indicates an inhibitory/regulatory effect, while the green ones indicate a stimulatory effect.

### 3.3.3. Astaxanthin Protection against Diabetes-Induced Neuropathy

DM-induced neuropathy and hippocampal-based cognitive deficits are prevalent diseases with important impacts on the life quality of patients. Besides inflammation, the oxidant/antioxidant imbalance is considered the link between the HG states and neuronal abnormalities [6]. Several animal studies have therefore considered the neuroprotective effects of ASX on DM (Figure 5) and on other aging-related diseases, as well [10,52,63]. Specifically, in STZ rats, ASX administration improves cognitive function [108] and simultaneously reduces activities of oxidative stress by increasing the levels of antioxidant enzymes. By reducing NF- $\kappa$ B p65 subunit in the cerebral cortex and hippocampus, ASX reduces the levels of inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6. Furthermore,

by activating the PI3K/Akt pathway, it reduces caspase 3 and caspase 9 activities, protecting brain cells from apoptosis. In another study, ASX ameliorated the neuronal behavior in STZ-treated mice. This effect has been related to the decrease of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in the brain; cleaved caspase-3, IL-6, and IL-1 $\beta$  downregulation; and cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) upregulation in the frontal cortex [109]. In a recent study on diabetic mice, ASX increased the level of SOD and decreased the level of MDA in the hippocampus. It also alleviated cognitive dysfunction by inhibiting OS and inflammatory responses via Nrf2/ARE and NF- $\kappa$ B signaling pathways [110].



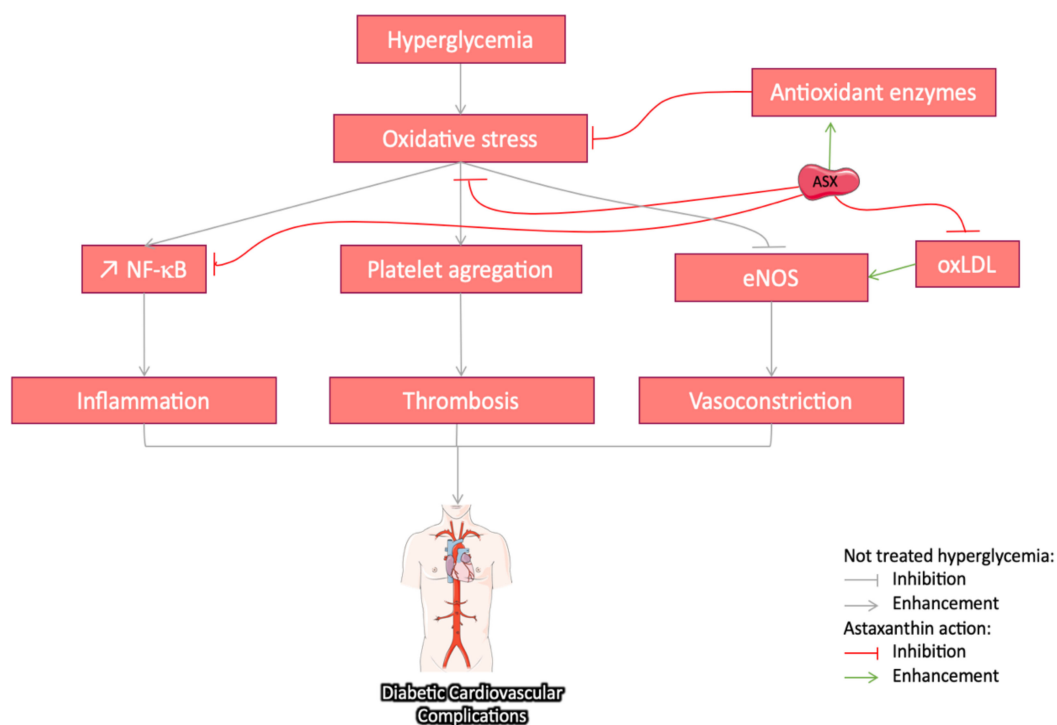
**Figure 5.** Schematic representation of different pathways suggested for the protective effect of astaxanthin (ASX) on diabetic neuropathy: Through its ROS scavenging potential and the enhancement of antioxidant activities, ASX reduces oxidative stress and the downstream pathways activated in the development of DM-induced neuronal abnormalities. In addition, ASX directly inhibits inflammation through NF- $\kappa$ B, microvascular damages through VEGF production, and finally apoptosis through the regulation of MAPK and PI3K/Akt pathways. The grey arrow indicates different pathways implied in the development of DM-induced neuronal abnormalities, the red arrow indicates an inhibitory/regulatory effect, while the green ones indicate a stimulatory effect.

### 3.3.4. Cardiovascular Protective Effect of Astaxanthin in Diabetes

Cardiovascular disease is a major cause of mortality in T2DM patients due to hypertensive vascular damages [111]. HG leads to arteriosclerosis through AGE increase [112]. OS resulting from NOX enhancement leads to platelet aggregation and thrombosis. It is worthy to note that, physiologically, the antioxidant enzymes in blood platelets regulate ROS overproduction [113]. Considering that antioxidant enzyme production is compromised by the diabetic environment, ASX could reduce thrombosis through balancing the redox reactions. By limiting the low density lipoprotein, ASX may also contribute to the prevention of arteriosclerosis in a dose-dependent manner [114]. Eventually through the regulation of ROS-induced vasoconstriction, ASX may significantly modulate arterial blood pressure and fluidity in hypertensive animals [115]. The cardiovascular protective effects of ASX and derivatives have been previously reported after prior oral or intravenous administration to different animal species. It also reduces OS and inflammation and is known to contribute to the pathophysiology of atherosclerotic cardiovascular disease [101]. An overview of the potential effects of ASX 1 (Figure 6) on cardiovascular diseases has been documented in numerous reviews [49,116,117]. It should be noted that DM is one of the contributing events in the cardiovascular physiopathology,



besides hypertension, infections of the vessel wall, and smoking. With a focus on the DM context, Zhao et al. studied the effect of ASX (10 mg/kg daily for 42 consecutive days) on endothelial cells in STZ diabetic rats and reported reduced levels of the oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) and the expression of its endothelial-cell receptor LOX-1, leading to eNOS expression restoration [118]. Chan et al. showed that, in diabetic rats, dietary intake of astaxanthin (at 0.01 and 0.05%) exhibited anti-inflammatory and anti-coagulatory effect [85]. Moreover, a clinical trial in T2DM patients (daily intake up to 12 mg ASX) significantly attenuated hemostatic disorders and reduced the inflammatory cytokines level without affecting renal function [119]. Further investigations are needed to clarify the mechanisms and the effects of ASX in the DM context.



**Figure 6.** Schematic representation of different pathways suggested for the protective effect of astaxanthin (ASX) on diabetic cardiovascular complications in the literature: through its ROS scavenging potential and the enhancement of antioxidant activities, ASX reduces oxidative stress and the downstream pathways activated in the development of the pathology. In addition, ASX directly inhibits inflammation through NF- $\kappa$ B pathway. Thrombosis and vasoconstriction reduction are also associated with oxidative stress regulation. Moreover, ASX lowers oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), enhances endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and reduces vasoconstriction. The grey arrow indicates different pathways implied in the development of DM-induced neuronal abnormalities, the red arrow indicates an inhibitory/regulatory effect, while the green ones indicate a stimulatory effect.

### 3.3.5. Anti-Inflammatory Effects of Astaxanthin in Diabetes

Inflammation is a determinant factor in the onset and development of T1DM, T2DM, and their complications [120]. Immune cells involved in pancreatic  $\beta$ -cell destruction are activated through a variety of cytokines including IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . Chronic low-level inflammation is a main feature of T2DM, and TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, and adipokines serve as links between inflammation and metabolism. Obese adipose tissue is characterized by macrophage infiltration, which is an important source of inflammation and TNF- $\alpha$  production in this tissue [121].

The anti-inflammatory effects of ASX have been reported in several studies. ASX supplementation induces macrophage phenotype switch by the decrease of pro-inflammatory M1 markers (CD11 and MCP-1) and the increase of anti-inflammatory M2 markers (IL-10) [77,122]. Moreover, Kim et al. [122] observed an attenuated monocyte recruitment, thereby reducing in situ macrophage proliferation.

ASX reduces the HG-induced inflammation-related levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX), MCP-1, prostaglandin E2 (PGE2), IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  molecules. For instance, in STZ-induced diabetic rats, ASX (0.01% or 0.05% in diet) was shown to reduce the level of activated macrophages (MCP-1) in plasma and kidney and that of the pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) [85]. Bhuvaneswari et al. demonstrated that, in high-fat-high-fructose diet, ASX administration (2 mg/kg/day) inhibited I $\kappa$ B phosphorylation and therefore the nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B p65 subunit [82]. Indeed, numerous studies have demonstrated that the anti-inflammatory effect of ASX is mediated via inhibiting NF- $\kappa$ B activation in diabetes-induced models [123,124]. In fact, by regulating the NF- $\kappa$ B pathway, ASX reduces the risk of complication in diabetes [96,106,108,110]. Thus, ASX in targeting inflammation may improve the prevention and control of the diabetes-related diseases.

#### 4. Conclusions and Future Perspectives

OS and inflammation are recognized as determinant factors of DM development and its associated complications. Several *in vitro* studies have shown a broad range of biological properties in DM-related pathologic cells including pancreatic  $\beta$ -cells, macrophages, T-cells, hepatocytes, adipocytes, endothelial cells, retinal pigment epithelial cells, and glomerular mesangial cells, among others. ASX is able to reduce intracellular oxidative stress and inflammation by scavenging the ROS and inhibition of lipid peroxidation. It modulates multiple OS pathways, but the mechanisms and specificity of action regarding type of cells remain elusive.

The literature reviewed here clearly suggests a promising utilization of ASX in diabetes healthcare. ASX is a safe drug with pleiotropic effects and without crucial adverse effects. The orally/parenterally administrated ASX to T1DM and T2DM animal models has been shown (i) to improve insulin resistance and glucose intolerance, (ii) to reduce hyperglycemia, (iii) to stimulate activation of antioxidant enzymes and reduce OS, and (iv) to have an anti-inflammatory effect. It may have, therefore, a significant preventive role in the onset and progression of DM as well as a protective role in the development of diabetic complications. However, the heterogeneity of DM models, ASX source, dosage, mode of administration, and outcomes studied make comparisons of the obtained results almost impossible.

Although a number of clinical trials have already studied ASX effects, research on the biological mechanisms involved in a diabetic context is necessary. The appropriate dose for reaching positive results with diabetic complications should be addressed in adequate human trials that would evaluate efficacy and safety considering the bioavailability, individual response, metabolism, tissue delivery, and possible toxicity.

**Author Contributions:** R.L. and F.A. wrote the original draft; V.G., D.L. and H.P. assisted in the review; F.A. and G.P.-D. did the review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (RL).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

AGE, advanced glycation end-products; Akt, protein kinase B; ARE, antioxidant response element; ASX, astaxanthin; ATF4, activating transcription factor 4; ATF6, activating transcription factor 4; CHOP, C/EBP homologous protein; COX-2, cyclooxygenase 2; DM, diabetes mellitus; DNA, deoxyribonucleic acid; ER, endoplasmic reticulum; ECM, extracellular matrix; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ERK1/2, extracellular signal-related kinases 1/2; FN, fibronectin; GADD34, growth arrest and DNA damage-inducible protein; GPx, glutathione peroxidase; GRP78, glucose-regulated protein 78; GSH, glutathione; GSTA1, glutathione S-transferase alpha1; HG, hyperglycemia; HO-1, heme oxygenase-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; I $\kappa$ B, inhibitor of nuclear factor kappa B; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; IR, insulin receptor; JNK, c-Jun N-terminal kinases; LOX-1, lectin-like oxidized LDL receptor 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MDA, malondialdehyde; MMP2, matrix metalloproteinase-2; MnSOD, manganese superoxide dismutase; mtROS, mitochondrial reactive oxygen species; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; NOX, NADPH oxidase; NQO1, NAD(P)H dehydrogenase quinone 1; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; oxLDL, oxidized low density lipoprotein; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptors; RAGE, receptor for advanced glycation end products; ROS, reactive oxygen species; SHP-1, Src homology region 2 domain-containing



phosphatase-1; SOD, superoxide dismutase; SZT, streptozotocin; T1DM, type 1 diabetes mellitus; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; VEGF, vascular endothelial growth factor; XBP1, X-box binding protein 1.

## References

- Williams, R.; Colagiuri, S.; Chan, J.; Gregg, E.; Ke, C.; Lim, L.-L.; Yang, X. *IDF Atlas*, 9th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2019; ISBN 978-2-930229-87-4.
- Marin, C.; Luyten, F.P.; Van der Schueren, B.; Kerckhofs, G.; Vandamme, K. The Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jiao, H.; Xiao, E.; Graves, D.T. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr. Osteoporos Rep.* **2015**, *13*, 327–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Newsholme, P.; Cruzat, V.F.; Keane, K.N.; Carlessi, R.; de Bittencourt, P.I.H. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 4527–4550. [[CrossRef](#)]
- Luc, K.; Schramm-Luc, A.; Guzik, T.J.; Mikolajczyk, T.P.; Sangiovanni, E.; Martinelli, G.; Bossi, L.; Carpentier-Maguire, E.; Tchamgoue, A.D.; Agbor, G.; et al. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J. Physiol. Pharmacol.* **2019**, *70*. [[CrossRef](#)]
- Roohbakhsh, A.; Karimi, G.; Iranshahi, M. Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: A mechanistic review. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *91*, 31–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ambati, R.R.; Moi, P.S.; Ravi, S.; Aswathanarayana, R.G. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 128–152. [[CrossRef](#)]
- Murillo, A.G.; Fernandez, M.L. Potential of Dietary Non-Provitamin A Carotenoids in the Prevention and Treatment of Diabetic Microvascular Complications. *Adv. Nutr.* **2016**, *7*, 14–24. [[CrossRef](#)]
- Kim, S.H.; Kim, H. Astaxanthin Modulation of Signaling Pathways That Regulate Autophagy. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 546. [[CrossRef](#)]
- Fakhri, S.; Abbaszadeh, F.; Dargahi, L.; Jorjani, M. Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits. *Pharmacol. Res.* **2018**, *136*, 1–20. [[CrossRef](#)]
- Higuera-Ciapara, I.; Félix-Valenzuela, L.; Goycoolea, F.M. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46*, 185–196. [[CrossRef](#)]
- Inoue, M.; Tanabe, H.; Matsumoto, A.; Takagi, M.; Umegaki, K.; Amagaya, S.; Takahashi, J. Astaxanthin functions differently as a selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  modulator in adipocytes and macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 692–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nishida, Y.; Yamashita, E.; Miki, W. Quenching activities of common hydrophilic and lipophilic antioxidants against singlet oxygen using chemiluminescence detection system. *Carotenoid Sci.* **2007**, *11*, 16–20.
- Miki, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 141–146. [[CrossRef](#)]
- Rehman, K.; Akash, M.S.H. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? Oxidative Stress and diabetes mellitus. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 3577–3585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ahmad, W.; Ijaz, B.; Shabbiri, K.; Ahmed, F.; Rehman, S. Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: Mechanisms behind ROS/RNS generation. *J. Biomed. Sci.* **2017**, *24*, 76. [[CrossRef](#)]
- Chen, J.; Stimpson, S.E.; Fernandez-Bueno, G.A.; Mathews, C.E. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Type 1 Diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29*, 1361–1372. [[CrossRef](#)]
- De Bandeira, M.S.; da Fonseca, L.; da Guedes, S.; Rabelo, L.; Goulart, M.; Vasconcelos, S. Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complications in Diabetes Mellitus. *IJMS* **2013**, *14*, 3265–3284. [[CrossRef](#)]
- Ray, P.D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 981–990. [[CrossRef](#)]
- Rovira-Llopis, S.; Bañuls, C.; Diaz-Morales, N.; Hernandez-Mijares, A.; Rocha, M.; Victor, V.M. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 637–645. [[CrossRef](#)]
- Cepas, V.; Collino, M.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M. Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Diet-Related Diseases. *Antioxidants* **2020**, *9*, 142. [[CrossRef](#)]

22. Domingueti, C.P.; Dusse, L.M.S.; das Carvalho, M.G.; de Sousa, L.P.; Gomes, K.B.; Fernandes, A.P. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J. Diabetes Its Complicat.* **2016**, *30*, 738–745. [[CrossRef](#)]
23. Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *223*, 7–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fassett, R.G.; Coombes, J.S. Astaxanthin: A potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 447–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sarada, R.; Tripathi, U.; Ravishankar, G.A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process. Biochem.* **2002**, *37*, 623–627. [[CrossRef](#)]
26. Hu, I.-C. Production of potential coproducts from microalgae. In *Biofuels from Algae*; Lee, D.J., Pandey, A., Chang, J.-S., Chisti, Y., Soccol, C.R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 345–358, ISBN 978-0-444-64192-2.
27. Brendler, T.; Williamson, E.M. Astaxanthin: How much is too much? A safety review. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 3090–3111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Capelli, B.; Cysewski, G.R. *Astaxanthin: Natural Astaxanthin: King of the Carotenoids*; Cyanotech Corporation: Kailua-Kona, HI, USA, 2007; Chapter 9, ISBN 978-0-9792353-0-6.
29. Fuji, L.; Chemical Industry Co. New Dietary Ingredient Notification for Astaxanthin Extracted from *Haematococcus Algae*. *US Food Drug Adm.* **2004**, *1*, 1–6.
30. Urich, K. *Comparative Animal Biochemistry*; Springer: Heidelberg, Germany, 1994; ISBN 978-3-642-08181-1.
31. Hussein, G.; Sankawa, U.; Goto, H.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 443–449. [[CrossRef](#)]
32. Guerin, M.; Huntley, M.E.; Olaizola, M. *Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 210–216. [[CrossRef](#)]
33. Salatti-Dorado, J.A.; García-Gómez, D.; Rodríguez-Ruiz, V.; Gueguen, V.; Pavon-Djavid, G.; Rubio, S. Multifunctional green supramolecular solvents for cost-effective production of highly stable astaxanthin-rich formulations from *Haematococcus pluvialis*. *Food Chem.* **2019**, *279*, 294–302. [[CrossRef](#)]
34. Zuluaga, M.; Barzegari, A.; Letourneur, D.; Gueguen, V.; Pavon-Djavid, G. Oxidative Stress Regulation on Endothelial Cells by Hydrophilic Astaxanthin Complex: Chemical, Biological, and Molecular Antioxidant Activity Evaluation. *Oxid Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 8073798. [[CrossRef](#)]
35. Brannon-Peppas, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 1–9. [[CrossRef](#)]
36. Zuluaga, M.; Gregnanin, G.; Cencetti, C.; Di Meo, C.; Gueguen, V.; Letourneur, D.; Meddahi-Pelle, A.; Pavon-Djavid, G.; Matricardi, P. PVA/Dextran hydrogel patches as delivery system of antioxidant astaxanthin: A cardiovascular approach. *Biomed. Mater.* **2017**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rodríguez-Ruiz, V.; Salatti-Dorado, J.Á.; Barzegari, A.; Nicolas-Boluda, A.; Houaoui, A.; Caballo, C.; Caballero-Casero, N.; Sicilia, D.; Bastias Venegas, J.; Pauthe, E.; et al. Astaxanthin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Preservation of Antioxidant Activity. *Molecules* **2018**, *23*, 2601. [[CrossRef](#)]
38. Tamjidi, F.; Shahedi, M.; Varshosaz, J.; Nasirpour, A. Stability of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers in beverage systems. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 511–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Mercke Odeberg, J.; Lignell, Å.; Pettersson, A.; Höglund, P. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *19*, 299–304. [[CrossRef](#)]
40. Shanmugapriya, K.; Kim, H.; Kang, H.W. A new alternative insight of nanoemulsion conjugated with  $\kappa$ -carrageenan for wound healing study in diabetic mice: In vitro and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *133*, 236–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J.C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1631–1640. [[CrossRef](#)]
42. Zuluaga Tamayo, M.; Choudat, L.; Aid-Launais, R.; Thibaudeau, O.; Louedec, L.; Letourneur, D.; Gueguen, V.; Meddahi-Pellé, A.; Couvelard, A.; Pavon-Djavid, G. Astaxanthin Complexes to Attenuate Muscle Damage after In Vivo Femoral Ischemia-Reperfusion. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 354. [[CrossRef](#)]
43. Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006; ISBN 978-3-527-31280-1.
44. Del Valle, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process. Biochem.* **2004**, *39*, 1033–1046. [[CrossRef](#)]

45. Duchêne, D.; Wouessidjewe, D. Pharmaceutical Uses of Cyclodextrins and Derivatives. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1990**, *16*, 2487–2499. [CrossRef]
46. Coral-Hinostroza, G.N.; Ytrestøyl, T.; Ruyter, B.; Bjerkeng, B. Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3'R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *139*, 99–110. [CrossRef]
47. Nagao, A. Absorption and metabolism of dietary carotenoids. *BioFactors* **2011**, *37*, 83–87. [CrossRef] [PubMed]
48. Bilia, A.R.; Isacchi, B.; Righeschi, C.; Guccione, C.; Bergonzi, M.C. Flavonoids Loaded in Nanocarriers: An Opportunity to Increase Oral Bioavailability and Bioefficacy. *FNS* **2014**, *5*, 1212–1327. [CrossRef]
49. Visioli, F.; Artaria, C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: Mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food Funct.* **2017**, *8*, 39–63. [CrossRef] [PubMed]
50. Vega, K.; Edwards, J.; Beilstein, P. Subchronic (13-week) toxicity and prenatal developmental toxicity studies of dietary astaxanthin in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *73*, 819–828. [CrossRef]
51. Katsumata, T.; Ishibashi, T.; Kyle, D. A sub-chronic toxicity evaluation of a natural astaxanthin-rich carotenoid extract of *Paracoccus carotinifaciens* in rats. *Toxicol. Rep.* **2014**, *1*, 582–588. [CrossRef] [PubMed]
52. Fakhri, S.; Aneva, I.Y.; Farzaei, M.H.; Sobarzo-Sánchez, E. The Neuroprotective Effects of Astaxanthin: Therapeutic Targets and Clinical Perspective. *Molecules* **2019**, *24*, 2640. [CrossRef]
53. ClinicalTrials.gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov> (accessed on 2 June 2020).
54. Wu, H.; Niu, H.; Shao, A.; Wu, C.; Dixon, B.J.; Zhang, J.; Yang, S.; Wang, Y. Astaxanthin as a Potential Neuroprotective Agent for Neurological Diseases. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5750–5766. [CrossRef]
55. McNulty, H.; Jacob, R.F.; Mason, R.P. Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane Physicochemical Interactions. *Am. J. Cardiol.* **2008**, *101*, S20–S29. [CrossRef]
56. McNulty, H.P.; Byun, J.; Lockwood, S.F.; Jacob, R.F.; Mason, R.P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 167–174. [CrossRef]
57. Goto, S.; Kogure, K.; Abe, K.; Kimata, Y.; Kitahama, K.; Yamashita, E.; Terada, H. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2001**, *1512*, 251–258. [CrossRef]
58. Pashkow, F.J.; Watumull, D.G.; Campbell, C.L. Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Am. J. Cardiol.* **2008**, *101*, S58–S68. [CrossRef] [PubMed]
59. Kim, S.; Kim, H. Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction—A Mini-Review. *Nutrients* **2018**, *10*, 1137. [CrossRef] [PubMed]
60. Zhu, X.; Chen, Y.; Chen, Q.; Yang, H.; Xie, X. Astaxanthin Promotes Nrf2/ARE Signaling to Alleviate Renal Fibronectin and Collagen IV Accumulation in Diabetic Rats. *J. Diabetes Res.* **2018**, *2018*, 1–7. [CrossRef]
61. Wu, Q.; Zhang, X.-S.; Wang, H.-D.; Zhang, X.; Yu, Q.; Li, W.; Zhou, M.-L.; Wang, X.-L. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 6125–6141. [CrossRef] [PubMed]
62. Nan, B.; Gu, X.; Huang, X. The Role of the Reactive Oxygen Species Scavenger Agent, Astaxanthin, in the Protection of Cisplatin-Treated Patients Against Hearing Loss. *Drug Des. Dev.* **2019**, *13*, 4291–4303. [CrossRef] [PubMed]
63. Galasso, C.; Orefice, I.; Pellone, P.; Cirino, P.; Miele, R.; Ianora, A.; Brunet, C.; Sansone, C. On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: New Perspectives? *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 247. [CrossRef]
64. Yang, J.-P.; Shin, J.-H.; Seo, S.-H.; Kim, S.-G.; Lee, S.; Shin, E.-H. Effects of Antioxidants in Reducing Accumulation of Fat in Hepatocyte. *IJMS* **2018**, *19*, 2563. [CrossRef]
65. Mashhadi, N.S.; Zakerkish, M.; Mohammadiasl, J.; Zarei, M.; Mohammadshahi, M.; Haghighizadeh, M.H. Astaxanthin improves glucose metabolism and reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2018**, *27*, 341–346.
66. Naito, Y.; Uchiyama, K.; Aoi, W.; Hasegawa, G.; Nakamura, N.; Yoshida, N.; Maoka, T.; Takahashi, J.; Yoshikawa, T. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *BioFactors* **2004**, *20*, 49–59. [CrossRef]

67. Sila, A.; Ghilissi, Z.; Kamoun, Z.; Makni, M.; Nasri, M.; Bougatef, A.; Sahnoun, Z. Astaxanthin from shrimp by-products ameliorates nephropathy in diabetic rats. *Eur. J. Nutr.* **2015**, *54*, 301–307. [[CrossRef](#)]
68. Chen, Q.; Tao, J.; Li, G.; Zheng, D.; Tan, Y.; Li, R.; Tian, L.; Li, Z.; Cheng, H.; Xie, X. Astaxanthin ameliorates experimental diabetes-induced renal oxidative stress and fibronectin by upregulating connexin43 in glomerular mesangial cells and diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *840*, 33–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Uchiyama, K.; Naito, Y.; Hasegawa, G.; Nakamura, N.; Takahashi, J.; Yoshikawa, T. Astaxanthin protects  $\beta$ -cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Rep.* **2002**, *7*, 290–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Qing Chen Astaxanthin Promotes Nrf2/ARE Signaling to Inhibit HG-Induced Renal Fibrosis in GMCs. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Kitahara, A.; Takahashi, K.; Morita, N.; Murashima, T.; Onuma, H.; Sumitani, Y.; Tanaka, T.; Kondo, T.; Hosaka, T.; Ishida, H. The Novel Mechanisms Concerning the Inhibitions of Palmitate-Induced Proinflammatory Factor Releases and Endogenous Cellular Stress with Astaxanthin on MIN6  $\beta$ -Cells. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 185. [[CrossRef](#)]
72. Arunkumar, E.; Bhuvanewari, S.; Anuradha, C.V. An intervention study in obese mice with astaxanthin, a marine carotenoid—Effects on insulin signaling and pro-inflammatory cytokines. *Food Funct.* **2012**, *3*, 120–126. [[CrossRef](#)]
73. Nishida, Y.; Nawaz, A.; Kado, T.; Takikawa, A.; Igarashi, Y.; Onogi, Y.; Wada, T.; Sasaoka, T.; Yamamoto, S.; Sasahara, M.; et al. Astaxanthin stimulates mitochondrial biogenesis in insulin resistant muscle via activation of AMPK pathway. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2020**, *11*, 241–258. [[CrossRef](#)]
74. Bhuvanewari, S.; Anuradha, C.V. Astaxanthin prevents loss of insulin signaling and improves glucose metabolism in liver of insulin resistant mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2012**, *90*, 1544–1552. [[CrossRef](#)]
75. Park, C.H.; Xu, F.H.; Roh, S.-S.; Song, Y.O.; Uebaba, K.; Noh, J.S.; Yokozawa, T. Astaxanthin and Corni Fructus Protect Against Diabetes-Induced Oxidative Stress, Inflammation, and Advanced Glycation End Product in Livers of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J. Med. Food* **2015**, *18*, 337–344. [[CrossRef](#)]
76. Hussein, G.; Nakagawa, T.; Goto, H.; Shimada, Y.; Matsumoto, K.; Sankawa, U.; Watanabe, H. Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SHR/NDmcr-cp. *Life Sci.* **2007**, *80*, 522–529. [[CrossRef](#)]
77. Ni, Y.; Nagashimada, M.; Zhuge, F.; Zhan, L.; Nagata, N.; Tsutsui, A.; Nakanuma, Y.; Kaneko, S.; Ota, T. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17192. [[CrossRef](#)]
78. Jia, Y.; Kim, J.-Y.; Jun, H.-J.; Kim, S.-J.; Lee, J.-H.; Hoang, M.H.; Hwang, K.-Y.; Um, S.-J.; Chang, H.I.; Lee, S.-J. The natural carotenoid astaxanthin, a PPAR- $\alpha$  agonist and PPAR- $\gamma$  antagonist, reduces hepatic lipid accumulation by rewiring the transcriptome in lipid-loaded hepatocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 878–888. [[CrossRef](#)]
79. Choi, C.-I. Astaxanthin as a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Modulator: Its Therapeutic Implications. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Xu, J.; Rong, S.; Gao, H.; Chen, C.; Yang, W.; Deng, Q.; Huang, Q.; Xiao, L.; Huang, F. A Combination of Flaxseed Oil and Astaxanthin Improves Hepatic Lipid Accumulation and Reduces Oxidative Stress in High Fat-Diet Fed Rats. *Nutrients* **2017**, *9*, 271. [[CrossRef](#)]
81. Ravi Kumar, S.; Narayan, B.; Sawada, Y.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Combined effect of astaxanthin and squalene on oxidative stress in vivo. *Mol. Cell Biochem.* **2016**, *417*, 57–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Bhuvanewari, S.; Yogalakshmi, B.; Sreeja, S.; Anuradha, C.V. Astaxanthin reduces hepatic endoplasmic reticulum stress and nuclear factor- $\kappa$ B-mediated inflammation in high fructose and high fat diet-fed mice. *Cell Stress Chaperones* **2014**, *19*, 183–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Gao, Y.; Yang, L.; Chin, Y.; Liu, F.; Li, R.W.; Yuan, S.; Xue, C.; Xu, J.; Tang, Q. Astaxanthin n-Octanoic Acid Diester Ameliorates Insulin Resistance and Modulates Gut Microbiota in High-Fat and High-Sucrose Diet-Fed Mice. *IJMS* **2020**, *21*, 2149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Wang, J.; Liu, S.; Wang, H.; Xiao, S.; Li, C.; Li, Y.; Liu, B. Xanthophyllomyces dendrorhous-Derived Astaxanthin Regulates Lipid Metabolism and Gut Microbiota in Obese Mice Induced by A High-Fat Diet. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Chan, K.; Pen, P.-J.; Yin, M. Anticoagulatory and Antiinflammatory Effects of Astaxanthin in Diabetic Rats. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, H76–H80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



86. Preuss, H.G.; Echard, B.; Yamashita, E.; Perricone, N.V. High Dose Astaxanthin Lowers Blood Pressure and Increases Insulin Sensitivity in Rats: Are These Effects Interdependent? *Int. J. Med. Sci.* **2011**, *8*, 126–138. [[CrossRef](#)]
87. Kashihara, N.; Haruna, Y.; Kondeti, V.K.; Kanwar, Y. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *CMC* **2010**, *17*, 4256–4269. [[CrossRef](#)]
88. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1058–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Navarro, J.F.; Mora, C. Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2005**, *20*, 2601–2604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Giannaccare, G.; Pellegrini, M.; Senni, C.; Bernabei, F.; Scordia, V.; Cicero, A.F.G. Clinical Applications of Astaxanthin in the Treatment of Ocular Diseases: Emerging Insights. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Cheung, N.; Mitchell, P.; Wong, T.Y. Diabetic retinopathy. *Lancet* **2010**, *376*, 124–136. [[CrossRef](#)]
92. Kowluru, R.A.; Kowluru, A.; Mishra, M.; Kumar, B. Oxidative stress and epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* **2015**, *48*, 40–61. [[CrossRef](#)]
93. Dehdashtian, E.; Mehrzadi, S.; Yousefi, B.; Hosseinzadeh, A.; Reiter, R.J.; Safa, M.; Ghaznavi, H.; Naseripour, M. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress. *Life Sci.* **2018**, *193*, 20–33. [[CrossRef](#)]
94. Roy, S.; Kern, T.S.; Song, B.; Stuebe, C. Mechanistic Insights into Pathological Changes in the Diabetic Retina: Implications for Targeting Diabetic Retinopathy. *Am. J. Pathol.* **2017**, *187*, 9–19. [[CrossRef](#)]
95. Sun, Z.; Liu, J.; Zeng, X.; Huangfu, J.; Jiang, Y.; Wang, M.; Chen, F. Protective actions of microalgae against endogenous and exogenous advanced glycation endproducts (AGEs) in human retinal pigment epithelial cells. *Food Funct.* **2011**, *2*, 251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Yeh, P.-T.; Huang, H.-W.; Yang, C.-M.; Yang, W.-S.; Yang, C.-H. Astaxanthin Inhibits Expression of Retinal Oxidative Stress and Inflammatory Mediators in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Benlarbi-Ben Khedher, M.; Hajri, K.; Dellaa, A.; Baccouche, B.; Hammoum, I.; Boudhrioua-Mihoubi, N.; Dhifi, W.; Ben Chaouacha-Chekir, R. Astaxanthin inhibits aldose reductase activity in *Psammomys obesus*, a model of type 2 diabetes and diabetic retinopathy. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 3979–3985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Dong, L.-Y.; Jin, J.; Lu, G.; Kang, X.-L. Astaxanthin Attenuates the Apoptosis of Retinal Ganglion Cells in db/db Mice by Inhibition of Oxidative Stress. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 960–974. [[CrossRef](#)]
99. Papadopoulou-Marketou, N.; Paschou, S.A.; Marketos, N.; Adamidi, S.; Adamidis, S.; Kanaka-Gantenbein, C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Minerva Med.* **2018**, *109*, 218–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Iseki, K.; Ikemiya, Y.; Kinjo, K.; Iseki, C.; Takishita, S. Prevalence of high fasting plasma glucose and risk of developing end-stage renal disease in screened subjects in Okinawa, Japan. *Clin. Exp. Nephrol.* **2004**, *8*, 250–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Yonggui, W.; Guozhong, W.; Xiangming, Q.; Hui, L.; Hao, Q.; Jijia, S.; Shantan, L. Protein Kinase C  $\beta$  Inhibitor LY333531 Attenuates Intercellular Adhesion Molecule-1 and Monocyte Chemotactic Protein-1 Expression in the Kidney in Diabetic Rats. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, *101*, 335–343. [[CrossRef](#)]
102. Navarro, J.F.; Milena, F.J.; Mora, C.; León, C.; García, J. Renal Pro-Inflammatory Cytokine Gene Expression in Diabetic Nephropathy: Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Pentoxifylline Administration. *Am. J. Nephrol.* **2006**, *26*, 562–570. [[CrossRef](#)]
103. Guijarro, C.; Egido, J. Transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and renal disease. *Kidney Int.* **2001**, *59*, 415–424. [[CrossRef](#)]
104. Jha, J.C.; Banal, C.; Chow, B.S.M.; Cooper, M.E.; Jandeleit-Dahm, K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *25*, 657–684. [[CrossRef](#)]
105. Sifuentes-Franco, S.; Padilla-Tejeda, D.E.; Carrillo-Ibarra, S.; Miranda-Díaz, A.G. Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Function in Diabetic Nephropathy. *Int. J. Endocrinol.* **2018**, *2018*, 1875870. [[CrossRef](#)]
106. Manabe, E.; Handa, O.; Naito, Y.; Mizushima, K.; Akagiri, S.; Adachi, S.; Takagi, T.; Kokura, S.; Maoka, T.; Yoshikawa, T. Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia-induced oxidative signaling. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *103*, 1925–1937. [[CrossRef](#)]

107. Penislusshiyam, S.; Chitra, L.; Ancy, I.; Kumaradhas, P.; Palvannan, T. Novel antioxidant astaxanthin-s-allyl cysteine biconjugate diminished oxidative stress and mitochondrial dysfunction to triumph diabetes in rat model. *Life Sci.* **2020**, *245*, 117367. [[CrossRef](#)]
108. Xu, L.; Zhu, J.; Yin, W.; Ding, X. Astaxanthin improves cognitive deficits from oxidative stress, nitric oxide synthase and inflammation through upregulation of PI3K/Akt in diabetes rat. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 6083–6094. [[PubMed](#)]
109. Ying, C.; Zhang, F.; Zhou, X.; Hu, X.; Chen, J.; Wen, X.; Sun, Y.; Zheng, K.; Tang, R.; Song, Y. Anti-inflammatory Effect of Astaxanthin on the Sickness Behavior Induced by Diabetes Mellitus. *Cell Mol. Neurobiol.* **2015**, *35*, 1027–1037. [[CrossRef](#)]
110. Feng, Y.; Chu, A.; Luo, Q.; Wu, M.; Shi, X.; Chen, Y. The Protective Effect of Astaxanthin on Cognitive Function via Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation in the Brains of Chronic T2DM Rats. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 748. [[CrossRef](#)]
111. Strain, W.D.; Paldanius, P.M. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovasc. Diabetol.* **2018**, *17*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Stirban, A.; Gawlowski, T.; Roden, M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Mol. Metab.* **2014**, *3*, 94–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Bartekova, M.; Ferenczyova, K.; Jelemensky, M.; Dhalla, N.S. Role of Oxidative Stress and Cardiovascular Risk Factors in Ischemic Heart Disease. In *Oxidative Stress in Heart Diseases*; Chakraborti, S., Dhalla, N.S., Ganguly, N.K., Dikshit, M., Eds.; Springer: Heidelberg, Germany, 2019; pp. 375–394. ISBN 9789811382727.
114. Iwamoto, T.; Hosoda, K.; Hirano, R.; Kurata, H.; Matsumoto, A.; Miki, W.; Kamiyama, M.; Itakura, H.; Yamamoto, S.; Kondo, K. Inhibition of Low-Density Lipoprotein Oxidation by Astaxanthin. *J. Atheroscler. Thromb.* **2000**, *7*, 216–222. [[CrossRef](#)]
115. Hussein, G.; Goto, H.; Oda, S.; Iguchi, T.; Sankawa, U.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. Antihypertensive Potential and Mechanism of Action of Astaxanthin: II. Vascular Reactivity and Hemorheology in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 967–971. [[CrossRef](#)]
116. Fassett, R.G.; Coombes, J.S. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules* **2012**, *17*, 2030–2048. [[CrossRef](#)]
117. Kishimoto, Y.; Yoshida, H.; Kondo, K. Potential Anti-Atherosclerotic Properties of Astaxanthin. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 35. [[CrossRef](#)]
118. Zhao, Z.-W.; Cai, W.; Lin, Y.-L.; Lin, Q.-F.; Jiang, Q.; Lin, Z.; Chen, L.-L. Ameliorative effect of astaxanthin on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in male rats. *Arzneimittelforschung* **2011**, *61*, 239–246. [[CrossRef](#)]
119. Chan, K.; Chen, S.; Chen, P. Astaxanthin attenuated thrombotic risk factors in type 2 diabetic patients. *J. Funct. Foods* **2019**, *53*, 22–27. [[CrossRef](#)]
120. Tsalamandris, S.; Antonopoulos, A.S.; Oikonomou, E.; Papamikroulis, G.-A.; Vogiatzi, G.; Papaioannou, S.; Deftereos, S.; Tousoulis, D. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur. Cardiol.* **2019**, *14*, 50–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Wellen, K.E.; Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1111–1119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Kim, B.; Farruggia, C.; Ku, C.S.; Pham, T.X.; Yang, Y.; Bae, M.; Wegner, C.J.; Farrell, N.J.; Harness, E.; Park, Y.-K.; et al. Astaxanthin inhibits inflammation and fibrosis in the liver and adipose tissue of mouse models of diet-induced obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *43*, 27–35. [[CrossRef](#)]
123. Lee, S.-J.; Bai, S.-K.; Lee, K.-S.; Namkoong, S.; Na, H.-J.; Ha, K.-S.; Han, J.-A.; Yim, S.-V.; Chang, K.; Kwon, Y.-G.; et al. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol. Cells* **2003**, *16*, 97–105.
124. Zhou, X.; Zhang, F.; Hu, X.; Chen, J.; Wen, X.; Sun, Y.; Liu, Y.; Tang, R.; Zheng, K.; Song, Y. Inhibition of inflammation by astaxanthin alleviates cognition deficits in diabetic mice. *Physiol. Behav.* **2015**, *151*, 412–420. [[CrossRef](#)]



**Article : The protective effect of Astaxanthin on MSCs mediated  
osteogenesis, in diabetes type 2 context**

**Rebecca Landon**, William Bakari, Abolfazl Barzegari, Nathanael Larochette, Olivier Thibaudeau, Hanane El-Hafci, Virginie Gueguen, Graciela Pavon-Djavid, Fani Anagnostou

*(En préparation)*



## 1 Introduction

Le diabète de type 2 (DT2) est un problème de santé majeur qui touche près de 500 millions de personnes dans le monde dont les chiffres sont très largement sous-estimés, étant donné que plus de 50% des personnes atteintes de DT2 ne sont pas diagnostiquées [1]. Le DT2 est une maladie métabolique chronique caractérisée par une hyperglycémie chronique qui, lorsqu'elle n'est pas étroitement contrôlée, affecte de nombreux types de cellules, de tissus et d'organes, entraînant des complications chroniques [9]. Le tissu osseux n'est pas épargné, les patients atteints de DT2 présentant un risque plus élevé de fracture et une altération du remodelage osseux [34,37].

Le développement du diabète et de ses complications est en partie associé au stress oxydatif et à une inflammation chronique [127]. Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les systèmes oxydants et antioxydants cellulaires, il résulte de la surproduction de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'hyperglycémie favorise l'accumulation de produits de glycation avancés (AGE) et de marqueurs de l'inflammation chronique, contribuant à la production accrue de ROS [215,239].

Au niveau cellulaire les ROS peuvent induire de nombreux dommages oxydatifs sur les bases de l'acide nucléique, les lipides et les protéines. Ainsi, un stress oxydatif accru peut gravement compromettre la viabilité cellulaires ou induire diverses voies de signalisation, conduisant à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose [122]. Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSM) jouent un rôle crucial dans la régénération osseuse [147,212,213] or, le microenvironnement diabétique a des effets délétères sur la fonctionnalité des CSMs [214].

Dans les chapitres précédents, utilisant des cellules de rats ZDF, nous avons démontré que (i) le microenvironnement du DT2, limite le potentiel des CSMs (adhésion, survie, prolifération, migration ...), et les rend dysfonctionnelles *ex vivo* [217] (ii) l'exposition des CSMs non diabétiques aux AGES -imitant un microenvironnement diabétique *in vitro*-, a des effets néfastes sur la survie, de la prolifération et de la migration et modifie l'expression génique. Le stress oxydatif généré par les AGEs pouvant être en partie responsable du dysfonctionnement des CSMs, les protéger du stress oxydatif fait partie de stratégies pertinentes proposées actuellement.

Ainsi, l'utilisation d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif au niveau cellulaire suscite un intérêt grandissant. Dans le chapitre précédent (cf : chapitre II), nous avons démontré que (i) l'utilisation de la N-acétylcystéine (NAC), est capable d'atténuer les dommages à l'ADN,

l'apoptose cellulaire et l'oxydation induite par les radicaux libres dans les CSM provenant d'un environnement sain (ii) la NAC est capable de réguler le stress oxydatif intracellulaire au niveau des CSMs issues de rats diabétiques et sains.

Notre revue de littérature suggère une utilisation prometteuse de l'astaxanthine dans le contexte diabétique qui pourrait jouer un rôle important dans la prévention, la progression du DT2 ou la protection face au développement de complication diabétiques [240]. C'est un puissant antioxydant naturel notamment connu pour sa capacité à réduire le stress oxydatif, l'inflammation et l'apoptose; ayant fait l'objets d'études pour diverses applications cliniques telles que l'ischémie, le rajeunissement de la peau ou encore le cancer [203,241,242].

Le but de cette étude est (i) de caractériser les complexes antioxydants à base de Cyclodextrine-Astaxanthin (CD-A) (ii) d'étudier leurs effets sur les CSMs issues d'environnement DT2 ou sains (iii) d'investiguer leur potentiel pour la réparation osseuse.

## **2 Matériel et méthodes**

### **2.1 Synthèse et caractérisation des complexes CD-A**

#### **2.1.1 Synthèse**

Des complexes d'astaxanthine (ASX) et Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (CD; DS=0.67), selon la méthode précédemment utilisée au LVTS [243] (figure III-1) . Brièvement, l'ASX a été solubilisée (1 mg/mL) dans une solution d'acétone/chloroforme (v/v 1:1). Les CD ont été dissoutes à 25mg/mL, dans du méthanol à 95 %. 2mL de la solution d'ASX a été ajouté à 20mL de la solution de CD, puis dégazé à l'azote. Le mélange a été soumis à une sonication de 5 min (bain ultrasonique BANDELIN SONOREX RX-100-H) et agité pendant 24 h à 35 °C, à l'abris de la lumière. Le solvant a été évaporé dans un évaporateur rotatif sous vide (bain 40°C, rotation 20, refroidissement 7°C), puis récupérée dans 10mL d'eau double distillée et filtrée sous hotte. La solution finale a été congelée, lyophilisée (Cryotec, Lyophilisateur Crios, Saint Gely du Fesc, France) et conservée sous forme de poudre à -4 °C, à l'abris de la lumière.

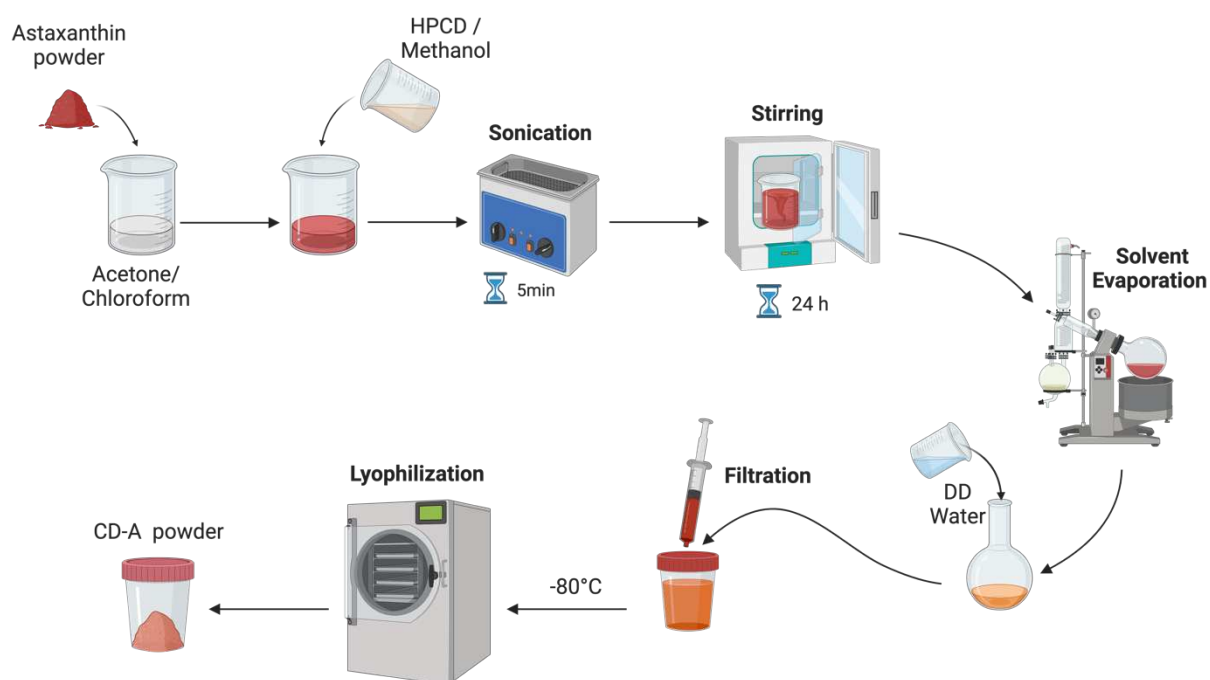


Figure III-1. Méthode de synthèse des complexes CD-A

## 2.1.2 Caractérisation

Afin de déterminer la concentration en astaxanthine incorporée dans les complexes, 5 mg de CD-A synthétisés ont été re-suspendus dans 1 mL de DMSO et analysés par spectroscopie. La concentration d'astaxanthine dans le complexe a été calculé grâce à une courbe d'étalonnage préalablement établie ( $y = 0,0955x$  ;  $\varepsilon = 0,955 \times 10^5 L/mol$ ) et l'équation de la loi de Beer-Lambert :

$$C_{ASX} = \frac{A}{\varepsilon \times l}$$

$C_{ASX}$  est la teneur en astaxanthine dans le complexe d'inclusion (mol/L) ;  $A$  est l'absorbance du pic observé ;  $\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire (L/mol) ;  $l$  est la longueur de la cuve utilisée.

Nous avons déterminé le taux d'incorporation d'astaxanthine lors de la synthèse de nos complexes, grâce à l'équation suivante [244]:

$$\text{taux inclusion (\%)} = \frac{C_{ASX} * W_{CD-A} * V_q}{(W_{ASX} * W_q) * 100}$$

$C_{ASX}$  est la teneur en astaxanthine dans le complexe d'inclusion (g/mL) ;  $W_{CD-A}$  est poids des complexes CD-A (g);  $V_q$  est le volume de solvant utilisé pour la quantification (mL) ;  $W_{ASX}$  est poids d'astaxanthine pour la synthèse (g) et  $W_q$  est le poids de complexes utilisés pour la quantification (g)

### 2.1.3 Test de la capacité antioxydante contre les radicaux d'oxygène (ORAC)

Le test ORAC permet d'estimer le potentiel antioxydant des complexes, en fonction de leur capacité à piéger les radicaux libres. La capacité antioxydante des complexes CD-A a été évaluée selon un protocole précédemment décrit dans la littérature avec modifications [245]. Brièvement, une solution de fluorescéine (0,4µM) a été mélangée avec des CD-A (Astaxanthine de 0,3 à 100 µM), des étalons de Trolox (de 0,3 à 100 µM) ou des blancs (PBS ou CD) puis une solution d'AAPH (80 mM) a été ajoutée dans une microplaque 96 puits. La plaque a été incubée à 37 °C et l'émission de fluorescence a été mesurée pendant 1 h (step : 1min ; filtre d'émission/excitation : 485-528 nm) (i-control™ logiciel de lecture de microplaques, TECAN Männedorf, Suisse).

L'activité antioxydante des complexes a été déterminée à partir de leur capacité à maintenir la fluorescence en présence de radicaux peroxydes. L'AUC et l'AUCnet ont été calculées à l'aide des équations suivantes.

$$AUC = 0.5 + \left( \frac{1}{f_1} \times \left( \text{somme} \left( \left( \frac{f_2}{f_1} \right) + \left( \frac{f_3}{f_1} \right) + \dots \right) + 0.5 \times f_n \right) \right)$$

$$AUC_{net} = AUC_{\text{echantillon}} - AUC_{AAPH}$$

$f_1$  est la valeur initiale de la fluorescence à 0 min ;  $f_i$  est la valeur de la fluorescence au temps  $i$  ;  $f_n$  est valeur finale de la fluorescence à 60 min.

## 2.2 Effet des CD-A sur les CSMs *in vitro*

### 2.2.1 Évaluation de la cytotoxicité par MTT

La viabilité des cellules a été évaluée à l'aide du test MTT. Brièvement, des CSMs issues de rats diabétiques ZDF (24 semaines) ou de leur homologues sains ZL ont étéensemencées à  $3 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> en plaques 96 puits. Après 12h, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de CD-A (2,5-5-10 µM) ou de NAC (2,5-5-10 mM), en milieu complet (αMEM+10%SFV+1%ATB, contrôle de toxicité négatif, « Control »), ou 10 % DMSO (contrôle de toxicité positif) pendant 24 h. Ensuite, 20µL de solution MTT (0,5 mg/mL) ont été ajoutés dans le milieu, et les cellules ont été incubées pendant 4h à 37°C. Le milieu a été aspiré et 200µL de DMSO ont été ajoutés pour dissoudre les cristaux de formazan formés. L'absorbance a été mesurée à 490 nm. La cytotoxicité des échantillons a été considérée comme

nulle si la viabilité cellulaire était > 70 % du contrôle (selon la norme ISO 10993:2009 relative à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux).

## 2.2.2 Mesure de l'activité antioxydante intracellulaire des CD-A

Pour déterminer l'activité antioxydante intracellulaire des complexes CD-A nous avons utilisé la sonde CM-H2DCFDA, cette sonde n'émet pas de fluorescence dans son état initial. Après avoir traversé la membrane cellulaire, le DCFH-DA est hydrolysé par des estérases intracellulaires en DCFH, qui devient fluorescent une fois oxydé en DCF, en présence de ROS. L'accumulation de ROS intracellulaire est donc mesurée par l'émission de fluorescence (excitation 485nm/ émission 530nm).

Pour les expériences de pré-exposition : les CSMs issues de rats ZDF ou ZL ont étéensemencées à  $10^4$  cellules/puit en plaque 96puits ( $3 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>) puis exposées pendant une nuit avec un milieu complet contenant des CD-A (2,5-5-10  $\mu$ M) ou la NAC (5mM). Après 24 heures, le milieu a été changé pour ajouter la sonde CM-H2DCFDA (5  $\mu$ M) pendant 1 h, à l'abri de la lumière avant d'induire le stress oxydatif intracellulaire.

Pour les expériences de co-exposition : 5 $\mu$ M de CD-A ont été ajoutés en même temps que l'inducteur de stress oxydatif et comparé à une co-exposition avec la NAC à 5mM.

Trois inducteurs de stress oxydatifs intracellulaires (iROS) ont été utilisés : le peroxyde de di-tert-butyle ou t-BuOOH (100  $\mu$ M), l'AAPH (25mM) et les produits de glycation avancés ou AGEs (100  $\mu$ g /mL). La fluorescence a été mesurée en cinétique, toutes les 5 minutes pendant 60 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre (FL600). La capacité de CD-A à réduire le stress oxydatif intracellulaire a été évaluée selon l'équation suivante :

$$CAA (\%) = \frac{I_c - I_a}{I_c} \times 100$$

Où  $I_c$  et  $I_a$  représentent respectivement l'intensité des cellules exposées aux inducteurs de stress oxydatif sans et avec présence d'antioxydant au même temps.

## 2.2.3 Expression génique

Afin d'étudier le profil d'expression génique en présence des CD-A, les CSMs ont été cultivées dans des milieux de culture complets ou contenant des CD-A à 5  $\mu$ M ou la NAC à 5mM pendant 48h. L'ARN a été extrait des cellules avec le réactif Trizol (Life Technologies) selon le protocole du fabricant. Après purification de l'ARN et quantification par spectrophotométrie (spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), l'ADNc a été synthétisé à partir de 1  $\mu$ g d'ARN total à l'aide du kit SuperScript™ II RT (Invitrogen). La

qRT-PCR a été réalisée à l'aide d'un appareil de thermocyclage iCycler (MyiQ™ Single-Color RT-PCR ; Laboratoires Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) en présence de 500 ng d'ADNc, du TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) et des amorces spécifiques suivantes : Interleukine 1 beta recombinante (IL1beta ; Rn 00580432\_m1), TNF superfamily member 11 (RANKL ; Rn 00589289\_m1), chemokine C-X-C motif ligand 1 (Cxcl1 ; Rn 00578225\_m1) ; Runt-related transcription factor 2 (Runx2 ; Rn 01512298\_m1), alkaline phosphatase (PDZ and LIM domain 3 ALP ; Rn 01516028\_m1) ; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg ; Rn 00440940\_m1) ; insulin-like growth factor 1 (IGF-1 ; Rn 00710306\_m1), hypoxia-inducible factor 1 (Hif-1 $\alpha$  ; Rn 00577560\_m1) ; Récepteur des produits de glycation avancée (Ager ; Rn 00584249\_m1). Comme contrôle interne pour les mesures d'expression génique, nous avons utilisé le contrôle endogène de l'ARN 18S (gène de ménage avec un niveau d'expression constant). La quantification de l'expression des gènes a été réalisée à l'aide de la méthode du cycle à seuil comparatif ( $\Delta\Delta Ct$ ).

## 2.3 Étude *in vivo*

### 2.3.1 Synthèses des hydrogels

Pour les implantations *in vivo*, deux types d'hydrogels, ont été préparées selon la méthode mise en place au laboratoire B3OA, (i) « control » : hydrogels non chargés en antioxydants ; (ii) « Antioxydant loaded » : hydrogels contenant des complexes CD-A. Nous avons, pour notre étude, choisi de charger nos hydrogels avec une concentration finale d'astaxanthine égale à 2,5 $\mu$ M. Brièvement, un mélange de deux Mix (tableau III-1) a été déposé et homogénéisé sur pastilles hydrophobiques en polytétrafluoroéthylène (PTFE), préalablement autoclavées. Le Mix1 contenait de l'HEPES et du fibrinogène, préalablement chauffé à 37°C. Selon le type d'hydrogel préparé, le Mix 2 contenait de l'HEPES, de l'aprotinine, de la trombine et une solution d'HEPES contenant les antioxydants à une concentration deux fois supérieure à la concentration finale souhaitée. Les Mix déposés sur les pastilles de PTFE étaient ensuite polymérisés pendant 1h30 à 37°C en atmosphère humide. Les pastilles PTFE utilisées pour l'implantation en défaut sub-critique faisaient 4mm de diamètre et accueillait 30 $\mu$ L d'hydrogel.

**Tableau III-1** Composition des hydrogels utilisés pour cette étude. Les volumes indiqués correspondent à la préparation 300uL pour faire 10 hydrogels de 30uL finaux chacun

Composition	Mix	Control	Antioxydant loaded	Final Concentration
<b>Fibrinogen (50 mg/mL)</b>	<b>1</b>	108 µL	108 µL	Fibrinogen (18 mg/mL)
<b>HEPES (10mM)</b>	<b>1</b>	15 µL	15 µL	HEPES (0,5mM)
<b>Aprotinin (3000 U/mL)</b>	<b>2</b>	11,2 µL	11,2 µL	Aprotinin (111 U/mL)
<b>Thrombin (500 U/mL)</b>	<b>2</b>	10,8 µL	10,8 µL	Thrombin (18 U/mL)
<b>HEPES (10mM)</b>	<b>2</b>	5 µL	5 µL	HEPES (5,1mM)
<b>Salts: NaCl (3M) + CaCl<sub>2</sub> (0.4M) ± Antioxydant (2X)</b>	<b>2</b>	150 µL - Antioxydant	150 µL + Antioxydant	NaCl (0,15M) CaCl <sub>2</sub> (0.02M) ± Antioxydant (1X)

### 2.3.2 Animaux et modèle expérimental

Six rats Wistar mâles, âgés de 12 semaines (Janvier Lab, France), ont été utilisés dans cette étude. Les animaux ont été logés à température (20-22 °C) et humidité ambiante (de 55 %), et ont été exposés à un cycle lumière/obscurité de 12 heures (pour maintenir un rythme biologique jour/nuit normal). Ils ont été nourris ad libitum avec des aliments de laboratoire standard et ont été manipulés conformément aux lignes directrices européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (directive 2010/63/UE).

Deux défauts osseux de 4 mm de diamètres ont été créés (en bi-latéral) au niveau de la calvaria. Ils ont été comblés avec un hydrogel contenant des CD-A ou un hydrogel control, aléatoirement répartis entre gauche et droite. Une analyse radiologique ( $\mu$ CT *in vivo*) a été effectuée : subséquente à l'opération (J0), à 7jours et à 14jours. Les animaux ont été euthanasiés 14jours après la chirurgie et les calvarias prélevées pour l'analyse histologique.

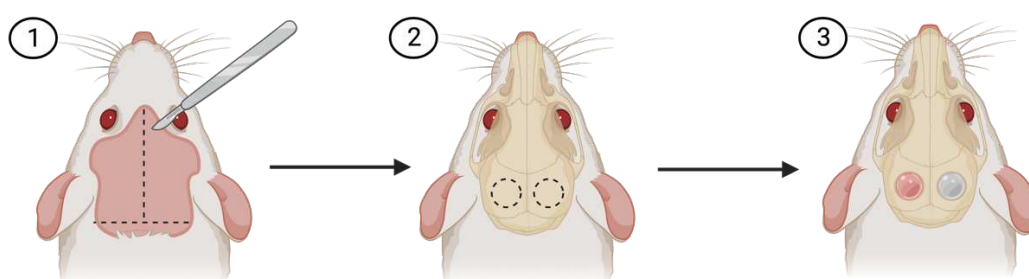
### 2.3.3 Protocole chirurgical

**Anesthésie :** Avant la chirurgie, chaque rat été anesthésié par l'inhalation de 2% d'isoflurane et d'oxygène, puis a reçu une analgésie préventive par injection intrapéritonéale de buprénorphine (0,05 mg/kg de poids animal). Une anesthésie profonde a été induite par



injection sous-cutanée d'un mélange de kétamine (IMALGENE® : 40-80 mg/kg de poids) et de médétomidine (DOMITOR® : 0,5-1 mg/kg de poids de l'animal).

**Chirurgie :** Chaque rat a été transféré sur un coussin chauffant, maintenu à 37 °C sur le champ opératoire. (1) La tête des animaux a été rasée et désinfectée à la Betadine® avant de pratiquer à une incision en forme de T. La peau puis le périoste ont été soulevés pour exposer les os de la calvaria. (2) Deux défauts circulaires de 4mm de diamètre (os pariétal droite et gauche) ont été réalisés à l'aide de trépan (sous irrigation constante avec du sérum physiologique) en prenant soin d'éviter la perforation de la dure-mère. (3) Chaque site de défaut a été comblé avec un hydrogel préalablement synthétisé. Enfin, le périoste et la peau des animaux ont été suturés avec des fils résorbables.



*Figure III-2. Schéma simplifié chirurgie de formation de défauts dans la calvaria de rats*

**Soins post-chirurgicaux :** Après la chirurgie, tous les animaux ont reçu les injections sous-cutanées suivantes : (i) Buprénorphine, pour soulager la douleur pendant la période postopératoire ; (ii) Baytril® à 5 %, comme traitement antibactérien prophylactique ; et (iii) Antisedan® (5 mg/mL), pour accélérer le réveil et maintenus sur le tapis chauffant jusqu'à leur réveil. Chaque rat a été gardé dans une cage séparée sous haute surveillance pendant 24h et ont reçu des injections quotidiennes de Buprénorphine les 3 jours suivant la chirurgie

**Sacrifice :** Les animaux ont été anesthésié par l'inhalation de 2% d'isoflurane et d'oxygène, puis maintenus en anesthésie sous masque à 4% d'isoflurane. Ils ont été sacrifiés 14 jours après la chirurgie à l'aide d'une surdose de pentobarbital (DOLETHAL®) en intracardiaque. La calvaria a ensuite été excisé, nettoyé et préparé pour l'analyse.

#### 2.3.4 Analyse micro-CT

Une analyse longitudinale de la radio-opacité des défauts a été réalisée aux jours 0, 7 et 14 à l'aide d'un micro-scanner *in vivo*, non invasif, à haute résolution (micro-CT, Skyscan 1176, Brucker, Aartselaar, Belgique). Les rats ont été anesthésiés à l'aide d'isoflurane 2% et maintenus tout au long de la procédure. Les images ont été acquises avec les paramètres suivants : Tension de 65 kV, courant de 373 uA, temps d'exposition de 58 ms, et un pas de rotation de 0,7° à

travers un filtre en aluminium de 1 mm d'épaisseur. La durée d'acquisition des images par rat était de 6 minutes et 44 secondes. Chaque image tridimensionnelle (3D) a été reconstruite en utilisant une taille moyenne de voxel de 35- $\mu$ m et en utilisant le logiciel de reconstruction du fabricant (NRecon Skyscan 1176, Bruker, Aartselaar, Belgique). La visualisation 3D a été réalisée avec le logiciel CTVox (Skyscan 1176, Bruker, Aartselaar, Belgique). L'analyse quantitative du volume de la radio-opacité a également été réalisée avec les logiciels DataViewer et CTAn (Skyscan 1176, Bruker, Aartselaar, Belgique). Pour chaque rat et chaque défaut, une région d'intérêt (ROI) cylindrique de 120px = 4,2mm de diamètre, correspondant au diamètre du défaut ; la hauteur du cylindre a été fixée en fonction de chaque défaut et animal à temps 0. La ROI pour chaque individu et a ensuite été utilisée comme référence pour les données respectives obtenues aux jours 7 et 14. Les hydrogels testés, indifféremment de leur composition, sont radio-transparents permettant d'associer la radio-opacité mesurée au tissu osseux nouvellement formé.

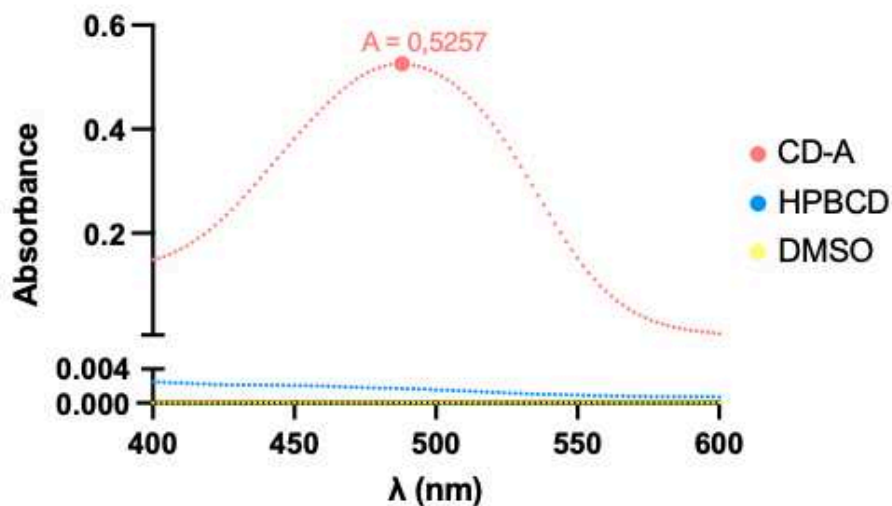
### 2.3.5 Histologie

Les calvaria excisés ont été préparés pour une analyse histologique déminéralisée. Les tissus ont été fixés dans du formol paraformaldéhyde à 4 % (Antigenfix, Microm Microtech, France) sous agitation pendant 24 h puis décalcifié dans de l'ostéosoft® (Merck Millipore) en contrôlant la radio-opacité des échantillons au Faxitron X-ray 2 fois par semaines. La déshydratation a été réalisée dans des bains d'alcool ascendants (éthanol absolu  $\geq 99,8$  %, VWR Chemicals), puis dans du toluène (Toluène N/A  $\geq 99$  %, VWR Chemicals), suivi d'une imprégnation à la paraffine (Paraplast X-TRA, LEICA Biosystems) à l'aide d'un LEICA TP1020. Ils ont ensuite été inclus dans de la paraffine à l'aide d'une plateforme d'inclusion LEICA EG1150H. Des coupes  $\leq 6$   $\mu\text{m}$  ont été réalisées à l'aide d'un microtome (LEICA RM2255) puis une coloration Trichrome de Masson mettant en valeur la kératine et les fibres musculaires (rouge), le collagène et l'os (en bleu ou vert), les cytoplasmes (rouge ou rose), les noyaux de cellules (noir) ou une coloration Picrofuschin de Van Gieson et bleu de Stevenel mettant en évidence le tissu osseux (rose) et des noyaux cellulaires (bleu).

### 3 Résultats

#### 3.1 Caractérisation

A l'aide d'une courbe d'étalonnage de l'astaxanthine solubilisée dans le DMSO (absorbance en fonction des concentrations en  $\mu\text{M}$ ) nous avons pu établir la teneur en astaxanthine par mg de complexe. La figure III-3 présente l'absorbance (400-600 nm) du complexe CD-A dissout en DMSO en fonction de la longueur d'onde ( $\lambda$ ). L'absorbance à 480 nm, caractéristique de l'astaxanthine, a été utilisée pour le calcul du taux d'inclusion de l'astaxanthine dans le complexe. Tous les lots CD-A synthétisés ont été caractérisés par la même méthode ; à titre d'exemple, pour le lot présenté dans la Fig III-3, la proportion d'astaxanthine dans les complexes CD-A est de 0,065 % (soit 0,065mg ASX dans 100mg de CD-A).



$$C_{ASX} = \frac{A}{\epsilon \times l} = \frac{0,5257}{0,955 \times 10^5 \times 1} = 5,5 \times 10^6 \text{ mol/L}$$

$$5 \text{ mg CD-A} \rightarrow C_{ASX} = 5,5 \mu\text{M}$$

Figure III-3. Caractérisation des complexes CD-A

Selon le modèle de régression proposé par Dong et coll. [244] , un taux d'inclusion de  $13,19 \pm 0,97$  lors de la synthèse des CD-A.

### 3.1.1 Capacité antioxydante des CD-A contre les radicaux d'oxygène

La capacité antioxydante des complexes a été évaluée par le test ORAC, qui évalue le potentiel à inhiber espèces réactives de l'oxygène générées par la décomposition de l'AAPH. La figure III-4 présente les AUCnet vs la concentration (mM) des antioxydants : le Trolox utilisé comme standard et les CDA dont la concentration en mM correspond à la concentration d'astaxanthine dans la solution. La pente de la droite de régression représente l'activité antioxydante et le rapport de pentes permet de calculer le « Trolox equivalent antioxidant capacity » TEAC ( $\alpha_{CDA} = 1,124$  ;  $\alpha_{Trolox} = 1,171$ ). Le TEAC calculé est de 1,04 ce qui montre que la capacité antioxydante des complexes CD-A est comparable à celle du Trolox.

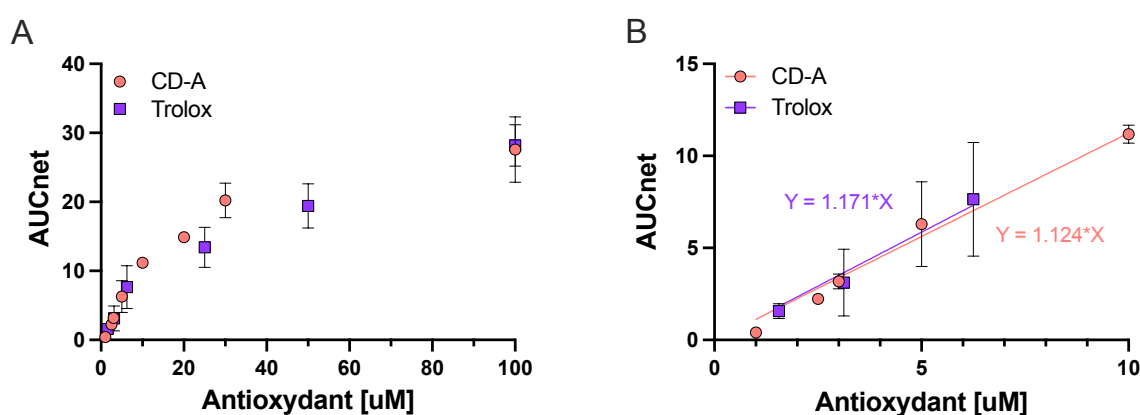


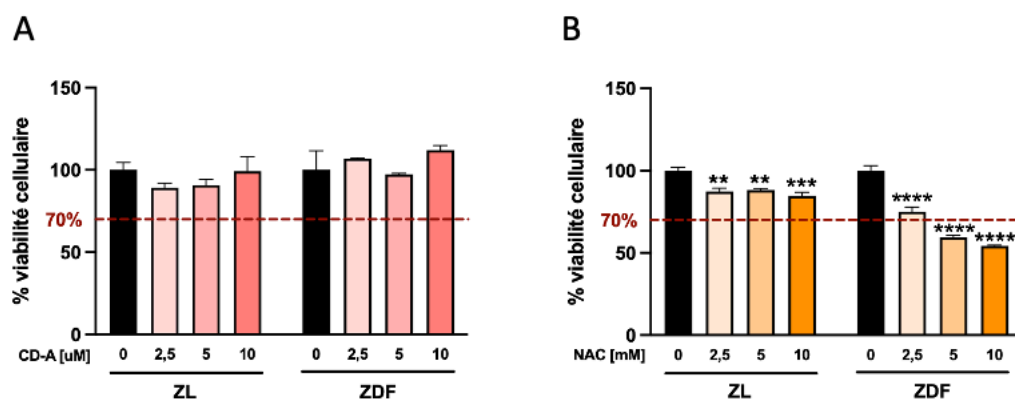
Figure III-4. Capacité antioxydante des complexes CD-A. (A) Courbe complète de 0 à 100µM (B) Régression linéaire avant plateau d'AUCnet

## 3.2 Effet des CD-A sur les CSMs *in vitro*

### 3.2.1 Cytocompatibilité des complexes CD-A

Pour évaluer la cytocompatibilité des complexes CD-A sur les CSMs, en comparaison à celle de la N-acetylcystéine (NAC) qui est un antioxydant de référence, les cellules issues de rats diabétiques ZDF (24 semaines) ou de leur homologues sains ZL ont été cultivées en milieu complet supplémenté à différentes concentrations de CD-A ou de NAC, en milieu complet pendant 24 h. Dans ces conditions, les CD-A de 2,5 à 10 µM n'ont pas affecté la viabilité de CSMs, indifféremment de l'origine (Figure III-5 A). Au contraire, la NAC à 2,5 – 5 et 10mM a significativement réduit le nombre des CSMs des deux populations (Figure III-5 B). Plus précisément, le nombre des CSMs issues des rats ZL, a été réduite de 11,79 à 15,37% ( $p < 0,01$ ), effet restant non cytotoxique selon la norme ISO 10993:2009. Néanmoins, un effet cytotoxique a été observé à 5 et 10mM de NAC sur les CSMs issues des rats ZDF avec une

diminution du nombre de cellules >30% (40,5% et 45,87%, respectivement pour 5 et 10mM ;  $p < 0,0001$ ).



**Figure III-5.** Évaluation *in vitro* de la cytocompatibilité du complexe CD-A et d'un antioxydant de référence le N-acétylcystéine (NAC). Viabilité cellulaire des CSMs issues de rats ZDF ou ZL, après 24h d'exposition au complexe CD-A (A) ou au NAC (B). La ligne en pointillés représente la limite sous laquelle un produit est considéré cytotoxique. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les données proviennent de 3 puits indépendants par condition, représentatifs de 2 expériences indépendantes ( $n = 6$ ). \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Le pH est un facteur à prendre en compte dans la cytocompatibilité d'un milieu de culture, ainsi nous avons mesuré le pH des solutions d'antioxydants en milieu de culture  $\alpha$ MEM et constaté une légère augmentation du pH en présence des complexes CD-A alors que la NAC induisait une acidification de 7,1 jusqu'à 6,7 pour la 10mM de NAC dans un milieu complet à température ambiante, pouvant être en partie à l'origine de la cytotoxicité observée (Tableau III-2).

**Tableau III-2** Mesure du pH des milieux de culture complets en présence d'antioxydants à différentes concentrations, avant une exposition aux CSMs

	2,5	5	10
CD-A [µM]	7,4	7,53	7,54
NAC [mM]	7,1	7,12	6,7

### 3.2.2 Effet antioxydant des CD-A sur les ROS intracellulaires

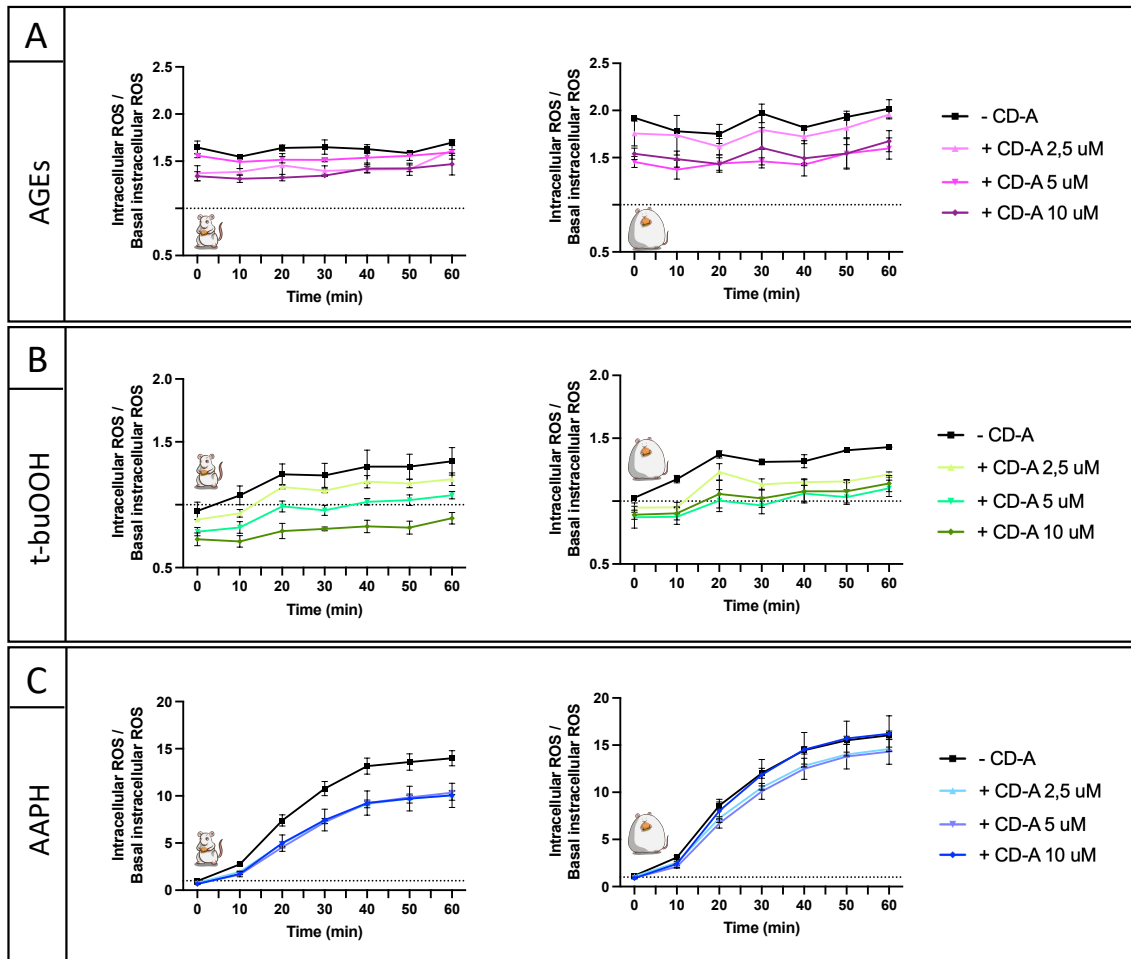
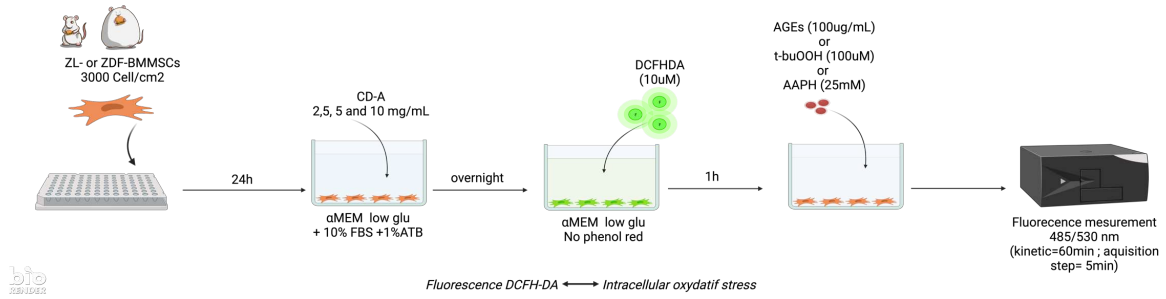
Afin d'évaluer le potentiel antioxydant intracellulaire des CD-A en comparaison à l'antioxydant de référence NAC, les CSMs-ZDF et -ZL ont été pré- ou co-exposées à des concentrations croissantes de CD-A. Trois inducteurs de stress oxydatifs intracellulaires (iROS) ont été utilisés : les AGEs, le t-buOOH, l'AAPH ; et les iROS ont été mesurés grâce à la sonde fluorescente CM-H2DCFDA. Pour rappel, lors des expériences de pré-exposition, les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes de CD-A pendant une nuit, avant l'induction du stress oxydatif. Pour les expériences de co-exposition, 5 $\mu$ M de CD-A ont été ajoutés en même temps que l'inducteur de stress oxydatif. La capacité antioxydantes des CD-A a été comparée à celle de la NAC à 5mM en pré- ou co-exposition.

Dans les CSMs-ZL et -ZDF, la pré-exposition aux CD-A a permis une réduction des iROS induits par les AGEs, le t-buOOH et l'AAPH (Figure III-6 A). Les inducteurs de stress oxydatifs ne générant pas les mêmes taux d'iROS on observe ainsi des variations dans la capacité antioxydante des complexes.

La pré-exposition aux CD-A a permis une réduction du taux d'iROS très rapidement et constant sur 60min face à une exposition aux AGEs et au t-buOOH (Figure III-6 A et B) avec un effet dose dépendant. On note cependant que des concentrations plus faibles en CD-A en pré-exposition permettent de protéger les CSMs-ZDF par rapport aux CSMs-ZL (IC50 14,18 vs. IC50 22,22). Les niveaux d'iROS induits par le t-buOOH étaient plus faibles que ceux induits par les AGEs et augmentaient faiblement pour atteindre un plateau après 20 min dans les deux populations (Figure III-6 B). La pré-exposition aux CD-A a induit à 10 $\mu$ M une réduction sous le stress basal intracellulaire chez les CSMs-ZL et un effet dose dépendant plus prononcé que chez les CSMs-ZDF. La génération de iROS par AAPH, proche du niveau basal à t=0 augmente avec le temps pour atteindre un signal 15fois supérieur au niveau basal après 60min d'incubation (Figure III-6 C) La pré-exposition avec les CD-A a réduit significativement ( $p < 0,0001$ ) d'en moyenne 30,5% les iROS chez les CSMs-ZL, à partir de 20min. On n'observe cependant pas d'effet de la concentration. Au contraire chez les CSMs-ZDF la concentration de 10 $\mu$ M de CD-A en pré-exposition n'a eu aucun effet antioxydant bien qu'une réduction iROS ait été observée avec la pré-exposition à 2,5 et 5 $\mu$ M de CD-A.



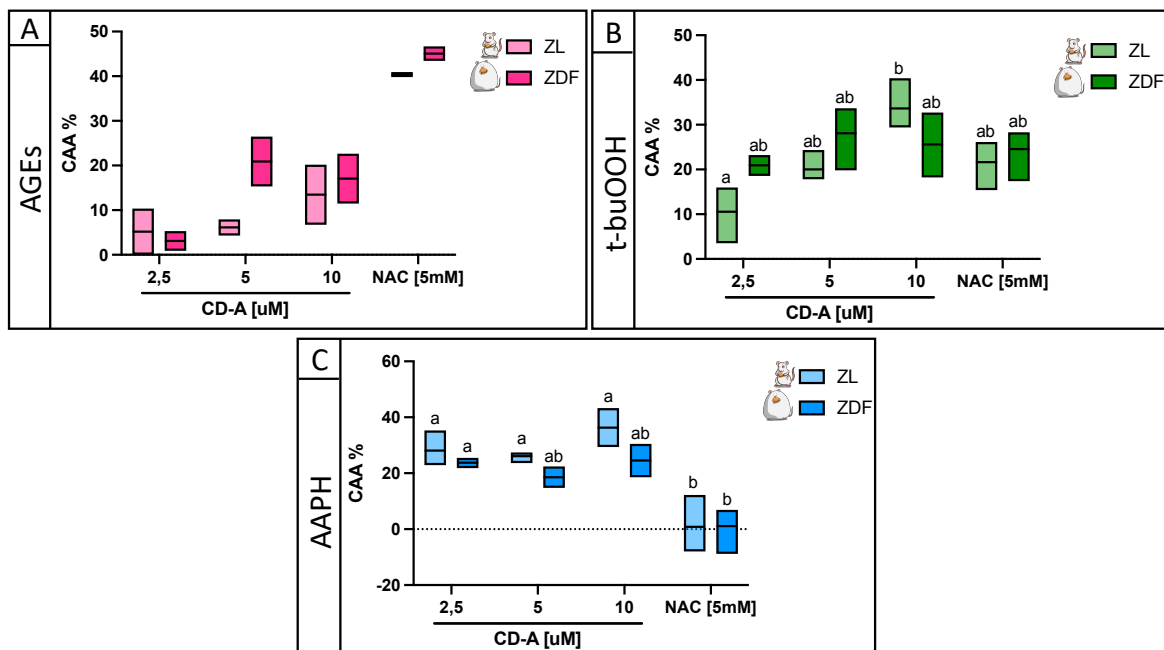
Chapitre III - POTENTIEL DE L'ASTAXANTHINE POUR RETABLIR L'EQUILIBRE REDOX DES CSMs, DANS LE CONTEXTE DT2, ET LA REPARATION OSSEUSE



**Figure III-6.** Impact de la pré-exposition des complexes cyclodextrine-astaxanthine (CD-A) sur la mesure des espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les ZDF-CSM et les ZL-CSM, lorsqu'elles sont exposées à (A) 100 $\mu$ g/mL d'AGEs-BSA ; (B) 100 $\mu$ M de di-tert-butyl-peroxyde (t-buOOH) et (C) 25mM d'AAPH ; les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. (n = 3). La mesure des ROS intracellulaires a été réalisée en cinétique pendant 60 minutes avec la sonde fluorescente CM-H2DCFDA. Les données proviennent de 3 puits indépendants par condition, représentatifs de 2 expériences indépendantes (n = 6). \*\*\* p < 0.001

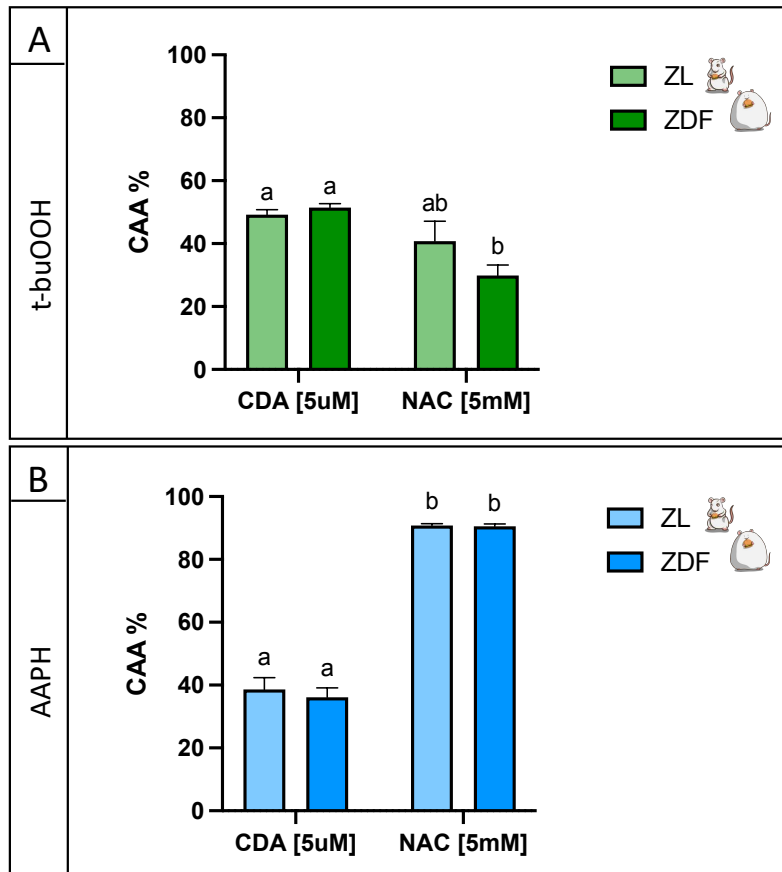
L'activité antioxydante cellulaire (CAA) du complexe CD-A a été calculé après 60 min d'exposition à un inducteur d'iROS lors d'une pré- ou co-exposition (Figure III-7 et III-8).

La pré-exposition aux CD-A a réduit les iROS dans les deux populations cellulaires ; Pourtant, la pré-exposition CD-A s'est avéré présenter une CAA au moins deux fois moins importante contre les AGEs que la NAC (Figure III-7 A). Face au t-buOOH, les pré-expositions CD-A et NAC ont présenté des CAA comparables chez les CSMs-ZDF, entre 20 et 28% (Figure III-7 B). La pré-exposition CD-A a un effet antioxydant significativement ( $p < 0,01$ ) plus important à  $10\mu\text{M}$  par rapport à  $2,5\mu\text{M}$  face au t-buOOH chez les CSMs-ZL avec un CAA 3,2 fois plus important. Enfin face à l'AAPH, la pré-exposition CD-A, pour toutes les concentrations, chez les CSMs-ZL s'est avéré significativement ( $p < 0,05$ ) plus efficace que la pré-exposition NAC (Figure III-7 C). Des données complémentaires permettraient de consolider ces résultats statistiquement.



**Figure III-7.** L'activité antioxydante cellulaire (CAA) du complexe cyclodextrine-astaxanthine (CD-A) utilisé en pré-exposition a été évalué par la capacité à réduire les espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les ZDF-CSM et les ZL-CSM, mesurés par la sonde CM-H2DCFDA. Les ROS ont été induits par une exposition à (A)  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  d'AGEs-BSA ; (B)  $100\mu\text{M}$  de di-tert-butyl-peroxyde (t-buOOH) et (C)  $25\text{mM}$  d'AAPH pendant 60min; les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. ( $n = 3$ ). Les données proviennent de 3 puits indépendants par condition, représentatifs de 2 expériences indépendantes ( $n = 6$ ). La NAC a été utilisé comme référence antioxydante à  $5\text{mM}$ , Les données qui ne sont pas reliés par la même lettre sont significativement différents ( $p < 0,05$ ).

La co-exposition CD-A, à 5 $\mu$ M, a montré un CAA significativement ( $p < 0,05$ ) plus important que la co-exposition NAC contre le t-buOOH mais moins important ( $p < 0,0001$ ) contre l'AAPH (Figure III-8). De manière générale la co-exposition permet une activité antioxydante des CD-A et de la NAC plus importantes dans les deux types cellulaires.

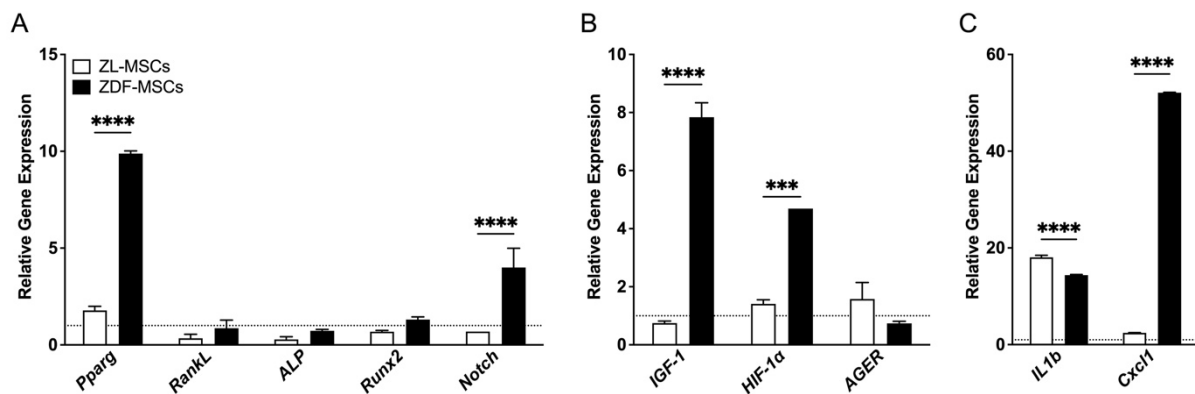


**Figure III-8.** L'activité antioxydante cellulaire (CAA) du complexe cyclodextrine-astaxanthine (CD-A) utilisé en co-exposition a été évalué par la capacité à réduire les espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires dans les ZDF-CSM et les ZL-CSM, mesurés par la sonde CM-H2DCFDA. Les ROS ont été induits par une exposition à (A) 100 $\mu$ M de di-tert-butyl-peroxyde (t-buOOH) et (B) 25mM d'AAPH pendant 60min; les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. ( $n = 3$ ). Les données proviennent de 3 puits indépendants par condition, représentatifs de 2 expériences indépendantes ( $n = 6$ ). La NAC a été utilisé comme référence antioxydante à 5mM, Les données qui ne sont pas reliés par la même lettre sont significativement différents ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Effet de CD-A sur l'expression de gènes relatif à l'ostéogénèse et l'inflammation

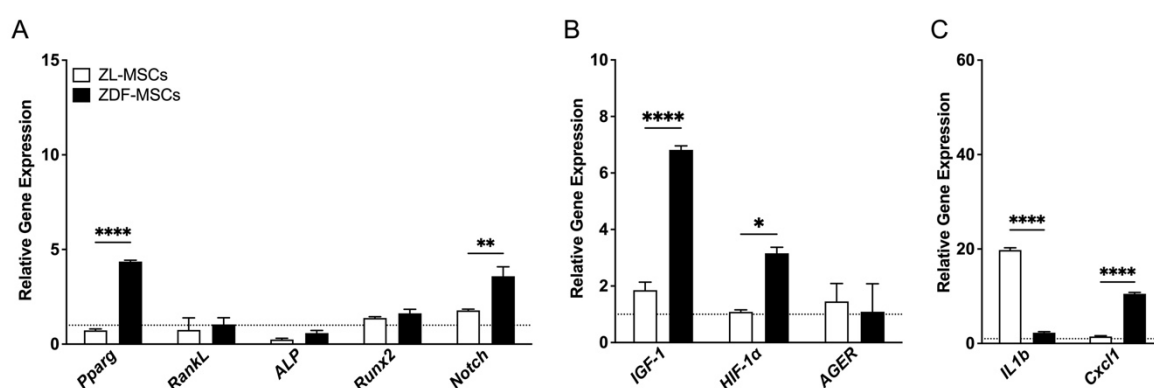
Afin de caractériser l'effet de la pré-exposition antioxydant sur les ZL-CSMs, nous l'avons comparé à celui sur les ZDF-CSMs. Dans ce but, les cellules ont été cultivées en absence ou en présence de CD-A (5 $\mu$ M) ou NAC (5mM) ajoutés dans un milieu de culture contenant 10% de FCS dans des conditions normoglycémiques pendant 48h.

Chez les ZL-CSMs, l'exposition aux CD-A pendant 48h a conduit à une augmentation significative de l'expression des gènes IL1b (de 18,06 fois ;  $p < 0,0001$ ) et Cxcl1 (de 2,43 fois ;  $p < 0,05$ ) par rapport au cellules non traitées (Figure III-9). Chez les ZDF-CSM, le traitement CD-A a induit une régulation à la hausse significative ( $p < 0,0001$ ) de nombreux gènes. Notamment des gènes relatifs à l'inflammation, IL1b et Cxcl1 (respectivement de 14,37 fois et 52,1 fois). Mais aussi de gènes associés au microenvironnement DT2 : IGF-1 et HIF-1 $\alpha$  (respectivement de 7,84 fois et de 4,69 fois) et gènes relatifs à a différenciation tels que Pparg et Notch (respectivement de 9,88 fois et de 4 fois).



**Figure III-9.** Expression de certains gènes liés à la différenciation Pparg, ALP, Runx2, RankL, Notch (A), au microenvironnement diabétique IGF-1, HIF-1 $\alpha$ , AGER (B) et à l'inflammation IL1b, Cxcl1 (C) de ZL (blanc) et ZDF-CSMs (noir) cultivés avec 5 $\mu$ M CD-A dans des conditions normoglycémiques pendant 48h. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. (n = 3). Le changement d'expression est analysé sur la base du numéro de cycle de la PCR (Ct) par rapport à l'expression basal au même temps. L'ARNr 18S a été utilisé pour la normalisation les données en tant que contrôle endogène. La quantification relative de l'expression des gènes a été représentée selon la méthode de Pfaffl et coll. Chaque réaction a été réalisée en trois exemplaires. \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Lors d'une exposition à la NAC pendant 48h, le profil d'expression génique est modifié chez les deux types cellulaires (Figure III-10). On constate une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) de l'expressions d'un gène relatif à l'inflammation : IL1b chez les ZL-CSMs (de 19,77 fois) et Cxcl1 chez les ZDF-CSMs (de 10,52 fois). Les gènes relatifs au microenvironnement diabétiques sont aussi surexprimés lors du traitement NAC sur les ZDF-CSMs, avec une augmentation pour IGF-1 (de 6,82 fois ;  $p < 0,0001$ ) et HIF-1 $\alpha$  (de 3,16 fois ;  $p < 0,05$ ), ainsi que les gènes relatifs à la différenciation : Pparg (de 4,36 fois ;  $p < 0,0001$ ) et Notch (de 3,59 fois ;  $p < 0,001$ ).



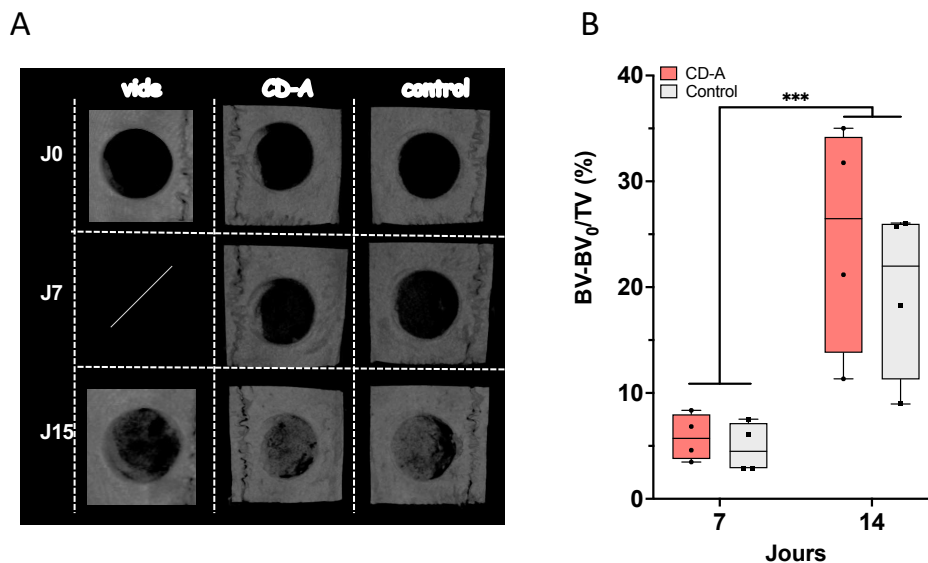
**Figure III-10.** Expression de certains gènes liés à la différenciation Pparg, ALP, Runx2, RankL, Notch (A), au microenvironnement diabétique IGF-1, HIF-1 $\alpha$ , AGER (B) et à l'inflammation IL1b, Cxcl1 (C) de ZL (blanc) et ZDF-CSMs (noir) cultivés avec 5mM NAC dans des conditions normoglycémiques pendant 48h. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. (n = 3). Le changement d'expression est analysé sur la base du numéro de cycle de la PCR (Ct) par rapport à l'expression basal au même temps. L'ARNr 18S a été utilisé pour la normalisation les données en tant que contrôle endogène. La quantification relative de l'expression des gènes a été représentée selon la méthode de Pfaffl et coll. Chaque réaction a été réalisée en trois exemplaires. \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Si les deux traitement antioxydants induisent des modifications du profils d'expression génique suivant la même tendance sur nos CSMs issues d'animaux ZDF et Lean (Figure III-9 et III-10), on constate cependant des différences entre l'exposition NAC et CD-A. Chez les CSMs issues d'animaux ZDF, l'exposition aux CD-A augmente significativement ( $p < 0,0001$ ) l'expression de Pparg (2,27 fois), IL1b (6,3 fois) et Cxcl1 (4,95 fois) par rapport à l'exposition à la NAC (annexe III-1 A). Chez les CSMs Lean on observe au contraire une diminution significative ( $p < 0,01$ ) de l'expression de IL1b (1,09 fois) lors d'un traitement avec les CD-A par rapport au traitement NAC (annexe III-1 B).

### 3.3 Étude *in vivo*

#### 3.3.1 Analyse micro-CT

Pour étudier la réparation osseuse en présence d'antioxydants, nous avons utilisé un modèle de défaut sub-critique de 4mm de diamètre dans la calvaria, réalisé en bilatéral, avec un contrôle sans CD-A sur le même rat. Des scans micro-CT *in vivo* des défauts comblés avec des hydrogels chargés en CD-A ou non, ont été réalisés immédiatement après la chirurgie au jour 0, 7 et 14 (J0, J7, J14). A J0, aucune radio-opacité n'est constaté dans les défauts, preuve que les hydrogels sont radio-transparents et que toute variation de la radio-opacité témoignera de la formation d'un tissu minéralisé, à l'intérieur du défaut. Dès 7 jours, une augmentation de la radio-opacité a été observée dans les défauts, indistinctement de la présence de CD-A (Figure III-11). Une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la radio-opacité dans les défauts est constaté dans tous les défauts entre 7 et 14 jours. Bien que nous ne puissions pas conclure que la présence de CD-A améliore significativement la cinétique de réparation osseuse, nous observons une tendance à l'augmentation de la formation de tissu minéralisé par rapport aux hydrogels seuls à 14 jours, avec en moyenne 1,7 fois plus de tissu minéralisé formé en présence de CD-A.

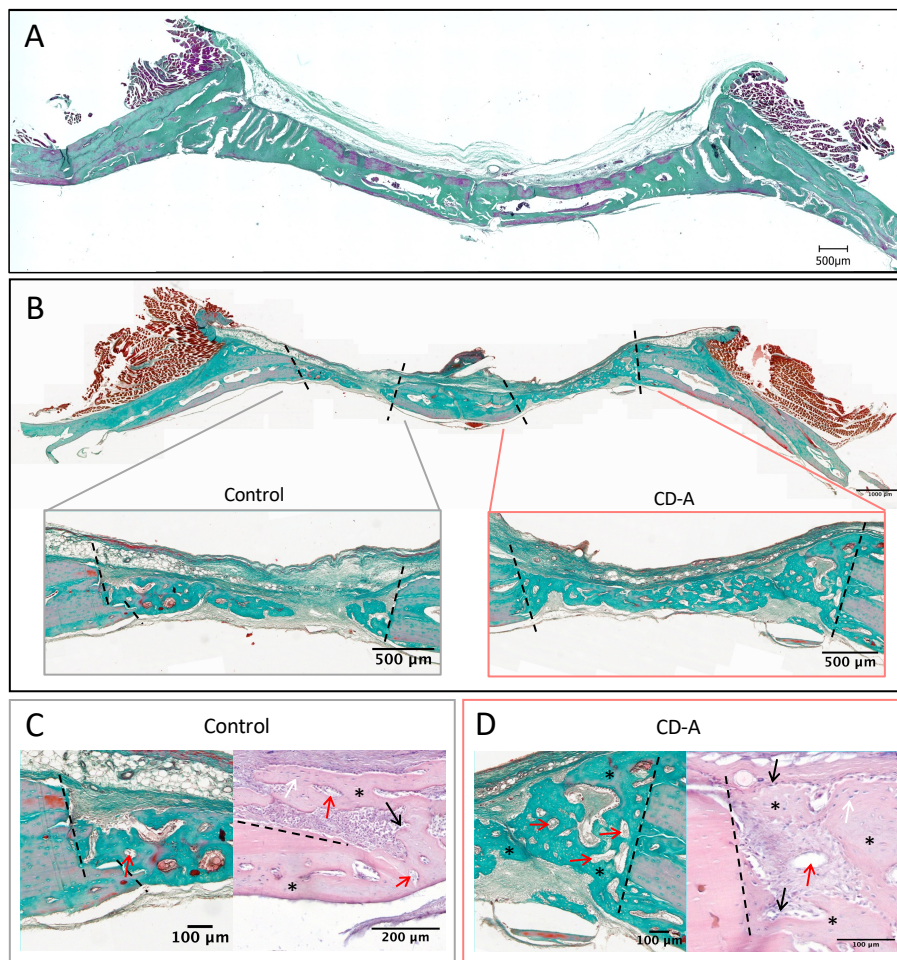


**Figure III-11.** Suivi *in vivo* par micro-CT de la cicatrisation osseuse dans les défauts de la calvaria de rats de 4 mm diamètre pendant les 2 semaines suivant l'intervention chirurgicale. Les défauts du calvarium ont été soit laissés vides, soit remplis des hydrogels contenant ou non des CD-A à 2,5 $\mu$ M, et ont été scannés immédiatement J0 puis 7 et 15 jours après la chirurgie. (A) Images 2D représentatives illustrant la formation de nouvel os dans les défauts 4 mm de diamètre (B) évolution du pourcentage de radio-opacité en fonction du temps. BV= « bone volume » correspond au tissu radio-opaque ; BV<sub>0</sub> = BV au jour 0, TV= « tissu volume » correspond au volume de la région d'intérêt. Les données numériques sont présentées sous forme de Boîte à moustaches incluant la moyenne et la répartition des échantillons par groupe d'animaux. \*\*  $p < 0,01$ .



### 3.3.2 Histologie

Après 14 jours d'implantation, une néoformation osseuse a été observée dans les défauts de 4 mm de diamètre comblés avec les deux types d'hydrogels (Figure III-12). La néoformation osseuse est présente en provenance des marges du défaut et jusqu'au centre du défaut. Dans les défauts comblés avec les hydrogels CD-A, on peut constater une jonction complète entre les deux marges du défaut même au centre (Figure III-12 C). Des lacunes ostéocytaires occupées (flèche blanche) ont été observées dans l'os néoformé (symbole \*) en présence des deux types d'hydrogels. On note aussi la présence de vaisseaux sanguins, témoins de la revascularisation des défauts. De nombreuses cellules sont observées au contact du tissu néoformé et néoformation en provenance du périoste (au-dessus du défaut). L'analyse quantitative n'a pas pu être réalisée par manque d'individus et de coupes exploitables.



**Figure III-12.** Analyses histologiques de la néoformation osseuse dans les défauts de la calvaria de rats de 4 mm de diamètre à 14 jours post-chirurgie. Coloration de calvaria (A) complète ou (B) avec des défauts comblés avec des hydrogels. Agrandissements au niveau des marges de défauts comblés avec (C) des hydrogels contrôles ou (D) hydrogels chargés en CD-A à 2,5 µM. Colorations Trichrome Masson ou Picrofuscin de Van Gieson et bleu de stevenel. Trait pointillés= marges du défaut ; \* = Néoformation osseuse ; flèche blanche = lacune ostéocyttaire ; flèche noire = ostéoblastes ; flèches rouges = vaisseaux sanguins.



## 4 Discussion et Conclusion

L'utilisation d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif au niveau cellulaire suscite un intérêt grandissant depuis plusieurs années. Notre revue de littérature suggère une utilisation prometteuse de l'astaxanthine dans le contexte diabétique qui pourrait jouer un rôle important dans la prévention, la progression du DT2 ou la protection face au développement de complications diabétiques [240]. C'est un puissant antioxydant naturel notamment connu pour sa capacité à réduire le stress oxydatif, l'inflammation et l'apoptose; ayant fait l'objets d'études pour diverses applications cliniques telles que l'ischémie, le rajeunissement de la peau ou encore le cancer [203,241,242].

L'astaxanthine étant hautement insaturée, elle a une faible solubilité dans l'eau et est facilement dégradée par la lumière, l'oxygène et la température [246]. Parmi les systèmes d'encapsulation disponibles pour stabiliser l'astaxanthine et maintenir ses propriétés en solution, l'inclusion moléculaire avec des cyclodextrine a montré des résultats prometteurs [243,247–249].

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet *in vitro* de complexes cyclodextrine – astaxanthine (CD-A) sur des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issues de rats Zucker Diabetic Fatty (ZDF), ou leurs homologues sains Zucker Lean (ZL); par rapport à l'effet de la N-acétylcystéine (NAC), antioxydant de référence.

Nous avons constaté que pour les CSMs issues d'environnement DT2 ou sain, la survie cellulaire en conditions normoglycémiques n'était pas affectée par l'exposition aux CD-A. La cytocompatibilité de l'astaxanthin (jusqu'à 10 $\mu$ M) a été déjà montré par d'autres études sur d'autres types cellulaires issues d'environnements « sains » tels que les CSMs issues du tissu adipeux [250,251], CSMs humaines [252], cellules épithéliales gastriques [253] La cytocompatibilité des CDA a été montré sur des cellules endothéliales humaines [211].

En revanche dans notre étude, des concentrations de NAC de 5mM (ou plus) ont diminué la survie des CSMs issues d'animaux ZDF. La différence observée peut être liée en partie aux modifications du pH du milieu de culture par le CD-A et la NAC. Dans la littérature, une étude a mis en évidence que la NAC à faible dose *in vivo* (275 mg NAC/kg) chez le rat Wistar et *in vitro* (jusqu'à 10mM) sur des monocytes humains a un effet protecteur, alors que des doses plus élevées peuvent avoir un effet inverse [254]. Chez la souris B6.C-Lep<sup>ob</sup> /J obèse/DT2, l'administration orale de NAC associée à de l'acide ascorbique 2 phosphate pendant 6 semaines améliore la viabilité des CSMs récoltées et cultivées *in vitro* [255]. De même, la co-exposition *in vitro* à la NAC (7,5mM) et à l'acide ascorbique 2 phosphate sur des cellules issues de

l'environnement DT2 augmente la viabilité mais ne permet pas de restaurer le potentiel de migration et prolifération [256]. La divergence observée entre les résultats de ces études et les nôtres peut être attribuée aux différences des types cellulaires, aux modèles animaux et aux doses testées.

Les cellules du tissu osseux sont sensibles au pH, nous avons montré que des concentrations croissantes en CD-A induisent une augmentation du pH du milieu de culture, favorable à la différenciation ostéoblastique [257], quant au contraire, la NAC induit une acidification qui peut altérer la fonctionnalité de CSM.

Nos résultats ont montré que la pré-exposition des CSMs au CD-A réduisait de façon dose dépendante le stress oxydatif intracellulaire induit par la présence d'AGEs, t-buOOH ou AAPH. L'effet antioxydant était contrasté chez les deux populations de CSMs, issues de rats ZDF et Lean. L'activité antioxydante des CD-A face à l'AAPH était significativement supérieure par rapport à celle de la NAC, un effet probablement lié à la différence de l'incorporation de l'antioxydant par les cellules et du mécanisme d'action des deux antioxydants. La forme moléculaire de l'astaxanthine lui permet de s'incorporer au niveau de la membrane cellulaire, l'anneau polaire aux extrémités pourrait ainsi piéger les ROS à la surface de la membrane et la chaîne polyénique inhiberait les réactions d'oxydation que pourrait subir de la membrane lipidique [258]. Au contraire la NAC, au niveau intracellulaire est un précurseur pour la synthèse de glutathion (GSH), et bien qu'elle soit un puissant capteur de ROS elle a un temps de demi-vie très court [210,259]. La diminution du potentiel antioxydant au cours du temps doit aussi être envisagée dans le cas de pré-exposition. En effet les cellules possèdent un stress oxydatif basal ainsi l'antioxydant aura un effet capteur de ROS avant même l'exposition aux « stressseurs » diminuant donc les sites disponibles pour capter les ROS qui se formeront.

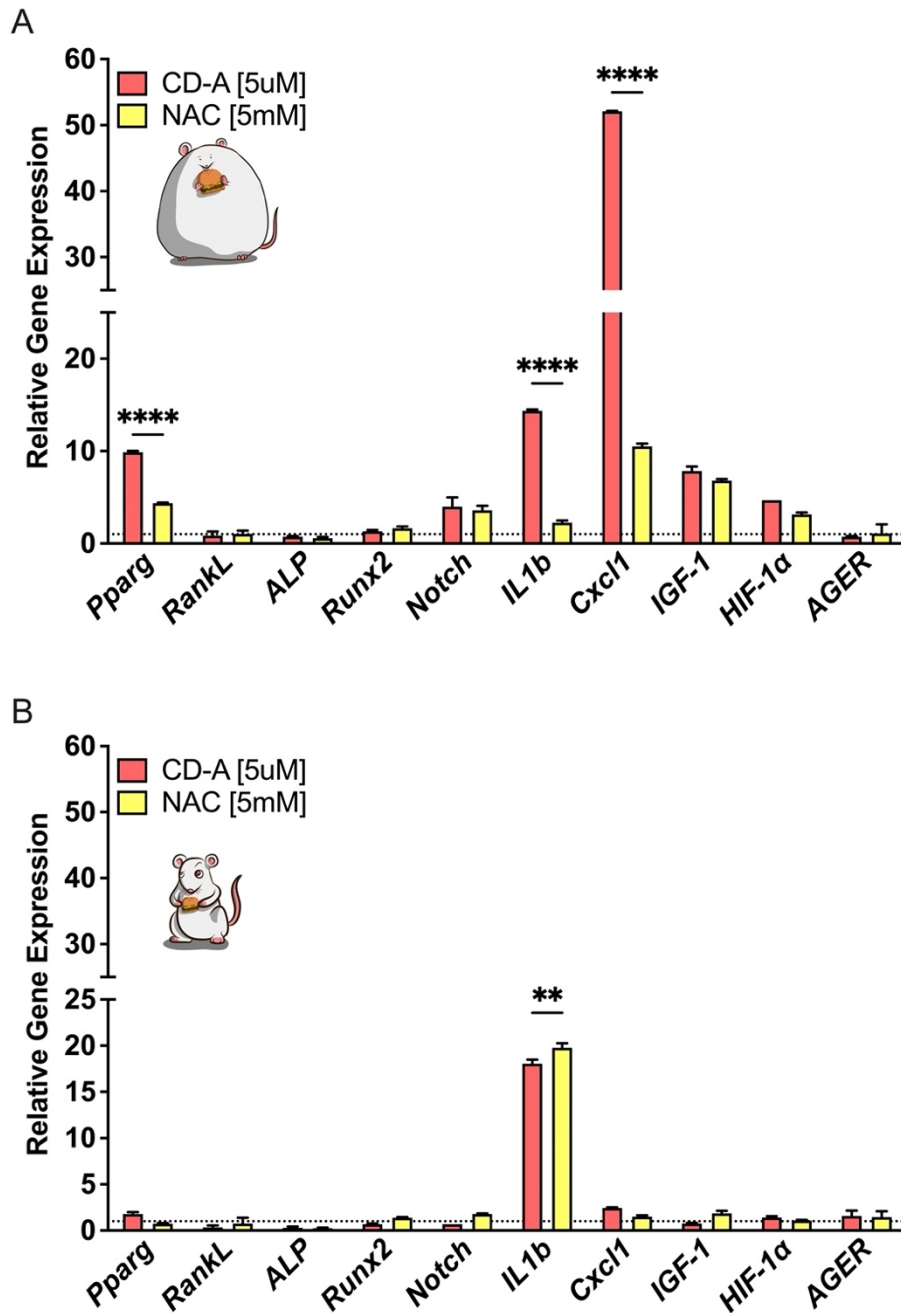
Nos résultats ont montré que la co-exposition des CSMs aux « stressseurs » et aux CD-A diminue plus fortement la formation de ROS, ce qui suggère un effet antioxydant directe et/ou une incorporation très rapide au niveau cellulaire. Le fort potentiel antioxydant de l'astaxanthine est aussi décrit sur des CSMs humaines co-exposées à l' $H_2O_2$ , il permet à la restauration de la viabilité cellulaire [251]. Ajoutée dans le milieu de culture en même temps que l'inducteur de stress oxydatif, l'astaxanthine peut en plus d'une action au niveau intracellulaire avoir un effet direct en piégeant les ROS présents dans l'environnement [260,261]. En effet, le potentiel de chaque antioxydant est dépendant du type d'administration et de l'application souhaité, par exemple la vitexin un autres antioxydant d'origine naturelle présente un meilleur potentiel en pré-exposition [262].

L'exposition des CSMs aux CD-A ou au NAC a induit une modification de l'expression de gènes relatifs à la différenciation adypogénique, au microenvironnement DT2 et à l'inflammation. Le profil de gènes était différent entre les CSM-ZDF et celles de CSM-ZL ZDF. Parmi les gènes étudiés, seule l'expression de IL1b était supérieure dans les CSM-ZL en comparaison à celle de CSM-ZDF. Il n'y a, à notre connaissance, pas d'études publiées sur l'expression génique en présence d'astaxanthine sur les CSMs. La différence d'expression génique entre les cellules issues d'animaux ZDF ou Lean, rejoignent nos précédentes observations selon lesquels les CSMs issues d'un environnement diabétique, présentent certainement des modifications épigénétiques (méthylations [263]) conduisant à un phénomène appelé "mémoire métabolique" [217]. Il a été décrit que l'astaxanthine augmente l'expression de gènes relatifs à la différenciation adipogénique (AP et PPAR- $\gamma$ ) et ostéogénique (ostéonectine, RXR et ostéopontine) chez les cellules souches neurales de souris [264] et réduit l'expression IL-6, IL-1 $\beta$  et COX-2 dans l'hippocampe de souris diabétiques de type 1 [265]. La NAC a quand elle, a des effets anti-inflammatoires sur les CSMs, notamment via la voie de signalisation TXNIP/NLRP3/IL-1 $\beta$ , et elle réduit la sécrétion de médiateurs d'inflammation induits par l'exposition à des lipopolysaccharide [266].

Dans un modèle de défaut osseux *in vivo*, nos résultats ont montré que les hydrogels chargés en astaxanthine ont une excellente biocompatibilité et une tendance à promouvoir la néoformation osseuse. Zhao et coll., ont aussi mis en évidence le potentiel de l'astaxanthine pour stimuler la différenciation ostéogénique des CSM, notamment via le métabolisme de la phénylalanine, la biosynthèse du pantothénate et du CoA [267]. L'administration d'astaxanthine orale et locale a montré un effet « protecteur » sur la moelle osseuse de souris diabétiques de type 1 [268] mais aussi sur l'os alvéolaire chez le rat diabétique de type 1 [269]. Enfin, une étude très récente de Guo et coll. a montré le potentiel d'aerogels de collagène I contenant de l'astaxanthine pour promouvoir la cicatrisation osseuse dans des défaut critiques de calvaria de rats, en réduisant le stress oxydatif via la voie NRF2 [270].

Cette étude a montré que les complexes CD-A sont biocompatibles avec les CSMs issues d'animaux DT2 ou sains et permet une régulation du stress oxydatif intracellulaire qu'elle soit utilisée en co- ou pré-exposition. Cette étude suggère également qu'une administration locale de CD-A peut stimuler la néoformation osseuse chez le rat non diabétique. Dans l'ensemble, les résultats obtenus soulignent le potentiel prometteur de l'astaxanthine pour la réparation osseuse dans le contexte du DT2.

## 5 Annexe



**Annexe III-1** Expression de certains gènes liés à la différenciation, au microenvironnement diabétique et à l'inflammation de (A) ZL-CSMs et (B) ZDF-CSMs, cultivées avec 5  $\mu$ M de CD-A (rose) ou 5mM NAC (jaune) dans des conditions normoglycémiques pendant 48h. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. (n = 3). Le changement d'expression est analysé sur la base du numéro de cycle de la PCR (Ct) par rapport à l'expression basal au même temps. L'ARNr 18S a été utilisé pour la normalisation les données en tant que contrôle endogène. La quantification relative de l'expression des gènes a été représentée selon la méthode de Pfaffl et coll. Chaque réaction a été réalisée en trois exemplaires. \*\* p < 0,01 ; \*\*\*\* p < 0,0001

## 6 Points importants

### *In vitro*

- Les complexes CD-A sont biocompatibles chez les CSMs issues d'un microenvironnement DT2 et sain
- L'augmentation de la concentration de CD-A en solution induit une augmentation du pH du milieu de culture alors que l'augmentation de la NAC induit une acidification
- La pré-exposition des CSMs aux CD-A réduit le stress oxydatif intracellulaires induit par un « stressueur » de manière dose-dépendante
- La co-exposition des CSMs aux CD-A et inducteurs de stress oxydatif augmente l'activité antioxydante cellulaire des CD-A
- La co-exposition aux antioxydants augmente significativement l'expression des gènes Pparg, Notch, IGF-1, HIF-1 $\alpha$  et Cxcl1 chez les CSMs issues d'un microenvironnement DT2 et celle de Il1b chez les CSMs d'un microenvironnement sain.

### *In vivo*

- L'ajout de CD-A dans un défaut calvarial sub-critique chez le rat sain semble améliorer la néoformation osseuse
- Le tissu osseux néoformé en présence de CD-A provient non seulement des marges du défaut mais aussi du périoste.

## **DISCUSSION GENERALE**

L'objectif général de ma thèse était de contribuer à la compréhension de l'impact du microenvironnement diabétique de type 2 (DT2) sur les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) et le potentiel thérapeutique d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif.

Pour ce faire, nous avons étudié le tissu osseux, site de prélèvement de nos CSMs, et certaines fonctionnalités des CSMs, prélevées de la moelle osseuse de rat présentant un diabète type 2 (DT2) établi.

Le choix du modèle est crucial pour l'étude des pathologies, y compris dans le contexte du DT2. Les prélèvements humains de tissus osseux et CSMs provenant de patients sont difficiles à obtenir et présentent une grande variabilité en fonction du stade de développement de la pathologie et des traitements mis en place. Les modèles animaux permettent une meilleure standardisation des prélèvements et homogénéité des résultats à partir d'un nombre restreint d'individus. Le modèle de rat Zucker Diabetic Fatty (ZDF) a été choisi pour ses similitudes avec l'humain, dans le développement progressif du DT2 et de ses complications associées. Ce modèle nous est apparu comme fiable pour l'étude de l'impact du DT2, bien que les rats ZDF développent progressivement un DT2 à cause d'une mutation sur le récepteur de la leptine. Il est évident que cette mutation pourrait impacter la fonctionnalité même des CSMs, or, il existe aussi des variations génétiques sur le gène codant pour le récepteur de la leptine chez l'humain, mises en cause pour la prédisposition à l'obésité et à la résistance à l'insuline [271–274].

Lors de la caractérisation du tissu et de la moelle osseuse, nos travaux ont montré que les populations cellulaires, notamment les adipocytes, les ostéocytes et les MSCs, étaient affectées par le DT2. Les os chez le patient DT2 présentent (i) un risque élevé de survenue d'ostéopénie et d'ostéoporose et une augmentation du risque de fracture osseuse [32–34]; (ii) des propriétés mécaniques altérées [35] ; (iii) une cicatrisation osseuse retardée et une altération du potentiel de la régénération osseuse [36,37]. Il est évident que les ostéocytes jouent un rôle essentiel dans l'organisation de la matrice, le maintien de l'homéostasie et la réparation osseuse [275,276]. L'altération du réseau canaliculaire ostéocytaire est observé par Mabileau et coll. dans un modèle de souris SWISS avec induction du DT2 via une alimentation riche en graisses [53]. Dans notre étude, nous avons montré que le réseau ostéocytaire est impacté chez les rats ZDF, avec une augmentation du nombre de lacunes et cellules ostéocytaires apoptotiques.

Nos résultats ont aussi mis en évidence une moelle osseuse plus adipocytaire ainsi qu'une augmentation de la taille des adipocytes dans le modèle ZDF (24 semaines). Pereira et coll.



avaient déjà observé une augmentation de la taille des adipocytes dans la moelle osseuse des rats ZDF de 14 semaines, cependant leur étude n'a pas mis en évidence une augmentation de leur nombre [277]. Les travaux dans les modèles animaux de DT2 sont rares et parfois contradictoires, une étude dans un modèle polygénique de souris DT2 a montré une adiposité largement supérieure chez les individus diabétiques (7 à 50 fois) [219]. Les études sur le tissu osseux et la moelle osseuse diabétique chez l'homme étant limitées, vu la difficulté d'obtenir des prélèvements, il n'existe que très peu de données de caractérisation des populations cellulaires. Nous avons constaté une diminution de 30% des CSMs prélevées dans la moelle osseuse de rats ZDF. Chez des patients atteints de DT2, Cassidy et coll. ont mis en évidence une diminution significative ( $p < 0.05$ ) du nombre de CSMs provenant de la moelle osseuse, avec une variabilité très importante que ce soit chez les patients DT2 ou contrôles sains [278]. Kim et Schafer s'étaient interrogés sur la différence d'augmentation de la l'adiposité de la moelle chez l'animal et chez l'homme [222]. Outre les différences physiologiques des petits rongeurs présentant des anomalies métaboliques exacerbées par rapport à des patient humains (en particulier ceux dont le DT2 est bien contrôlé) et les différences physiques (taille des tissus osseux). L'interférence des traitements antidiabétiques chez l'homme, mais aussi l'origine tissulaire, les méthodes d'isolement et de culture *in vitro*, peuvent conduire à des capacités fonctionnelles différentes des CSMs [279].

Lors de l'étude de certaines fonctions des CSMs de la moelle osseuse de rats ZDF (en culture normoglycémique), nos résultats ont montré que, même lors d'un diabète établi depuis peu, les CSMs présentaient une modification de leur potentiel d'adhésion, de survie, de clonogénicité, de prolifération et de différenciation. Chez des patients atteints de DT2, Ferland-Mccollough et coll. décrivent une augmentation du potentiel adipogénique des CSMs de la moelle osseuse au détriment de l'ostéogénèse [220]. De plus, une étude récente de Mirzaeicheshmeh et coll. a mis en évidence des altérations épigénétiques à différents stades de différenciation adipocytaires de MSCs issues du tissu adipeux de patients DT2 [280]. Lors de l'exposition des CSMs humaines (de patients sains) au sérum de patient DT2, Moseley et coll. rapportent une augmentation de différenciation adipogénique des CSMs, bien que leur taux de prolifération, d'apoptose ou leur activité ostéoblastique n'est pas altéré [281]. Deng et coll., au contraire montrait une augmentation de la prolifération des CSMs en présence du sérum de patients DT2 et une inhibition de la différenciation ostéoblastique [282]. Les résultats observés dans la littérature malgré leurs discrédances et nos propres résultats, nous poussent à penser qu'une exposition chronique au microenvironnement DT2 pourrait alors jouer un rôle crucial dans la modification

des fonctions des CSMs. Les modifications de fonctionnalité des CSMs de la moelle étant persistantes hors du microenvironnement DT2 de collecte, il nous apparaît que l'utilisation CSMs autologues, en l'état, semble compromise pour les thérapies de réparation osseuse.

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet du microenvironnement DT2 sur la fonctionnalité des CSMs, nous avons mis en place un modèle de culture *in vitro* qui « imite » en partie les conditions du DT2. Le microenvironnement DT2 est extrêmement complexe et implique de nombreux acteurs. Parmi ces acteurs l'hyperglycémie conduit à une accumulation de produits de glycation avancés (AGEs) dans l'organisme, qui participent à l'augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [48]. Ces derniers, lorsqu'ils sont en excès, génèrent un stress oxydatif, pouvant conduire à l'oxydation des constituants cellulaires et affecter leur fonctionnalité [122]. Nous avons étudié l'impact des AGEs et du stress oxydatif sur les CSMs de la moelle osseuse *in vitro*. Les AGEs ou leur précurseur modifient de la survie, prolifération et la différenciation des MSCs issues d'environnement sains [227,228,230,283]. Les résultats obtenus par les différentes études varient en fonction de l'origine des cellules, des AGEs utilisés et sont parfois contradictoires pour les concentrations les plus faibles. Il ne faut pas oublier que les AGEs constituent un groupe de molécules très hétérogènes qui peuvent affecter des cibles différentes [284]. Notre travail est le premier, à notre connaissance, à s'intéresser à l'effet des AGEs sur des CSMs issues d'un microenvironnement DT2. Nous avons mis en évidence que le stress oxydatif intracellulaire généré en présence d'AGEs présente un taux similaire à celui généré dans des CSMs d'un microenvironnement sain. Par ailleurs, le stress oxydatif intracellulaire généré est très rapide, reste constant pendant 60min et ne semble pas induire la production d'excès de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par les mitochondries. Cependant la présence d'AGEs conduit à une diminution plus importante de la survie, de la prolifération et de la migration des CSMs issues d'individus DT2. Dans le modèle de rat ZDF, Raza et coll. ont mis en évidence une augmentation du stress oxydatif dans plusieurs organes [285,286]. De plus, dans le modèle de souris DT2, Yan et coll. suggèrent une prédisposition à la différenciation adipogénique des CSMs, associé au stress oxydatif [287] et Ohnishi et coll. proposent le stress oxydatif comme facteur impliquée dans la perte d'os alvéolaire [288]. Ainsi, le stress oxydatif généré par les AGEs pourrait être en partie responsable du dysfonctionnement des CSMs mais aussi de la fragilité osseuse.

Nous avons donc évalué le potentiel de l'utilisation d'un antioxydant pour rétablir l'équilibre redox intracellulaire des CSMs mais aussi pour la néoformation osseuse. Nous avons étudié et comparé l'apport de deux antioxydants autorisés par le FDA : un synthétique déjà utilisé en clinique, la NAC [209,210] et un naturel, l'astaxanthine qui a déjà apporté des résultats prometteurs pour la régulation de la glycémie chez des patients DT2 [189]. L'astaxanthine a été utilisée sous forme de complexes avec des cyclodextrines, permettant une meilleure stabilité de la molécule et ayant déjà fait ses preuves dans un modèle d'ischémie reperfusion *in vivo* chez le rat non-diabétique [243].

Ainsi, la NAC en pré-exposition (à 8mM), d'après les résultats obtenus sur les CSMs humaines (provenant du tissu adipeux d'un patient sain) lors d'un blocage de la chaîne métabolique énergétique mitochondriale, permettait de restaurer la survie et protégeait l'ADN des dommages oxydatifs. De plus, le stress oxydatif intracellulaire généré dans les CSMs de rats, a pu être régulé par la pré-exposition et co-exposition à des antioxydants : NAC et astaxanthine. Pourtant, nos résultats ont montré une réponse différente aux antioxydants que ce soit pour la régulation du stress oxydatif intracellulaire, l'expression génique ou la survie des CSMs issues d'un microenvironnement DT2, L'astaxanthine complexée en CD-A (de 2,5 à 10 $\mu$ M) a montré une excellente cytocompatibilité avec ces CSMs, la N-acétylcystéine (>5mM) au contraire a diminué la viabilité des CSMs issues de rats ZDF. La « sensibilité » accrue des CSMs DT2 que ce soit dans la modification de fonctions en présence d'AGEs ou en réponse à des antioxydants rejoint nos observations précédentes sur les conséquences persistantes d'une exposition à un microenvironnement DT2.

Dans un modèle de souris DT2 polygénique, Zhu et coll. ont observé une augmentation de la survie *in vivo* de CSMs de moelle osseuse (triple transgéniques surexprimant la superoxyde dismutase (SOD)-1, de la SOD-3 et de la glutathion peroxydase-1 (Gpx-1)) transplantées associées à un co-traitement systémique avec la NAC (1mg/mL dans l'eau) [289]. Le choix du type d'administration d'un antioxydant mais aussi le choix même de la molécule antioxydante apparaît comme essentiel pour la mise en place d'un traitement et dépendant du modèle étudié. Au vu des résultats de biocompatibilité et de protection contre le stress intracellulaire, nous avons décidé d'évaluer le bénéfice d'une libération locale d'astaxanthine dans un modèle de défaut osseux développé dans notre laboratoire. Nos résultats préliminaires d'implantation d'hydrogels chargés de complexes CD-A *in vivo* dans des défauts osseux chez le rat sain

suggèrent qu'une administration locale d'astaxanthine pourrait améliorer la néoformation osseuse.

Pour conclure, ces travaux ont mis en évidence :

1. Une modification les populations cellulaires au niveau du tissu osseux et de la moelle osseux (adipocytes, MSCs, ostéocytes) en faveur de la population adipocytaire chez le rat ZDF,
2. Une modification fonctionnelle des CSMs issues d'un microenvironnement DT2, persistante dans des conditions normoglycémiques de culture *in vitro*
3. La plus grande sensibilité aux AGEs, en termes de modification de fonctionnalité, des CSMs issues d'un microenvironnement DT2, pour des taux de stress oxydatif intracellulaires équivalent à ceux dans les CSMs d'environnement sains.
4. La possible régulation du stress oxydatif intracellulaire chez les CSMs par deux antioxydants testés (N-acétylcystéine et complexes cyclodextrine-astaxanthine)
5. L'effet prometteur de l'administration locale en astaxanthine pour la réparation osseuse.

Dans l'ensemble, ces résultats contribuent à une meilleure compréhension de l'impact du microenvironnement de DT2 sur le tissu osseux et mettent en avant une limite dans l'utilisation de CSMs de la moelle osseuse autologues, chez les individus DT2 pour le cadre de thérapie cellulaire. Ils ouvrent aussi la voie au développement de nouvelles utilisations des antioxydants pour la réparation tissulaire osseuse.

**CONCLUSION GENERALE, PERSPECTIVES,  
LIMITES ET FORCES DE L'ETUDE**

Dans cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que le microenvironnement diabétique de type 2 (DT2), via l'accumulation des produits de glycation avancés modifie la fonctionnalité des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) de la moelle osseuse. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les caractéristiques cellulaires de la moelle osseuse et certaines fonctionnalités des CSMs provenant de la moelle osseuse rats DT2. Les produits de glycation avancés (AGEs) générés par l'hyperglycémie chronique sont connus pour leur effet néfaste au niveau cellulaire, mais leurs effets sur les CSMs sont controversés. Nous avons donc aussi émis l'hypothèse que les AGEs induisent un stress oxydatif exacerbé chez les CSMs et que l'utilisation d'antioxydants pourrait rétablir l'équilibre redox et fournir un environnement favorable pour la réparation osseuse dans le tissu osseux DT2.

L'objectif de cette thèse était alors d'étudier l'impact du microenvironnement DT2 sur les cellules souches mésenchymateuses et le potentiel thérapeutique d'antioxydants pour la régulation du stress oxydatif. L'étude a été conçue en trois grands axes : (Axe 1) l'étude de l'impact du DT2 sur la moelle et les CSMs de la moelle osseuse, (Axe 2) l'étude des effets des produits de glycation avancés (AGEs), composés du microenvironnement DT2, sur les CSMs et la régulation du stress oxydatif intracellulaire par un antioxydant de référence, la N-acétylcystéine (NAC), (Axe 3) l'étude du potentiel d'un antioxydant puissant, l'astaxanthine à rétablir l'équilibre redox des CSMs d'origine diabétique ou saine et à améliorer la réparation osseuse chez le rat.

Le premier axe de notre étude a porté sur les caractéristiques cellulaires de la moelle osseuse et certaines fonctionnalités CSMs prélevées de rats diabétiques ZDF. Cette étude a permis de mettre en évidence des modifications des populations cellulaires de la moelle osseuse et du tissu environnant, avec une augmentation de l'adiposité de la moelle osseuse, une diminution des CSMs prélevées et une altération du réseau ostéocytaire. L'étude de certaines fonctions des CSMs issues de rats ZDF, a montré que, même lors d'un diabète établi depuis peu, les CSMs présentaient une modification de plusieurs fonctions pertinentes dans la réparation osseuse (adhésion, survie, clonogénicité, prolifération, migration). De plus, le microenvironnement DT2 prédispose les CSMs pour une différenciation adipogénique et diminue leur potentiel pro-angiogénique. Ces modifications, persistantes hors du microenvironnement DT2, ont permis de mettre en lumière des limitations du potentiel thérapeutique des CSMs autologues, en l'état, pour les thérapies de réparation osseuse.

Les travaux du second axe de notre étude ont porté sur les effets des AGEs et la régulation du stress oxydatif par la N-acétylcystéine chez les CSMs. Les résultats obtenus ont montré que les AGEs contribuent à la défaillance de fonctions pertinentes pour la réparation osseuse chez les CSMs. De plus, les CSMs issues d'un microenvironnement DT2 étaient plus « sensibles » en culture *ex vivo* aux modifications du milieu. Ainsi, les effets sur la survie, prolifération et migration, observés en présence d'AGEs se sont vus amplifiés. Néanmoins, le stress oxydatif intracellulaire généré par les AGEs chez les CSMs était similaire dans les deux populations : CSMs issues du milieu DT2 ou non-diabétique. Le stress oxydatif intracellulaire chez les CSMs était régulé par une exposition à la NAC, mais celle-ci a eu un effet cytotoxique sur les CSMs issues de rats ZDF. Des études supplémentaires sont nécessaires pour voir si la réduction du stress oxydatif, par les antioxydants, permet de restaurer les fonctions (survie, prolifération, migration) des CSMs issues d'un microenvironnement DT2 et/ou exposées aux AGEs.

Le troisième axe de notre étude a porté sur les effets d'un autre antioxydant, l'astaxanthine, sur les CSMs issues d'animaux DT2 ou sains. Les résultats ont montré que les complexes CD-A sont biocompatibles avec les deux types de cellules. L'astaxanthine incorporée dans ces complexes, qu'elle soit utilisée en co- ou pré-exposition, régulait le stress oxydatif intracellulaire induit par les AGEs, le t-buOOH et/ou l'AAPH. L'activité antioxydante des CD-A était plus importante lorsque les cellules étaient co-exposées aux AGEs. En présence des complexes CD-A, nous avons aussi constaté une modification de l'expression de gènes relatifs à la différenciation adipogénique, au microenvironnement DT2 et à l'inflammation chez les CSMs issues d'animaux DT2. De plus, les résultats d'une étude *in vivo*, préliminaire, a montré que l'utilisation locale de CD-A favorise la néoformation osseuse au niveau de défauts osseux chez le rat non diabétique. Dans l'ensemble, les résultats obtenus soulignent le potentiel prometteur de l'astaxanthine pour la fonctionnalité de CSMs et la réparation osseuse dans le contexte du DT2. Nos résultats soulignent aussi l'importance de considérer le type de cellules étudiées et leur origine pour le choix d'un antioxydant et son type d'administration.

Dans l'ensemble, cette thèse contribue à une meilleure compréhension de l'impact du microenvironnement de DT2 sur le tissu osseux et met en avant l'impact négatif du diabète de long-durée, des AGEs générés par l'hyperglycémie et de l'excès de stress oxydatif dans la fonctionnalité de CSMs. Les résultats obtenus mettent en question l'utilisation de CSMs de la moelle osseuse autologues, chez les individus DT2 dans le cadre de thérapie cellulaire et



soulignent l'intérêt, pour la régulation du stress oxydatif, d'utilisation des antioxydants dans le cadre de la réparation tissulaire osseuse.

La partie *in vitro* de notre étude contribue significativement à la caractérisation des CSMs issues et/ou exposées à un microenvironnement DT2. Néanmoins, l'utilisation de CSMs issues d'animaux ZDF est à la fois une force et une limite de cette étude. Les CSMs provenant de rats ZDF et Lean, du même âge et du même sexe, permettent de réduire la variabilité et d'augmenter la fiabilité des résultats obtenus. De plus, il n'y a pas d'interférence du contrôle glycémique, de la durée et du traitement du diabète, paramètres à prendre en considération quand on utilise des cellules humaines.

L'étude s'est concentrée sur l'utilisation d'AGEs-BSA commerciale (préparé en faisant réagir l'albumine sérique bovine avec le glycoaldéhyde). Ils sont couramment utilisés en recherche et nous permettent une meilleure standardisation de nos résultats. Les produits de glycations avancés (AGEs) constituent pourtant un groupe de molécules très hétérogènes qui peuvent donc présenter des effets différents, il serait intéressant dans des recherches futures de comparer l'effet de différents AGEs sur les CSMs d'origines DT2. Des études complémentaires permettraient une meilleure compréhension des mécanismes d'action des AGEs sur la fonctionnalité des CSMs. Il serait ainsi pertinent de s'intéresser aux voies de signalisations impliquées dans la régulation du stress oxydatif (Nrf2, SOD, GSH...) et/ou à l'apoptose (Bax, caspases ...). Investiguer la fonctionnalité des CSMs lors d'expositions impliquant à la fois des antioxydants et des AGEs permettrait une compréhension plus complète des mécanismes d'action des AGEs et des antioxydants.

Enfin, l'étude *in vivo* présente des résultats préliminaires encourageant pour l'utilisation de complexes CD-A pour la réparation osseuse. Ces résultats ont été obtenus sur un nombre très restreint d'animaux, et nos études sur les CSMs montraient des potentiels antioxydants dépendants de l'administration et de l'origine des cellules. Des études pourraient s'intéresser à différentes concentrations et formes d'administration de l'astaxanthine (libre, complexées, en hydrogel, en coating sur un matériau...) pour la fonctionnalité des CSMs et la néoformation osseuse. Notre étude s'est faite dans un défaut sub-critique chez le rat sain afin de limiter le nombre d'animaux et permettre un contrôle intra individus. Il serait intéressant d'étudier le potentiel de l'astaxanthine pour la néoformation osseuse dans des défauts critiques chez le rat ZDF.

## REFERENCES

1. International Diabetes Federation *L'ATLAS DU DIABÈTE DE LA FID 10ème Édition 2019*;
2. Peters, M.L.; Huisman, E.L.; Schoonen, M.; Wolffenbuttel, B.H.R. The Current Total Economic Burden of Diabetes Mellitus in the Netherlands. *Neth J Med* **2017**, *75*, 281–297.
3. Guthrie, R.A.; Guthrie, D.W. Pathophysiology of Diabetes Mellitus: *Critical Care Nursing Quarterly* **2004**, *27*, 113–125, doi:10.1097/00002727-200404000-00003.
4. Atkinson, M.A.; Eisenbarth, G.S.; Michels, A.W. Type 1 Diabetes. *The Lancet* **2014**, *383*, 69–82, doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7.
5. Craig, M.E.; Jefferies, C.; Dabelea, D.; Balde, N.; Seth, A.; Donaghue, K.C. Definition, Epidemiology, and Classification of Diabetes in Children and Adolescents. *Pediatr Diabetes* **2014**, *15*, 4–17, doi:10.1111/pedi.12186.
6. Akil, A.A.-S.; Yassin, E.; Al-Maraghi, A.; Aliyev, E.; Al-Malki, K.; Fakhro, K.A. Diagnosis and Treatment of Type 1 Diabetes at the Dawn of the Personalized Medicine Era. *J Transl Med* **2021**, *19*, 137, doi:10.1186/s12967-021-02778-6.
7. Geneva: World Health Organization World Health Organization IDF. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycaemia : Report of a WHO/IDF Consultation Available online: <http://www.who.int/iris/handle/10665/43588>.
8. Freeman, A.M.; Acevedo, L.A.; Pennings, N. Insulin Resistance. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
9. Galicia-Garcia, U.; Benito-Vicente, A.; Jebari, S.; Larrea-Sebal, A.; Siddiqi, H.; Uribe, K.B.; Ostolaza, H.; Martín, C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *IJMS* **2020**, *21*, 6275, doi:10.3390/ijms21176275.
10. Newsholme, P.; Cruzat, V.F.; Keane, K.N.; Carlessi, R.; de Bittencourt, P.I.H. Molecular Mechanisms of ROS Production and Oxidative Stress in Diabetes. *Biochemical Journal* **2016**, *473*, 4527–4550, doi:10.1042/BCJ20160503C.
11. Riddle, M.C. Glycemic Control and Cardiovascular Mortality. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* **2011**, *18*, 104–109, doi:10.1097/MED.0b013e3283446b7e.
12. Polovina, M.M.; Potpara, T.S. Endothelial Dysfunction in Metabolic and Vascular Disorders. *Postgraduate Medicine* **2014**, *126*, 38–53, doi:10.3810/pgm.2014.03.2739.
13. Viigimaa, M.; Sachinidis, A.; Toumpourleka, M.; Koutsampasopoulos, K.; Alliksoo, S.; Titma, T. Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *CVP* **2020**, *18*, 110–116, doi:10.2174/1570161117666190405165151.
14. Du, X.; Edelstein, D.; Obici, S.; Higham, N.; Zou, M.-H.; Brownlee, M. Insulin Resistance Reduces Arterial Prostacyclin Synthase and eNOS Activities by Increasing Endothelial Fatty Acid Oxidation. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1071–1080, doi:10.1172/JCI23354.
15. Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes* **2005**, *54*, 1615–1625, doi:10.2337/diabetes.54.6.1615.
16. Faselis, C.; Katsimardou, A.; Imprialos, K.; Deligkaris, P.; Kallistratos, M.; Dimitriadis, K. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *CVP* **2020**, *18*, 117–124, doi:10.2174/1570161117666190502103733.
17. Ahsaini, M.; Omana, J.P.; Mellas, S.; El Ammari, J.; Tazi, M.F.; El Fassi, M.J.; Farih, M.H. Dysfonction Érectile Chez Les Patients Diabétiques Type 2, Prévalence et Gravité Au Service D'urologie Du Centre Hospitalier Universitaire de FES (Maroc): À Propos de 96 Cas (Étude Transversale). *Pan Afr Med J* **2020**, *37*, doi:10.11604/pamj.2020.37.205.21774.
18. Defeudis, G.; Mazzilli, R.; Tenuta, M.; Rossini, G.; Zamponi, V.; Olana, S.; Faggiano, A.; Pozzilli, P.; Isidori, A.M.; Gianfrilli, D. Erectile Dysfunction and Diabetes: A Melting Pot of Circumstances and Treatments. *Diabetes Metabolism Res* **2022**, *38*, e3494, doi:10.1002/dmrr.3494.

19. Tuttle, K.R.; Bakris, G.L.; Bilous, R.W.; Chiang, J.L.; De Boer, I.H.; Goldstein-Fuchs, J.; Hirsch, I.B.; Kalantar-Zadeh, K.; Narva, A.S.; Navaneethan, S.D.; et al. Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 2864–2883, doi:10.2337/dc14-1296.
20. Mogensen, C.E.; Christensen, C.K.; Vittinghus, E. The Stages in Diabetic Renal Disease: With Emphasis on the Stage of Incipient Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **1983**, *32*, 64–78, doi:10.2337/diab.32.2.S64.
21. Thomas, M.C.; Brownlee, M.; Susztak, K.; Sharma, K.; Jandeleit-Dahm, K.A.M.; Zoungas, S.; Rossing, P.; Groop, P.-H.; Cooper, M.E. Diabetic Kidney Disease. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*, 15018, doi:10.1038/nrdp.2015.18.
22. Parmar, U.M.; Jalgaonkar, M.P.; Kulkarni, Y.A.; Oza, M.J. Autophagy-Nutrient Sensing Pathways in Diabetic Complications. *Pharmacological Research* **2022**, *184*, 106408, doi:10.1016/j.phrs.2022.106408.
23. Zhao, X.; Chen, Y.; Tan, X.; Zhang, L.; Zhang, H.; Li, Z.; Liu, S.; Li, R.; Lin, T.; Liao, R.; et al. Advanced Glycation End-Products Suppress Autophagic Flux in Podocytes by Activating Mammalian Target of Rapamycin and Inhibiting Nuclear Translocation of Transcription Factor EB: AGE-Impaired Autophagic Flux in Podocytes through mTOR and TFEB. *J. Pathol* **2018**, *245*, 235–248, doi:10.1002/path.5077.
24. Meyer, T.W.; Bennett, P.H.; Nelson, R.G. Podocyte Number Predicts Long-Term Urinary Albumin Excretion in Pima Indians with Type II Diabetes and Microalbuminuria. *Diabetologia* **1999**, *42*, 1341–1344, doi:10.1007/s001250051447.
25. Barutta, F.; Bellini, S.; Gruden, G. Mechanisms of Podocyte Injury and Implications for Diabetic Nephropathy. *Clinical Science* **2022**, *136*, 493–520, doi:10.1042/CS20210625.
26. Cheung, N.; Mitchell, P.; Wong, T.Y. Diabetic Retinopathy. *The Lancet* **2010**, *376*, 124–136, doi:10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
27. Fong, D.S.; Aiello, L.P.; Ferris, F.L.; Klein, R. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 2540–2553, doi:10.2337/diacare.27.10.2540.
28. National Eye Institute Diabetic Retinopathy 2022.
29. Zilliox, L.; Russell, J.W. Treatment of Diabetic Sensory Polyneuropathy. *Curr Treat Options Neurol* **2011**, *13*, 143–159, doi:10.1007/s11940-011-0113-1.
30. Dewanjee, S.; Das, S.; Das, A.K.; Bhattacharjee, N.; Dihingia, A.; Dua, T.K.; Kalita, J.; Manna, P. Molecular Mechanism of Diabetic Neuropathy and Its Pharmacotherapeutic Targets. *European Journal of Pharmacology* **2018**, *833*, 472–523, doi:10.1016/j.ejphar.2018.06.034.
31. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R.D.S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 1–17, doi:10.1155/2015/421746.
32. Schwartz, A.V. Epidemiology of Fractures in Type 2 Diabetes. *Bone* **2016**, *82*, 2–8, doi:10.1016/j.bone.2015.05.032.
33. Sellmeyer, D.E.; Civitelli, R.; Hofbauer, L.C.; Khosla, S.; Lecka-Czernik, B.; Schwartz, A.V. Skeletal Metabolism, Fracture Risk, and Fracture Outcomes in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes* **2016**, *65*, 1757–1766, doi:10.2337/db16-0063.
34. Eller-Vainicher, C.; Cairoli, E.; Grassi, G.; Grassi, F.; Catalano, A.; Merlotti, D.; Falchetti, A.; Gaudio, A.; Chiodini, I.; Gennari, L. Pathophysiology and Management of Type 2 Diabetes Mellitus Bone Fragility. *Journal of Diabetes Research* **2020**, *2020*, 1–18, doi:10.1155/2020/7608964.
35. Karim, L.; Bouxsein, M.L. Effect of Type 2 Diabetes-Related Non-Enzymatic Glycation on Bone Biomechanical Properties. *Bone* **2016**, *82*, 21–27, doi:10.1016/j.bone.2015.07.028.
36. Marin, C.; Luyten, F.P.; Van der Schueren, B.; Kerckhofs, G.; Vandamme, K. The

- Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing. *Frontiers in Endocrinology* **2018**, *9*, doi:10.3389/fendo.2018.00006.
37. Khazai, N.B.; Beck, G.R.; Umpierrez, G.E. Diabetes and Fractures: An Overshadowed Association. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* **2009**, *16*, 435–445, doi:10.1097/MED.0b013e328331c7eb.
38. Ma, L.; Oei, L.; Jiang, L.; Estrada, K.; Chen, H.; Wang, Z.; Yu, Q.; Zillikens, M.C.; Gao, X.; Rivadeneira, F. Association between Bone Mineral Density and Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Eur J Epidemiol* **2012**, *27*, 319–332, doi:10.1007/s10654-012-9674-x.
39. de Araújo, I.M.; Moreira, M.L.M.; de Paula, F.J.A. Diabetes and Bone. *Arch Endocrinol Metab* **2022**, *66*, 633–641, doi:10.20945/2359-3997000000552.
40. De Liefde, I.I.; Van Der Klift, M.; De Laet, C.E.D.H.; Van Daele, P.L.A.; Hofman, A.; Pols, H.A.P. Bone Mineral Density and Fracture Risk in Type-2 Diabetes Mellitus: The Rotterdam Study. *Osteoporos Int* **2005**, *16*, 1713–1720, doi:10.1007/s00198-005-1909-1.
41. Compston, J. Type 2 Diabetes Mellitus and Bone. *J Intern Med* **2018**, *283*, 140–153, doi:10.1111/joim.12725.
42. Picke, A.-K.; Campbell, G.; Napoli, N.; Hofbauer, L.C.; Rauner, M. Update on the Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Bone Metabolism and Material Properties. *Endocrine Connections* **2019**, *8*, R55–R70, doi:10.1530/EC-18-0456.
43. Ho-Pham, L.T.; Chau, P.M.N.; Do, A.T.; Nguyen, H.C.; Nguyen, T.V. Type 2 Diabetes Is Associated with Higher Trabecular Bone Density but Lower Cortical Bone Density: The Vietnam Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* **2018**, *29*, 2059–2067, doi:10.1007/s00198-018-4579-5.
44. Hunt, H.B.; Torres, A.M.; Palomino, P.M.; Marty, E.; Saiyed, R.; Cohn, M.; Jo, J.; Warner, S.; Sroga, G.E.; King, K.B.; et al. Altered Tissue Composition, Microarchitecture, and Mechanical Performance in Cancellous Bone From Men With Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Bone and Mineral Research* **2019**, *34*, 1191–1206, doi:10.1002/jbmr.3711.
45. Yamamoto, M.; Sugimoto, T. Advanced Glycation End Products, Diabetes, and Bone Strength. *Curr Osteoporos Rep* **2016**, *14*, 320–326, doi:10.1007/s11914-016-0332-1.
46. Karim, L.; Moulton, J.; Van Vliet, M.; Velie, K.; Robbins, A.; Malekipour, F.; Abdeen, A.; Ayres, D.; Bouxsein, M.L. Bone Microarchitecture, Biomechanical Properties, and Advanced Glycation End-Products in the Proximal Femur of Adults with Type 2 Diabetes. *Bone* **2018**, *114*, 32–39, doi:10.1016/j.bone.2018.05.030.
47. Donat, A.; Knapstein, P.-R.; Jiang, S.; Baranowsky, A.; Ballhause, T.-M.; Frosch, K.-H.; Keller, J. Glucose Metabolism in Osteoblasts in Healthy and Pathophysiological Conditions. *IJMS* **2021**, *22*, 4120, doi:10.3390/ijms22084120.
48. McCabe, L.R. Understanding the Pathology and Mechanisms of Type I Diabetic Bone Loss. *Journal of Cellular Biochemistry* **2007**, *102*, 1343–1357, doi:10.1002/jcb.21573.
49. Alikhani, M.; Alikhani, Z.; Boyd, C.; MacLellan, C.M.; Raptis, M.; Liu, R.; Pischon, N.; Trackman, P.C.; Gerstenfeld, L.; Graves, D.T. Advanced Glycation End Products Stimulate Osteoblast Apoptosis via the MAP Kinase and Cytosolic Apoptotic Pathways. *Bone* **2007**, *40*, 345–353, doi:10.1016/j.bone.2006.09.011.
50. Kume, S.; Kato, S.; Yamagishi, S.; Inagaki, Y.; Ueda, S.; Arima, N.; Okawa, T.; Kojiro, M.; Nagata, K. Advanced Glycation End-Products Attenuate Human Mesenchymal Stem Cells and Prevent Cognate Differentiation Into Adipose Tissue, Cartilage, and Bone. *J Bone Miner Res* **2005**, *20*, 1647–1658, doi:10.1359/JBMR.050514.
51. Miranda, C.; Giner, M.; Montoya, M.J.; Vázquez, M.A.; Miranda, M.J.; Pérez-Cano, R. Influence of High Glucose and Advanced Glycation End-Products (Ages) Levels in Human Osteoblast-like Cells Gene Expression. *BMC Musculoskelet Disord* **2016**, *17*, 377, doi:10.1186/s12891-016-1228-z.

52. Napoli, N.; Strollo, R.; Paladini, A.; Briganti, S.I.; Pozzilli, P.; Epstein, S. The Alliance of Mesenchymal Stem Cells, Bone, and Diabetes. *International Journal of Endocrinology* **2014**, *2014*, 1–26, doi:10.1155/2014/690783.
53. Mabileau, G.; Perrot, R.; Flatt, P.R.; Irwin, N.; Chappard, D. High Fat-Fed Diabetic Mice Present with Profound Alterations of the Osteocyte Network. *Bone* **2016**, *90*, 99–106, doi:10.1016/j.bone.2016.06.008.
54. Sassi, F.; Buondonno, I.; Luppi, C.; Spertino, E.; Stratta, E.; Di Stefano, M.; Ravazzoli, M.; Isaia, G.; Trento, M.; Passera, P.; et al. Type 2 Diabetes Affects Bone Cells Precursors and Bone Turnover. *BMC Endocr Disord* **2018**, *18*, 55, doi:10.1186/s12902-018-0283-x.
55. Caliaperoumal, G.; Souyet, M.; Bensidhoum, M.; Petite, H.; Anagnostou, F. Type 2 Diabetes Impairs Angiogenesis and Osteogenesis in Calvarial Defects: MicroCT Study in ZDF Rats. *Bone* **2018**, *112*, 161–172, doi:10.1016/j.bone.2018.04.009.
56. Stabley, J.N.; Prisby, R.D.; Behnke, B.J.; Delp, M.D. Type 2 Diabetes Alters Bone and Marrow Blood Flow and Vascular Control Mechanisms in the ZDF Rat. *Journal of Endocrinology* **2015**, *225*, 47–58, doi:10.1530/JOE-14-0514.
57. Hardin-Pouzet, H.; Morosan, S. Organismes-Modèles et Réglementation de La Recherche Animale. *Med Sci (Paris)* **2019**, *35*, 153–156, doi:10.1051/medsci/2019006.
58. Katsuda, Y.; Ohta, T.; Shinohara, M.; Bin, T.; Yamada, T. Diabetic Mouse Models. *OJAS* **2013**, *03*, 334–342, doi:10.4236/ojas.2013.34050.
59. Kawano, K.; Hirashima, T.; Mori, S.; Natori, T. OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) Rat: A New NIDDM Rat Strain. *Diabetes Research and Clinical Practice* **1994**, *24*, S317–S320, doi:10.1016/0168-8227(94)90269-0.
60. Ikeda, H.; Shino, A.; Matsuo, T.; Iwatsuka, H.; Suzuoki, Z. A New Genetically Obese-Hyperglycemic Rat (Wistar Fatty). *Diabetes* **1981**, *30*, 1045–1050, doi:10.2337/diab.30.12.1045.
61. Clark, J.B.; Palmer, C.J.; Shaw, W.N. The Diabetic Zucker Fatty Rat. *Experimental Biology and Medicine* **1983**, *173*, 68–75, doi:10.3181/00379727-173-41611.
62. Masuyama, T.; Katsuda, Y.; Shinohara, M. A Novel Model of Obesity-Related Diabetes: Introgression of the Leprfa Allele of the Zucker Fatty Rat into Nonobese Spontaneously Diabetic Torii (SDT) Rats. *Exp. Anim.* **2005**, *54*, 13–20, doi:10.1538/expanim.54.13.
63. Katsuda, Y.; Ohta, T.; Miyajima, K.; Kemmochi, Y.; Sasase, T.; Tong, B.; Shinohara, M.; Yamada, T. Diabetic Complications in Obese Type 2 Diabetic Rat Models. *Exp. Anim.* **2014**, *63*, 121–132, doi:10.1538/expanim.63.121.
64. Etgen, G.J.; Oldham, B.A. Profiling of Zucker Diabetic Fatty Rats in Their Progression to the Overt Diabetic State. *Metabolism* **2000**, *49*, 684–688, doi:10.1016/S0026-0495(00)80049-9.
65. Zeitoun, D.; Caliaperoumal, G.; Bensidhoum, M.; Constans, J.M.; Anagnostou, F.; Bousson, V. Microcomputed Tomography of the Femur of Diabetic Rats: Alterations of Trabecular and Cortical Bone Microarchitecture and Vasculature—a Feasibility Study. *European Radiology Experimental* **2019**, *3*, doi:10.1186/s41747-019-0094-5.
66. Ribot, J.; Caliaperoumal, G.; Paquet, J.; Boisson-vidal, C.; Petite, H.; Anagnostou, F. Type 2 Diabetes Alters Mesenchymal Stem Cell Secretome Composition and Angiogenic Properties. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2017**, *21*, 349–363, doi:10.1111/jcmm.12969.
67. Monahan, G.E.; Schiavi-Tritz, J.; Britton, M.; Vaughan, T.J. Longitudinal Alterations in Bone Morphometry, Mechanical Integrity and Composition in Type-2 Diabetes in a Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat. *Bone* **2023**, *170*, 116672, doi:10.1016/j.bone.2023.116672.
68. Morton, G.J.; Schwartz, M.W. Leptin and the Central Nervous System Control of



- Glucose Metabolism. *Physiological Reviews* **2011**, *91*, 389–411, doi:10.1152/physrev.00007.2010.
69. Wang, B.; Chandrasekera, P.; Pippin, J. Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *CDR* **2014**, *10*, 131–145, doi:10.2174/1573399810666140508121012.
70. Moran, O.; Phillip, M. Leptin: Obesity, Diabetes and Other Peripheral Effects - a Review: Leptin: More than a 'Fat' Hormone. *Pediatric Diabetes* **2003**, *4*, 101–109, doi:10.1034/j.1399-5448.2003.00017.x.
71. Muoio, D.M.; Lynis Dohm, G. Peripheral Metabolic Actions of Leptin. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **2002**, *16*, 653–666, doi:10.1053/beem.2002.0223.
72. Ceddia, R.B. Direct Metabolic Regulation in Skeletal Muscle and Fat Tissue by Leptin: Implications for Glucose and Fatty Acids Homeostasis. *Int J Obes* **2005**, *29*, 1175–1183, doi:10.1038/sj.ijo.0803025.
73. Friedman, J.M.; Leibel, R.L.; Siegel, D.S.; Walsh, J.; Bahary, N. Molecular Mapping of the Mouse Ob Mutation. *Genomics* **1991**, *11*, 1054–1062, doi:10.1016/0888-7543(91)90032-A.
74. Lee, G.-H.; Proenca, R.; Montez, J.M.; Carroll, K.M.; Darvishzadeh, J.G.; Lee, J.I.; Friedman, J.M. Abnormal Splicing of the Leptin Receptor in Diabetic Mice. *Nature* **1996**, *379*, 632–635, doi:10.1038/379632a0.
75. Takaya, K.; Ogawa, Y.; Isse, N.; Okazaki, T.; Satoh, N.; Masuzaki, H.; Mori, K.; Tamura, N.; Hosoda, K.; Nakao, K. Molecular Cloning of Rat Leptin Receptor Isoform Complementary DNAs—Identification of a Missense Mutation in Zucker Fatty (Fa/Fa) Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *225*, 75–83, doi:10.1006/bbrc.1996.1133.
76. Montague, C.T.; Farooqi, I.S.; Whitehead, J.P.; Soos, M.A.; Rau, H.; Wareham, N.J.; Sewter, C.P.; Digby, J.E.; Mohammed, S.N.; Hurst, J.A.; et al. Congenital Leptin Deficiency Is Associated with Severe Early-Onset Obesity in Humans. *Nature* **1997**, *387*, 903–908, doi:10.1038/43185.
77. Clément, K.; Vaisse, C.; Lahlou, N.; Cabrol, S.; Pelloux, V.; Cassuto, D.; Gormelen, M.; Dina, C.; Chambaz, J.; Lacorte, J.-M.; et al. A Mutation in the Human Leptin Receptor Gene Causes Obesity and Pituitary Dysfunction. *Nature* **1998**, *392*, 398–401, doi:10.1038/32911.
78. Fischer, S.; Hanefeld, M.; Haffner, S.M.; Fusch, C.; Schwanebeck, U.; Köhler, C.; Fückler, K.; Julius, U. Insulin-Resistant Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Have Higher Serum Leptin Levels Independently of Body Fat Mass. *Acta Diabetol* **2002**, *39*, 105–110, doi:10.1007/s005920200027.
79. Pelleymounter, M.A.; Cullen, M.J.; Baker, M.B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F. Effects of the *Obese* Gene Product on Body Weight Regulation in *Ob / Ob* Mice. *Science* **1995**, *269*, 540–543, doi:10.1126/science.7624776.
80. Duquenne, M.; Folgueira, C.; Bourouh, C.; Millet, M.; Silva, A.; Clasadonte, J.; Imbernon, M.; Fernandois, D.; Martinez-Corral, I.; Kusumakshi, S.; et al. Leptin Brain Entry via a Tanycytic LepR–EGFR Shuttle Controls Lipid Metabolism and Pancreas Function. *Nat Metab* **2021**, *3*, 1071–1090, doi:10.1038/s42255-021-00432-5.
81. Forbes, J.M.; Cooper, M.E.; Oldfield, M.D.; Thomas, M.C. Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **2003**, *14*, S254–S258, doi:10.1097/01.ASN.0000077413.41276.17.
82. Twarda-Clapa, A.; Olczak, A.; Białkowska, A.M.; Koziolkiewicz, M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells* **2022**, *11*, 1312, doi:10.3390/cells11081312.



83. Vistoli, G.; De Maddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G. Advanced Glycoxidation and Lipoxidation End Products (AGEs and ALEs): An Overview of Their Mechanisms of Formation. *Free Radical Research* **2013**, *47*, 3–27, doi:10.3109/10715762.2013.815348.
84. Maillard, L. Action of Amino Acids on Sugars. Formation of Melanoidins in a Methodical Way. *Compte-Rendu de l'Academie des Science* **1912**, *154*, 66–68.
85. Blackman, S.M.; Cooke, D.W. Diabetes. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Elsevier, 2013; pp. 649–658 ISBN 978-0-12-378631-9.
86. Gillery, P.; Monboisse, J.C.; Maquart, F.X.; Borel, J.P. Glycation of Proteins as a Source of Superoxide. *Diabete Metab* **1988**, *14*, 25–30.
87. Nowotny, K.; Jung, T.; Höhn, A.; Weber, D.; Grune, T. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules* **2015**, *5*, 194–222, doi:10.3390/biom5010194.
88. Heyns, K.; Beilfuss, W. [Ketosylamine rearrangement of D-threo-pentulose (D-xylulose) with alpha-amino acids]. *Chem Ber* **1970**, *103*, 2873–2876, doi:10.1002/cber.19701030925.
89. Qiu, H.-Y.; Hou, N.-N.; Shi, J.-F.; Liu, Y.-P.; Kan, C.-X.; Han, F.; Sun, X.-D. Comprehensive Overview of Human Serum Albumin Glycation in Diabetes Mellitus. *World J Diabetes* **2021**, *12*, 1057–1069, doi:10.4239/wjcd.v12.i7.1057.
90. Scheijen, J.L.J.M.; Schalkwijk, C.G. Quantification of Glyoxal, Methylglyoxal and 3-Deoxyglucosone in Blood and Plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Evaluation of Blood Specimen. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **2014**, *52*, doi:10.1515/cclm-2012-0878.
91. Heidari, F.; Rabizadeh, S.; Rajab, A.; Heidari, F.; Mouodi, M.; Mirmiranpour, H.; Esteghamati, A.; Nakhjavani, M. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products Levels Are Correlates of Duration of Type 2 Diabetes. *Life Sciences* **2020**, *260*, 118422, doi:10.1016/j.lfs.2020.118422.
92. Goldberg, T.; Cai, W.; Peppas, M.; Dardaine, V.; Baliga, B.S.; Uribarri, J.; Vlassara, H. Advanced Glycoxidation End Products in Commonly Consumed Foods. *Journal of the American Dietetic Association* **2004**, *104*, 1287–1291, doi:10.1016/j.jada.2004.05.214.
93. Takeuchi, M. Toxic AGEs (TAGE) Theory: A New Concept for Preventing the Development of Diseases Related to Lifestyle. *Diabetol Metab Syndr* **2020**, *12*, 105, doi:10.1186/s13098-020-00614-3.
94. Ahmed, M.U.; Dunn, J.A.; Walla, M.D.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W. Oxidative Degradation of Glucose Adducts to Protein. Formation of 3-(N Epsilon-Lysino)-Lactic Acid from Model Compounds and Glycated Proteins. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 8816–8821.
95. Willett, T.L.; Voziyan, P.; Nyman, J.S. Causative or Associative: A Critical Review of the Role of Advanced Glycation End-Products in Bone Fragility. *Bone* **2022**, *163*, 116485, doi:10.1016/j.bone.2022.116485.
96. Strieder-Barboza, C.; Baker, N.A.; Flesher, C.G.; Karmakar, M.; Neeley, C.K.; Polsinelli, D.; Dimick, J.B.; Finks, J.F.; Ghaferi, A.A.; Varban, O.A.; et al. Advanced Glycation End-Products Regulate Extracellular Matrix-Adipocyte Metabolic Crosstalk in Diabetes. *Sci Rep* **2019**, *9*, 19748, doi:10.1038/s41598-019-56242-z.
97. Duran-Jimenez, B.; Dobler, D.; Moffatt, S.; Rabbani, N.; Streuli, C.H.; Thornalley, P.J.; Tomlinson, D.R.; Gardiner, N.J. Advanced Glycation End Products in Extracellular Matrix Proteins Contribute to the Failure of Sensory Nerve Regeneration in Diabetes. *Diabetes* **2009**, *58*, 2893–2903, doi:10.2337/db09-0320.
98. Ahmad, R.; Kumar Sah, A.; Ahsan, H. Biochemistry and Pathophysiology of Glycation of DNA: Implications in Diabetes. *Arch Clin Biomed Res* **2017**, *01*, 32–47, doi:10.26502/acbr.5017004.

99. Bucala, R.; Model, P.; Cerami, A. Modification of DNA by Reducing Sugars: A Possible Mechanism for Nucleic Acid Aging and Age-Related Dysfunction in Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 105–109, doi:10.1073/pnas.81.1.105.
100. Goldin, A.; Beckman, J.A.; Schmidt, A.M.; Creager, M.A. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* **2006**, *114*, 597–605, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854.
101. Pullerits, R.; Brisslert, M.; Jonsson, I.; Tarkowski, A. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products Triggers a Proinflammatory Cytokine Cascade via B2 Integrin Mac-1. *Arthritis & Rheumatism* **2006**, *54*, 3898–3907, doi:10.1002/art.22217.
102. Yonekura, H.; Yamamoto, Y.; Sakurai, S.; Petrova, R.G.; Abedin, Md.J.; Li, H.; Yasui, K.; Takeuchi, M.; Makita, Z.; Takasawa, S.; et al. Novel Splice Variants of the Receptor for Advanced Glycation End-Products Expressed in Human Vascular Endothelial Cells and Pericytes, and Their Putative Roles in Diabetes-Induced Vascular Injury. *Biochemical Journal* **2003**, *370*, 1097–1109, doi:10.1042/bj20021371.
103. Takeuchi, M.; Takino, J.; Yamagishi, S. Involvement of the Toxic AGEs (TAGE)-RAGE System in the Pathogenesis of Diabetic Vascular Complications: A Novel Therapeutic Strategy. *CDT* **2010**, *11*, 1468–1482, doi:10.2174/1389450111009011468.
104. Cepas, V.; Collino, M.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M. Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Diet-Related Diseases. *Antioxidants* **2020**, *9*, 142, doi:10.3390/antiox9020142.
105. Sies, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Exp Physiol* **1997**, *82*, 291–295, doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004024.
106. Schafer, F.Q.; Buettner, G.R. Redox Environment of the Cell as Viewed through the Redox State of the Glutathione Disulfide/Glutathione Couple. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *30*, 1191–1212, doi:10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
107. Luc, K.; Schramm-Luc, A.; Guzik, T.J.; Mikolajczyk, T.P. Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Prediabetes and Diabetes. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2019**, doi:10.26402/jpp.2019.6.01.
108. Ray, P.D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cellular Signalling* **2012**, *24*, 981–990, doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
109. Bashan, N.; Kovsan, J.; Kachko, I.; Ovadia, H.; Rudich, A. Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Physiological Reviews* **2009**, *89*, 27–71, doi:10.1152/physrev.00014.2008.
110. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ Res* **2010**, *107*, 1058–1070, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
111. Bonnefont-Rousselot, D.; Beaudoux, J.-L.; Théron, P.; Peynet, J.; Legrand, A.; Delattre, J. Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **2004**, *62*, 147–157, doi:10.1016/S0003-4509(04)94297-6.
112. Friederich, M.; Hansell, P.; Palm, F. Diabetes, Oxidative Stress, Nitric Oxide and Mitochondria Function. *CDR* **2009**, *5*, 120–144, doi:10.2174/157339909788166800.
113. Du, Y.; Miller, C.M.; Kern, T.S. Hyperglycemia Increases Mitochondrial Superoxide in Retina and Retinal Cells. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *35*, 1491–1499, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.018.
114. Kohnert, K.-D.; Freyse, E.-J.; Salzsieder, E. Glycaemic Variability and Pancreatic SS-Cell Dysfunction. *CDR* **2012**, *8*, 345–354, doi:10.2174/157339912802083513.
115. Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X.L.; Yamagishi, S.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M.A.; Beebe, D.; Oates, P.J.; Hammes, H.-P.; et al. Normalizing Mitochondrial Superoxide Production Blocks Three Pathways of Hyperglycaemic Damage. *Nature* **2000**, *404*, 787–790, doi:10.1038/35008121.

116. Braga, P.C.; Bernardino, R.L.; Guerra-Carvalho, B.; Carrageta, D.F.; Oliveira, P.F.; Rodrigues, A.S.; Alves, M.G. The Progression from Mild to Severe Hyperglycemia Coupled with Insulin Resistance Causes Mitochondrial Dysfunction and Alters the Metabolic Secretome of Epithelial Kidney Cells. *Experimental Cell Research* **2023**, *431*, 113744, doi:10.1016/j.yexcr.2023.113744.
117. Sivitz, W.I.; Yorek, M.A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, *12*, 537–577, doi:10.1089/ars.2009.2531.
118. Chung, S.S.M.; Ho, E.C.M.; Lam, K.S.L.; Chung, S.K. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. *Journal of the American Society of Nephrology* **2003**, *14*, S233–S236, doi:10.1097/01.ASN.0000077408.15865.06.
119. Halliwell, B.; Adhikary, A.; Dingfelder, M.; Dizdaroglu, M. Hydroxyl Radical Is a Significant Player in Oxidative DNA Damage *in Vivo*. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 8355–8360, doi:10.1039/D1CS00044F.
120. Kohen, R.; Nyska, A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol* **2002**, *30*, 620–650, doi:10.1080/01926230290166724.
121. Kohen, R. Skin Antioxidants: Their Role in Aging and in Oxidative Stress — New Approaches for Their Evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **1999**, *53*, 181–192, doi:10.1016/S0753-3322(99)80087-0.
122. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, R.; Giustarini, D.; Milzani, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry* **2006**, *52*, 601–623, doi:10.1373/clinchem.2005.061408.
123. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2007**, *39*, 44–84, doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
124. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* **2002**, *82*, 47–95, doi:10.1152/physrev.00018.2001.
125. Cheng, Z.; Tseng, Y.; White, M.F. Insulin Signaling Meets Mitochondria in Metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2010**, *21*, 589–598, doi:10.1016/j.tem.2010.06.005.
126. Fisher-Wellman, K.H.; Neuffer, P.D. Linking Mitochondrial Bioenergetics to Insulin Resistance via Redox Biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2012**, *23*, 142–153, doi:10.1016/j.tem.2011.12.008.
127. Newsholme, P.; Cruzat, V.F.; Keane, K.N.; Carlessi, R.; De Bittencourt, P.I.H. Molecular Mechanisms of ROS Production and Oxidative Stress in Diabetes. *Biochemical Journal* **2016**, *473*, 4527–4550, doi:10.1042/BCJ20160503C.
128. Rains, J.L.; Jain, S.K. Oxidative Stress, Insulin Signaling, and Diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *50*, 567–575, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006.
129. Ge, X.; Wang, L.; Fei, A.; Ye, S.; Zhang, Q. Research Progress on the Relationship between Autophagy and Chronic Complications of Diabetes. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 956344, doi:10.3389/fphys.2022.956344.
130. He, L.; He, T.; Farrar, S.; Ji, L.; Liu, T.; Ma, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem* **2017**, *44*, 532–553, doi:10.1159/000485089.
131. Cadenas, E.; Davies, K.J.A. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and aging | This Article Is Dedicated to the Memory of Our Dear Friend, Colleague, and Mentor Lars Ernster (1920–1998), in Gratitude for All He Gave to Us. *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, *29*, 222–230, doi:10.1016/S0891-5849(00)00317-8.

132. Kesavulu, M.M.; Rao, B.K.; Giri, R.; Vijaya, J.; Subramanyam, G.; Apparao, C. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Status in Type 2 Diabetics with Coronary Heart Disease. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2001**, *53*, 33–39, doi:10.1016/S0168-8227(01)00238-8.
133. Gunawardena, H.P.; Silva, R.; Sivakanesan, R.; Ranasinghe, P.; Katulanda, P. Poor Glycaemic Control Is Associated with Increased Lipid Peroxidation and Glutathione Peroxidase Activity in Type 2 Diabetes Patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, *2019*, 1–10, doi:10.1155/2019/9471697.
134. Berbudi, A.; Rahmadika, N.; Tjahjadi, A.I.; Ruslami, R. Type 2 Diabetes and Its Impact on the Immune System. *CDR* **2020**, *16*, 442–449, doi:10.2174/1573399815666191024085838.
135. Capeau, J. Voies de Signalisation de l'insuline : Mécanismes Affectés Dans l'insulino-Résistance. *Med Sci (Paris)* **2003**, *19*, 834–839, doi:10.1051/medsci/20031989834.
136. Singh, V.P.; Bali, A.; Singh, N.; Jaggi, A.S. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol* **2014**, *18*, 1, doi:10.4196/kjpp.2014.18.1.1.
137. Cadenas, E. Basic Mechanisms of Antioxidant Activity. *BioFactors* **1997**, *6*, 391–397, doi:10.1002/biof.5520060404.
138. Singh, A.; Kukreti, R.; Saso, L.; Kukreti, S. Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. *Molecules* **2022**, *27*, 950, doi:10.3390/molecules27030950.
139. Halliwell, B. Free Radicals and Antioxidants – Quo Vadis? *Trends in Pharmacological Sciences* **2011**, *32*, 125–130, doi:10.1016/j.tips.2010.12.002.
140. Fukai, T.; Ushio-Fukai, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* **2011**, *15*, 1583–1606, doi:10.1089/ars.2011.3999.
141. Goyal, M.M.; Basak, A. Human Catalase: Looking for Complete Identity. *Protein Cell* **2010**, *1*, 888–897, doi:10.1007/s13238-010-0113-z.
142. Pei, J.; Pan, X.; Wei, G.; Hua, Y. Research Progress of Glutathione Peroxidase Family (GPX) in Redox. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1147414, doi:10.3389/fphar.2023.1147414.
143. Lu, J.; Holmgren, A. The Thioredoxin Antioxidant System. *Free Radical Biology and Medicine* **2014**, *66*, 75–87, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
144. Friedenstein, A.J.; Chailakhjan, R.K.; Lalykina, K.S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Prolif* **1970**, *3*, 393–403, doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.
145. Barrilleaux, B.; Phinney, D.G.; Prockop, D.J.; O'connor, K.C. Review: *Ex Vivo* Engineering of Living Tissues with Adult Stem Cells. *Tissue Engineering* **2006**, *12*, 3007–3019, doi:10.1089/ten.2006.12.3007.
146. Colnot, C. Cell Sources for Bone Tissue Engineering: Insights from Basic Science. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2011**, *17*, 449–457, doi:10.1089/ten.teb.2011.0243.
147. Bunpetch, V.; Zhang, Z.-Y.; Zhang, X.; Han, S.; Zongyou, P.; Wu, H.; Hong-Wei, O. Strategies for MSC Expansion and MSC-Based Microtissue for Bone Regeneration. *Biomaterials* **2019**, *196*, 67–79, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.11.023.
148. Knight, M.N.; Hankenson, K.D. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Advances in Wound Care* **2013**, *2*, 306–316, doi:10.1089/wound.2012.0420.
149. Cramer, C.; Freisinger, E.; Jones, R.K.; Slakey, D.P.; Dupin, C.L.; Newsome, E.R.; Alt, E.U.; Izadpanah, R. Persistent High Glucose Concentrations Alter the Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development* **2010**, *19*, 1875–1884,



doi:10.1089/scd.2010.0009.

150. Colnot, C. Skeletal Cell Fate Decisions Within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration. *Journal of Bone and Mineral Research* **2009**, *24*, 274–282, doi:10.1359/jbmr.081003.
151. L., P.K.; Kandoi, S.; Misra, R.; S., V.; K., R.; Verma, R.S. The Mesenchymal Stem Cell Secretome: A New Paradigm towards Cell-Free Therapeutic Mode in Regenerative Medicine. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2019**, *46*, 1–9, doi:10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.
152. Pajarinen, J.; Lin, T.; Gibon, E.; Kohno, Y.; Maruyama, M.; Nathan, K.; Lu, L.; Yao, Z.; Goodman, S.B. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Bone Healing. *Biomaterials* **2019**, *196*, 80–89, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.12.025.
153. Pountos, I.; Giannoudis, P.V. Fracture Healing: Back to Basics and Latest Advances. In *Fracture Reduction and Fixation Techniques*; Giannoudis, P.V., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 3–17 ISBN 978-3-319-68627-1.
154. Zhang, E.; Miramini, S.; Patel, M.; Richardson, M.; Ebeling, P.; Zhang, L. Role of TNF- $\alpha$  in Early-Stage Fracture Healing under Normal and Diabetic Conditions. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* **2022**, *213*, 106536, doi:10.1016/j.cmpb.2021.106536.
155. Wang, X.; Wang, Y.; Gou, W.; Lu, Q.; Peng, J.; Lu, S. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration and Fracture Repair: A Review. *International Orthopaedics (SICOT)* **2013**, *37*, 2491–2498, doi:10.1007/s00264-013-2059-2.
156. Marsell, R.; Einhorn, T.A. The Biology of Fracture Healing. *Injury* **2011**, *42*, 551–555, doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.
157. Bahney, C.S.; Zondervan, R.L.; Allison, P.; Theologis, A.; Ashley, J.W.; Ahn, J.; Miclau, T.; Marcucio, R.S.; Hankenson, K.D. Cellular Biology of Fracture Healing. *J. Orthop. Res.* **2019**, *37*, 35–50, doi:10.1002/jor.24170.
158. Tanius, M.; Brickman, B.; Cage, E.; Abbas, K.; Smith, C.; Atallah, M.; Baroi, S.; Lecka-Czernik, B. Diabetes and Impaired Fracture Healing: A Narrative Review of Recent Literature. *Curr Osteoporos Rep* **2022**, *20*, 229–239, doi:10.1007/s11914-022-00740-z.
159. Mangialardi, G.; Spinetti, G.; Reni, C.; Madeddu, P. Reactive Oxygen Species Adversely Impacts Bone Marrow Microenvironment in Diabetes. *Antioxidants & Redox Signaling* **2014**, *21*, 1620–1633, doi:10.1089/ars.2014.5944.
160. Swan, M.C.; Goodacre, T.E.E. Morbidity at the Iliac Crest Donor Site Following Bone Grafting of the Cleft Alveolus. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **2006**, *44*, 129–133, doi:10.1016/j.bjoms.2005.04.015.
161. Amini, A.R.; Laurencin, C.T.; Nukavarapu, S.P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng* **2012**, *40*, 363–408, doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10.
162. Gugliandolo, A.; Fonticoli, L.; Trubiani, O.; Rajan, T.S.; Marconi, G.D.; Bramanti, P.; Mazzon, E.; Pizzicannella, J.; Diomedede, F. Oral Bone Tissue Regeneration: Mesenchymal Stem Cells, Secretome, and Biomaterials. *IJMS* **2021**, *22*, 5236, doi:10.3390/ijms22105236.
163. Fu, J.; Wang, Y.; Jiang, Y.; Du, J.; Xu, J.; Liu, Y. Systemic Therapy of MSCs in Bone Regeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stem Cell Res Ther* **2021**, *12*, 377, doi:10.1186/s13287-021-02456-w.
164. Jayankura, M.; Schulz, A.P.; Delahaut, O.; Witvrouw, R.; Seefried, L.; Berg, B.V.; Heynen, G.; Sonnet, W. Percutaneous Administration of Allogeneic Bone-Forming Cells for the Treatment of Delayed Unions of Fractures: A Pilot Study. *Stem Cell Res Ther* **2021**, *12*, 363, doi:10.1186/s13287-021-02432-4.
165. Gjerde, C.; Mustafa, K.; Hellem, S.; Rojewski, M.; Gjengedal, H.; Yassin, M.A.; Feng, X.; Skaale, S.; Berge, T.; Rosen, A.; et al. Cell Therapy Induced Regeneration of Severely Atrophied Mandibular Bone in a Clinical Trial. *Stem Cell Res Ther* **2018**, *9*, 213,

doi:10.1186/s13287-018-0951-9.

166. Petite, H.; Viateau, V.; Bensaïd, W.; Meunier, A.; de Pollak, C.; Bourguignon, M.; Oudina, K.; Sedel, L.; Guillemain, G. Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 959.
167. Stavely, R.; Nurgali, K. The Emerging Antioxidant Paradigm of Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Translational Medicine* **2020**, *9*, 985–1006, doi:10.1002/sctm.19-0446.
168. Li, J.; Li, D.; Liu, X.; Tang, S.; Wei, F. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Reduce Systemic Inflammation and Attenuate LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats. *J Inflamm* **2012**, *9*, 33, doi:10.1186/1476-9255-9-33.
169. Feng, J.; Lu, C.; Dai, Q.; Sheng, J.; Xu, M. SIRT3 Facilitates Amniotic Fluid Stem Cells to Repair Diabetic Nephropathy Through Protecting Mitochondrial Homeostasis by Modulation of Mitophagy. *Cell Physiol Biochem* **2018**, *46*, 1508–1524, doi:10.1159/000489194.
170. Evens, L.; Beliën, H.; Deluyker, D.; Bronckaers, A.; Gervois, P.; Hendrikx, M.; Bito, V. The Impact of Advanced Glycation End-Products (AGEs) on Proliferation and Apoptosis of Primary Stem Cells: A Systematic Review. *Stem Cells International* **2020**, *2020*, 1–13, doi:10.1155/2020/8886612.
171. Hamann, C.; Goettsch, C.; Mettelsiefen, J.; Henkenjohann, V.; Rauner, M.; Hempel, U.; Bernhardt, R.; Fratzl-Zelman, N.; Roschger, P.; Rammelt, S.; 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. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2011**, *301*, E1220–E1228, doi:10.1152/ajpendo.00378.2011.
172. Lu, Y.; Lu, Y.; Li, H.; Cheng, X. Effect of Advanced Glycosylation End Products (AGEs) on Proliferation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Vitro. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* **2012**, *48*, 599–602, doi:10.1007/s11626-012-9551-7.
173. Fang, H.; Yang, K.; Tang, P.; Zhao, N.; Ma, R.; Luo, X.; Liu, Q. Glycosylation End Products Mediate Damage and Apoptosis of Periodontal Ligament Stem Cells Induced by the JNK-Mitochondrial Pathway. *Aging* **2020**, *12*, 12850–12868, doi:10.18632/aging.103304.
174. Maharajan, N.; Ganesan, C.D.; Moon, C.; Jang, C.-H.; Oh, W.-K.; Cho, G.-W. Licochalcone D Ameliorates Oxidative Stress-Induced Senescence via AMPK Activation. *IJMS* **2021**, *22*, 7324, doi:10.3390/ijms22147324.
175. Bajaj, S.; Khan, A. Antioxidants and Diabetes. *Indian J Endocr Metab* **2012**, *16*, 267, doi:10.4103/2230-8210.104057.
176. Gulcin, İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Arch Toxicol* **2020**, *94*, 651–715, doi:10.1007/s00204-020-02689-3.
177. Jha, J.C.; Banal, C.; Chow, B.S.M.; Cooper, M.E.; Jandeleit-Dahm, K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **2016**, *25*, 657–684, doi:10.1089/ars.2016.6664.
178. Shah, M.S.; Brownlee, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res* **2016**, *118*, 1808–1829, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306923.
179. Kang, Q.; Yang, C. Oxidative Stress and Diabetic Retinopathy: Molecular Mechanisms, Pathogenetic Role and Therapeutic Implications. *Redox Biology* **2020**, *37*, 101799, doi:10.1016/j.redox.2020.101799.
180. Volpe, C.M.O.; Villar-Delfino, P.H.; Dos Anjos, P.M.F.; Nogueira-Machado, J.A. Cellular Death, Reactive Oxygen Species (ROS) and Diabetic Complications. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, 119, doi:10.1038/s41419-017-0135-z.
181. Golbidi, S.; Alireza Ebadi, S.; Laher, I. Antioxidants in the Treatment of Diabetes. *CDR* **2011**, *7*, 106–125, doi:10.2174/157339911794940729.

182. Zhang, P.; Li, T.; Wu, X.; Nice, E.C.; Huang, C.; Zhang, Y. Oxidative Stress and Diabetes: Antioxidative Strategies. *Front. Med.* **2020**, *14*, 583–600, doi:10.1007/s11684-019-0729-1.
183. Grama, C.N.; Suryanarayana, P.; Patil, M.A.; Raghu, G.; Balakrishna, N.; Kumar, M.N.V.R.; Reddy, G.B. Efficacy of Biodegradable Curcumin Nanoparticles in Delaying Cataract in Diabetic Rat Model. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78217, doi:10.1371/journal.pone.0078217.
184. Kannadhasan, R.; Venkataraman, S. In Vitro Capacity and in Vivo Antioxidant Potency of Sedimental Extract of *Tinospora Cordifolia* in Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes. *Avicenna J Phytomed* **2013**, *3*, 7–24.
185. Cojic, M.; Kocic, R.; Klisic, A.; Kocic, G. The Effects of Vitamin D Supplementation on Metabolic and Oxidative Stress Markers in Patients With Type 2 Diabetes: A 6-Month Follow Up Randomized Controlled Study. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 610893, doi:10.3389/fendo.2021.610893.
186. Mahjabeen, W.; Khan, D.A.; Mirza, S.A. Role of Resveratrol Supplementation in Regulation of Glucose Hemostasis, Inflammation and Oxidative Stress in Patients with Diabetes Mellitus Type 2: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Complementary Therapies in Medicine* **2022**, *66*, 102819, doi:10.1016/j.ctim.2022.102819.
187. Shafabakhsh, R.; Mobini, M.; Raygan, F.; Aghadavod, E.; Ostadmohammadi, V.; Amirani, E.; Mansournia, M.A.; Asemi, Z. Curcumin Administration and the Effects on Psychological Status and Markers of Inflammation and Oxidative Damage in Patients with Type 2 Diabetes and Coronary Heart Disease. *Clinical Nutrition ESPEN* **2020**, *40*, 77–82, doi:10.1016/j.clnesp.2020.09.029.
188. Talaei, B.; Amouzegar, A.; Sahranavard, S.; Hedayati, M.; Mirmiran, P.; Azizi, F. Effects of Cinnamon Consumption on Glycemic Indicators, Advanced Glycation End Products, and Antioxidant Status in Type 2 Diabetic Patients. *Nutrients* **2017**, *9*, 991, doi:10.3390/nu9090991.
189. Nafiseh Sokri Mashhadi; Mehrnoosh Zakerkish; Javad Mohammadiasl; Mehdi Zarei; Majid Mohammadshahi; Mohammad Hossein Haghizadeh Astaxanthin Improves Glucose Metabolism and Reduces Blood Pressure in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus 2018.
190. Dodd, S.; Dean, O.; Copolov, D.L.; Malhi, G.S.; Berk, M. N -Acetylcysteine for Antioxidant Therapy: Pharmacology and Clinical Utility. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2008**, *8*, 1955–1962, doi:10.1517/14728220802517901.
191. Aruoma, O.I.; Halliwell, B.; Hoey, B.M.; Butler, J. The Antioxidant Action of N-Acetylcysteine: Its Reaction with Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radical, Superoxide, and Hypochlorous Acid. *Free Radical Biology and Medicine* **1989**, *6*, 593–597, doi:10.1016/0891-5849(89)90066-X.
192. Schneider, M.; Delles, C.; Schmidt, B.; Oehmer, S.; Schwarz, T.; Schmieder, R.; John, S. Superoxide Scavenging Effects of N-Acetylcysteine and Vitamin C in Subjects With Essential Hypertension. *American Journal of Hypertension* **2005**, *18*, 1111–1117, doi:10.1016/j.amjhyper.2005.02.006.
193. Sahasrabudhe, S.A.; Terluk, M.R.; Kartha, R.V. N-Acetylcysteine Pharmacology and Applications in Rare Diseases—Repurposing an Old Antioxidant. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1316, doi:10.3390/antiox12071316.
194. Amid, R.; Alamdari, M.I.; Kadkhodazadeh, M. Effect of Enamel Matrix Derivative and N-Acetyl Cysteine on Proliferation and Osteogenic Activity of Dental Pulp Stem Cells. *J Long Term Eff Med Implants* **2022**, *32*, 51–59, doi:10.1615/JLongTermEffMedImplants.2022040074.
195. Bretti, C.; Cardiano, P.; Irto, A.; Lando, G.; Milea, D.; Sammartano, S. Interaction of N-Acetyl-L-Cysteine with Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. Thermodynamic Aspects, Chemical



- Speciation and Sequestering Ability in Natural Fluids. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, 319, 114164, doi:10.1016/j.molliq.2020.114164.
196. Hu, I.-C. Production of Potential Coproducts from Microalgae. In *Biofuels from Algae*; Elsevier, 2019; pp. 345–358 ISBN 978-0-444-64192-2.
197. Fassett, R.G.; Coombes, J.S. Astaxanthin: A Potential Therapeutic Agent in Cardiovascular Disease. *Marine Drugs* **2011**, 9, 447–465, doi:10.3390/md9030447.
198. Chang, M.X.; Xiong, F. Astaxanthin and Its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions. *Molecules* **2020**, 25, 5342, doi:10.3390/molecules25225342.
199. Kang, J.-O.; Kim, S.-J.; Kim, H. Effect of Astaxanthin on the Hepatotoxicity, Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzymes in the Liver of CCl<sub>4</sub>-Treated Rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* **2001**, 23, 79, doi:10.1358/mf.2001.23.2.627931.
200. Iwamoto, T.; Hosoda, K.; Hirano, R.; Kurata, H.; Matsumoto, A.; Miki, W.; Kamiyama, M.; Itakura, H.; Yamamoto, S.; Kondo, K. Inhibition of Low-Density Lipoprotein Oxidation by Astaxanthin. *J Atheroscler Thromb* **2000**, 7, 216–222, doi:10.5551/jat1994.7.216.
201. Sandmann, G. Carotenoid Biosynthesis in Microorganisms and Plants. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223, 7–24, doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18961.x.
202. Nagao, A. Absorption and Metabolism of Dietary Carotenoids. *BioFactors* **2011**, 37, 83–87, doi:10.1002/biof.151.
203. Zuluaga, M.; Gueguen, V.; Letourneur, D.; Pavon-Djavid, G. Astaxanthin-Antioxidant Impact on Excessive Reactive Oxygen Species Generation Induced by Ischemia and Reperfusion Injury. *Chemico-Biological Interactions* **2018**, 279, 145–158, doi:10.1016/j.cbi.2017.11.012.
204. Brannon-Peppas, L. Recent Advances on the Use of Biodegradable Microparticles and Nanoparticles in Controlled Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **1995**, 116, 1–9, doi:10.1016/0378-5173(94)00324-X.
205. Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J.C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. A Review on the Use of Cyclodextrins in Foods. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23, 1631–1640, doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.001.
206. Krestinina, O.; Baburina, Y.; Krestinin, R. Mitochondrion as a Target of Astaxanthin Therapy in Heart Failure. *IJMS* **2021**, 22, 7964, doi:10.3390/ijms22157964.
207. Al-Hariri, M. Sweet Bones: The Pathogenesis of Bone Alteration in Diabetes. *Journal of Diabetes Research* **2016**, 2016, 1–5, doi:10.1155/2016/6969040.
208. Peng, B.-Y.; Dubey, N.K.; Mishra, V.K.; Tsai, F.-C.; Dubey, R.; Deng, W.-P.; Wei, H.-J. Addressing Stem Cell Therapeutic Approaches in Pathobiology of Diabetes and Its Complications. *Journal of Diabetes Research* **2018**, 2018, 1–16, doi:10.1155/2018/7806435.
209. Deepmala; Slattery, J.; Kumar, N.; Delhey, L.; Berk, M.; Dean, O.; Spielholz, C.; Frye, R. Clinical Trials of N-Acetylcysteine in Psychiatry and Neurology: A Systematic Review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **2015**, 55, 294–321, doi:10.1016/j.neubiorev.2015.04.015.
210. Tenório, M.C.D.S.; Graciliano, N.G.; Moura, F.A.; Oliveira, A.C.M.D.; Goulart, M.O.F. N-Acetylcysteine (NAC): Impacts on Human Health. *Antioxidants* **2021**, 10, 967, doi:10.3390/antiox10060967.
211. Zuluaga, M.; Barzegari, A.; Letourneur, D.; Gueguen, V.; Pavon-Djavid, G. Oxidative Stress Regulation on Endothelial Cells by Hydrophilic Astaxanthin Complex: Chemical, Biological, and Molecular Antioxidant Activity Evaluation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, 2017, 1–15, doi:10.1155/2017/8073798.
212. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.;

- Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **1999**, *284*, 143–147, doi:10.1126/science.284.5411.143.
213. Watt, S.M.; Gullo, F.; Van Der Garde, M.; Markeson, D.; Camicia, R.; Khoo, C.P.; Zwaginga, J.J. The Angiogenic Properties of Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Therapeutic Potential. *British Medical Bulletin* **2013**, *108*, 25–53, doi:10.1093/bmb/ldt031.
214. Fijany, A.; Sayadi, L.R.; Khoshab, N.; Banyard, D.A.; Shaterian, A.; Alexander, M.; Lakey, J.R.T.; Paydar, K.Z.; Evans, G.R.D.; Widgerow, A.D. Mesenchymal Stem Cell Dysfunction in Diabetes. *Mol Biol Rep* **2019**, *46*, 1459–1475, doi:10.1007/s11033-018-4516-x.
215. González, P.; Lozano, P.; Ros, G.; Solano, F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *IJMS* **2023**, *24*, 9352, doi:10.3390/ijms24119352.
216. Bigarella, C.L.; Liang, R.; Ghaffari, S. Stem Cells and the Impact of ROS Signaling. *Development* **2014**, *141*, 4206–4218, doi:10.1242/dev.107086.
217. Ribot, J.; Denoëud, C.; Frescaline, G.; Landon, R.; Petite, H.; Pavon-Djavid, G.; Bensidhoum, M.; Anagnostou, F. Experimental Type 2 Diabetes Differently Impacts on the Select Functions of Bone Marrow-Derived Multipotent Stromal Cells. *Cells* **2021**, *10*, 268, doi:10.3390/cells10020268.
218. Barzegari, A.; Omidi, Y.; Landon, R.; Gueguen, V.; Parvizpour, S.; Meddahi-Pellé, A.; Anagnostou, F.; Pavon-Djavid, G. The Protective Effect of N-Acetylcysteine on Antimycin A-Induced Respiratory Chain Deficiency in Mesenchymal Stem Cells. *Chem Biol Interact* **2022**, *360*, 109937, doi:10.1016/j.cbi.2022.109937.
219. Devlin, M.J.; Van Vliet, M.; Motyl, K.; Karim, L.; Brooks, D.J.; Louis, L.; Conlon, C.; Rosen, C.J.; Bouxsein, M.L. Early-Onset Type 2 Diabetes Impairs Skeletal Acquisition in the Male TALLYHO/JngJ Mouse. *Endocrinology* **2014**, *155*, 3806–3816, doi:10.1210/en.2014-1041.
220. Ferland-McCollough, D.; Maselli, D.; Spinetti, G.; Sambataro, M.; Sullivan, N.; Blom, A.; Madeddu, P. MCP-1 Feedback Loop Between Adipocytes and Mesenchymal Stromal Cells Causes Fat Accumulation and Contributes to Hematopoietic Stem Cell Rarefaction in the Bone Marrow of Patients With Diabetes. *Diabetes* **2018**, *67*, 1380–1394, doi:10.2337/db18-0044.
221. Tencerova, M.; Kassem, M. The Bone Marrow-Derived Stromal Cells: Commitment and Regulation of Adipogenesis. *Front. Endocrinol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fendo.2016.00127.
222. Kim, T.Y.; Schafer, A.L. Diabetes and Bone Marrow Adiposity. *Curr Osteoporos Rep* **2016**, *14*, 337–344, doi:10.1007/s11914-016-0336-x.
223. Ay, B.; Parolia, K.; Liddell, R.S.; Qiu, Y.; Grasselli, G.; Cooper, D.M.L.; Davies, J.E. Hyperglycemia Compromises Rat Cortical Bone by Increasing Osteocyte Lacunar Density and Decreasing Vascular Canal Volume. *Commun Biol* **2020**, *3*, 20, doi:10.1038/s42003-019-0747-1.
224. Pacicca, D.M.; Brown, T.; Watkins, D.; Kover, K.; Yan, Y.; Prideaux, M.; Bonewald, L. Elevated Glucose Acts Directly on Osteocytes to Increase Sclerostin Expression in Diabetes. *Sci Rep* **2019**, *9*, 17353, doi:10.1038/s41598-019-52224-3.
225. Eckhardt, B.A.; Rowsey, J.L.; Thicke, B.S.; Fraser, D.G.; O’Grady, K.L.; Bondar, O.P.; Hines, J.M.; Singh, R.J.; Thoreson, A.R.; Rakshit, K.; et al. Accelerated Osteocyte Senescence and Skeletal Fragility in Mice with Type 2 Diabetes. *JCI Insight* **2020**, *5*, e135236, doi:10.1172/jci.insight.135236.
226. Miura, J.; Yamagishi, S.; Uchigata, Y.; Takeuchi, M.; Yamamoto, H.; Makita, Z.; Iwamoto, Y. Serum Levels of Non-Carboxymethyllysine Advanced Glycation Endproducts Are Correlated to Severity of Microvascular Complications in Patients with Type 1 Diabetes.

- Journal of Diabetes and its Complications* **2003**, *17*, 16–21, doi:10.1016/S1056-8727(02)00183-6.
227. Weinberg, E.; Maymon, T.; Weinreb, M. AGEs Induce Caspase-Mediated Apoptosis of Rat BMSCs via TNF $\alpha$  Production and Oxidative Stress. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *52*, 67–76, doi:10.1530/JME-13-0229.
228. Luo, D.; Hu, Y.; Tang, Y.; Ding, X.; Li, C.; Zheng, L. Effect of Advanced Glycation End Products on Autophagic Ability in Osteoblasts. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **2021**, *46*, 361–367, doi:10.11817/j.issn.1672-7347.2021.190401.
229. Yang, K.; Wang, X.Q.; He, Y.S.; Lu, L.; Chen, Q.J.; Liu, J.; Shen, W.F. Advanced Glycation End Products Induce Chemokine/Cytokine Production via Activation of P38 Pathway and Inhibit Proliferation and Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Cardiovasc Diabetol* **2010**, *9*, 66, doi:10.1186/1475-2840-9-66.
230. Gong, J.-H.; Dong, J.-Y.; Xie, T.; Lu, S.-L. The Influence of AGEs Environment on Proliferation, Apoptosis, Homeostasis, and Endothelial Cell Differentiation of Human Adipose Stem Cells. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* **2017**, *16*, 94–103, doi:10.1177/1534734617701575.
231. Holmström, K.M.; Finkel, T. Cellular Mechanisms and Physiological Consequences of Redox-Dependent Signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2014**, *15*, 411–421, doi:10.1038/nrm3801.
232. Barzegari, A.; Aaboulhassanzadeh, S.; Landon, R.; Gueguen, V.; Meddahi-Pellé, A.; Parvizpour, S.; Anagnostou, F.; Pavon-Djavid, G. Mitohormesis and Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Stem Cell Fate. *J Cell Physiol* **2022**, *237*, 3435–3448, doi:10.1002/jcp.30820.
233. Gu, M.J.; Hyon, J.-Y.; Lee, H.-W.; Han, E.H.; Kim, Y.; Cha, Y.-S.; Ha, S.K. Glycolaldehyde, an Advanced Glycation End Products Precursor, Induces Apoptosis via ROS-Mediated Mitochondrial Dysfunction in Renal Mesangial Cells. *Antioxidants* **2022**, *11*, 934, doi:10.3390/antiox11050934.
234. Meng, Z.; Liu, J.; Feng, Z.; Guo, S.; Wang, M.; Wang, Z.; Li, Z.; Li, H.; Sui, L. N-Acetylcysteine Regulates Dental Follicle Stem Cell Osteogenesis and Alveolar Bone Repair via ROS Scavenging. *Stem Cell Research & Therapy* **2022**, *13*, 466, doi:10.1186/s13287-022-03161-y.
235. Ali, F.; Khan, M.; Khan, S.N.; Riazuddin, S. N-Acetyl Cysteine Protects Diabetic Mouse Derived Mesenchymal Stem Cells from Hydrogen-Peroxide-Induced Injury: A Novel Hypothesis for Autologous Stem Cell Transplantation. *Journal of the Chinese Medical Association* **2016**, *79*, 122–129, doi:10.1016/j.jcma.2015.09.005.
236. Barzegari, A.; Omid, Y.; Landon, R.; Gueguen, V.; Parvizpour, S.; Meddahi-Pellé, A.; Anagnostou, F.; Pavon-Djavid, G. The Protective Effect of N-Acetylcysteine on Antimycin A-Induced Respiratory Chain Deficiency in Mesenchymal Stem Cells. *Chemico-Biological Interactions* **2022**, *360*, 109937, doi:10.1016/j.cbi.2022.109937.
237. Aruoma, O.I.; Halliwell, B.; Hoey, B.M.; Butler, J. The Antioxidant Action of N-Acetylcysteine: Its Reaction with Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radical, Superoxide, and Hypochlorous Acid. *Free Radical Biology and Medicine* **1989**, *6*, 593–597, doi:10.1016/0891-5849(89)90066-X.
238. Li, C.-J.; Sun, L.-Y.; Pang, C.-Y. Synergistic Protection of N-Acetylcysteine and Ascorbic Acid 2-Phosphate on Human Mesenchymal Stem Cells Against Mitoptosis, Necroptosis and Apoptosis. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 9819, doi:10.1038/srep09819.
239. Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Prediabetes and Diabetes. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2019**, doi:10.26402/jpp.2019.6.01.
240. Landon, R.; Gueguen, V.; Petite, H.; Letourneur, D.; Pavon-Djavid, G.; Anagnostou, F. Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications. *Mar Drugs*

- 2020**, *18*, 357, doi:10.3390/md18070357.
241. Catanzaro, E.; Bishayee, A.; Fimognari, C. On a Beam of Light: Photoprotective Activities of the Marine Carotenoids Astaxanthin and Fucoxanthin in Suppression of Inflammation and Cancer. *Marine Drugs* **2020**, *18*, 544, doi:10.3390/md18110544.
242. Zhou, X.; Cao, Q.; Orfila, C.; Zhao, J.; Zhang, L. Systematic Review and Meta-Analysis on the Effects of Astaxanthin on Human Skin Ageing. *Nutrients* **2021**, *13*, 2917, doi:10.3390/nu13092917.
243. Zuluaga Tamayo, M.; Choudat, L.; Aid-Launais, R.; Thibaudeau, O.; Louedec, L.; Letourneur, D.; Gueguen, V.; Meddahi-Pellé, A.; Couvelard, A.; Pavon-Djavid, G. Astaxanthin Complexes to Attenuate Muscle Damage after In Vivo Femoral Ischemia-Reperfusion. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 354, doi:10.3390/md17060354.
244. Dong, S.; Huang, Y.; Zhang, R.; Lian, Z.; Wang, S.; Liu, Y. Inclusion Complexes of Astaxanthin with Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Parameters Optimization, Spectroscopic Profiles, and Properties. *Euro J Lipid Sci & Tech* **2014**, *116*, 978–986, doi:10.1002/ejlt.201300261.
245. Sueishi, Y.; Ishikawa, M.; Yoshioka, D.; Endoh, N.; Oowada, S.; Shimmei, M.; Fujii, H.; Kotake, Y. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Cyclodextrin-Solubilized Flavonoids, Resveratrol and Astaxanthin as Measured with the ORAC-EPR Method. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2012**, *50*, 127–132, doi:10.3164/jcbtn.11-21.
246. Ambati, R.; Phang, S.-M.; Ravi, S.; Aswathanarayana, R. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs* **2014**, *12*, 128–152, doi:10.3390/md12010128.
247. Hua, Z.; Zhang, X.; Zhao, X.; Zhu, B.-W.; Liu, D.; Tan, M. Hepatic-Targeted Delivery of Astaxanthin for Enhanced Scavenging Free Radical Scavenge and Preventing Mitochondrial Depolarization. *Food Chemistry* **2023**, *406*, 135036, doi:10.1016/j.foodchem.2022.135036.
248. Yuan, C.; Du, L.; Jin, Z.; Xu, X. Storage Stability and Antioxidant Activity of Complex of Astaxanthin with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *91*, 385–389, doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.059.
249. Chen, X.; Chen, R.; Guo, Z.; Li, C.; Li, P. The Preparation and Stability of the Inclusion Complex of Astaxanthin with  $\beta$ -Cyclodextrin. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1580–1584, doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.020.
250. Yang, C.-S.; Guo, X.-S.; Yue, Y.-Y.; Wang, Y.; Jin, X.-L. Astaxanthin Promotes the Survival of Adipose-Derived Stem Cells by Alleviating Oxidative Stress via Activating the Nrf2 Signaling Pathway. *IJMS* **2023**, *24*, 3850, doi:10.3390/ijms24043850.
251. Mohammadi, S.; Barzegari, A.; Dehnad, A.; Barar, J.; Omid, Y. Astaxanthin Protects Mesenchymal Stem Cells from Oxidative Stress by Direct Scavenging of Free Radicals and Modulation of Cell Signaling. *Chemico-Biological Interactions* **2021**, *333*, 109324, doi:10.1016/j.cbi.2020.109324.
252. Yaghooti, H.; Mohammadtaghvaei, N.; Mahboobnia, K. Effects of Palmitate and Astaxanthin on Cell Viability and Proinflammatory Characteristics of Mesenchymal Stem Cells. *International Immunopharmacology* **2019**, *68*, 164–170, doi:10.1016/j.intimp.2018.12.063.
253. Lee, J.; Lim, J.W.; Kim, H. Astaxanthin Inhibits Oxidative Stress-Induced Ku Protein Degradation and Apoptosis in Gastric Epithelial Cells. *Nutrients* **2022**, *14*, 3939, doi:10.3390/nu14193939.
254. Corinne Sprong, R.; Winkelhuyzen-Janssen, A.M.L.; Aarsman, C.J.M.; van OIRSCHOT, J.F.L.M.; van der BRUGGEN, T.; SWEDER van ASBECK, B. Low-Dose *N*-Acetylcysteine Protects Rats against Endotoxin-Mediated Oxidative Stress, But High-Dose Increases Mortality. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, *157*, 1283–1293,



doi:10.1164/ajrcm.157.4.9508063.

255. Maartens, M.; Kruger, M.J.; Van De Vyver, M. The Effect of N-Acetylcysteine and Ascorbic Acid-2-Phosphate Supplementation on Mesenchymal Stem Cell Function in B6.C-Lep<sup>ob</sup> /J Type 2 Diabetic Mice. *Stem Cells and Development* **2021**, *30*, 1179–1189, doi:10.1089/scd.2021.0139.
256. Mehrbani Azar, Y.; Niesler, C.U.; Van De Vyver, M. Ex Vivo Antioxidant Preconditioning Improves the Survival Rate of Bone Marrow Stem Cells in the Presence of Wound Fluid. *Wound Repair Regeneration* **2020**, *28*, 506–516, doi:10.1111/wrr.12815.
257. Galow, A.-M.; Rebl, A.; Koczan, D.; Bonk, S.M.; Baumann, W.; Gimsa, J. Increased Osteoblast Viability at Alkaline pH in Vitro Provides a New Perspective on Bone Regeneration. *Biochemistry and Biophysics Reports* **2017**, *10*, 17–25, doi:10.1016/j.bbrep.2017.02.001.
258. Chae, S.Y.; Park, R.; Hong, S.W. Surface-Mediated High Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Astaxanthin-Loaded Ultrathin Graphene Oxide Film That Inhibits the Overproduction of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Biomater Res* **2022**, *26*, 30, doi:10.1186/s40824-022-00276-4.
259. Mursaleen, L.; Noble, B.; Chan, S.H.Y.; Somavarapu, S.; Zariwala, M.G. N-Acetylcysteine Nanocarriers Protect against Oxidative Stress in a Cellular Model of Parkinson's Disease. *Antioxidants* **2020**, *9*, 600, doi:10.3390/antiox9070600.
260. Goto, S.; Kogure, K.; Abe, K.; Kimata, Y.; Kitahama, K.; Yamashita, E.; Terada, H. Efficient Radical Trapping at the Surface and inside the Phospholipid Membrane Is Responsible for Highly Potent Antiperoxidative Activity of the Carotenoid Astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2001**, *1512*, 251–258, doi:10.1016/S0005-2736(01)00326-1.
261. Nakajima, Y.; Inokuchi, Y.; Shimazawa, M.; Otsubo, K.; Ishibashi, T.; Hara, H. Astaxanthin, a Dietary Carotenoid, Protects Retinal Cells against Oxidative Stress in-Vitro and in Mice in-Vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *60*, 1365–1374, doi:10.1211/jpp.60.10.0013.
262. Senthamilan, S.; Aggarwal, A.; Grewal, S.; Rani, S.; Vats, P.; Pal, P.; Jaswal, S.; Arya, A.; Alhussien, M.N. Pre-Treatment but Not Co-Treatment with Vitexin Alleviates Hyperthermia Induced Oxidative Stress and Inflammation in Buffalo Mammary Epithelial Cells. *Journal of Reproductive Immunology* **2023**, *158*, 103979, doi:10.1016/j.jri.2023.103979.
263. Reddy, M.A.; Zhang, E.; Natarajan, R. Epigenetic Mechanisms in Diabetic Complications and Metabolic Memory. *Diabetologia* **2015**, *58*, 443–455, doi:10.1007/s00125-014-3462-y.
264. Kim, J.H.; Nam, S.-W.; Kim, B.W.; Kim, W.-J.; Choi, Y.H. Astaxanthin Improves the Proliferative Capacity as Well as the Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential in Neural Stem Cells. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 1741–1745, doi:10.1016/j.fct.2010.04.002.
265. Zhou, X.; Zhang, F.; Hu, X.; Chen, J.; Tang, R.; Zheng, K.; Song, Y. Depression Can Be Prevented by Astaxanthin through Inhibition of Hippocampal Inflammation in Diabetic Mice. *Brain Research* **2017**, *1657*, 262–268, doi:10.1016/j.brainres.2016.12.018.
266. Wang, X.; Jiang, M.; He, X.; Zhang, B.; Peng, W.; Guo, L. N-acetyl Cysteine Inhibits the Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Response in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Suppressing the TXNIP/NLRP3/IL-1 $\beta$  Signaling Pathway. *Mol Med Rep* **2020**, doi:10.3892/mmr.2020.11433.
267. Zhao, G.; Zhong, H.; Rao, T.; Pan, Z. Metabolomic Analysis Reveals That the Mechanism of Astaxanthin Improves the Osteogenic Differentiation Potential in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**, *2020*,

- 1–11, doi:10.1155/2020/3427430.
268. Bhattarai, G.; So, H.-S.; Kim, T.-G.; Kieu, T.T.T.; Kim, Y.-W.; Yang, K.-R.; Lee, J.-C.; Kook, S.-H.; Jeon, Y.-M. Astaxanthin Protects against Hyperglycemia-Induced Oxidative and Inflammatory Damage to Bone Marrow and to Bone Marrow-Retained Stem Cells and Restores Normal Hematopoiesis in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2321, doi:10.3390/antiox11122321.
269. Lektemur Alpan, A.; Çalışır, M. The Effect of Two Different Doses of Astaxanthin on Alveolar Bone Loss in an Experimental Model of Periodontitis in Diabetic Rats. *J Vet Dent* **2022**, *39*, 224–233, doi:10.1177/08987564221093736.
270. Guo, J.; Yang, X.; Chen, J.; Wang, C.; Kang, Y.; Jiang, T.; Chen, M.; Li, W.; Zhou, C.; Chen, Z. Accelerated Bone Regeneration by an Astaxanthin-Modified Antioxidant Aerogel through Relieving Oxidative Stress via the NRF2 Signaling Pathway. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2022**, *8*, 4524–4534, doi:10.1021/acsbomaterials.2c00596.
271. Ghalandari, H.; Hosseini-Esfahani, F.; Mirmiran, P. The Association of Polymorphisms in Leptin/Leptin Receptor Genes and Ghrelin/Ghrelin Receptor Genes With Overweight/Obesity and the Related Metabolic Disturbances: A Review. *Int J Endocrinol Metab* **2015**, *13*, doi:10.5812/ijem.19073v2.
272. Olza, J.; Rupérez, A.; Gil-Campos, M.; Leis, R.; Cañete, R.; Tojo, R.; Gil, Á.; Aguilera, C. Leptin Receptor Gene Variant Rs11804091 Is Associated with BMI and Insulin Resistance in Spanish Female Obese Children: A Case-Control Study. *IJMS* **2017**, *18*, 1690, doi:10.3390/ijms18081690.
273. Duarte, S.F.P.; Francischetti, E.A.; Genelhu, V.A.; Cabello, P.H.; Pimentel, M.M.G. LEPR p.Q223R, Beta3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A Gene Variants in Obese Brazilian Subjects. *Genet Mol Res* **2007**, *6*, 1035–1043.
274. Zusi, C.; Csermely, A.; Rinaldi, E.; Bertoldo, K.; Bonetti, S.; Boselli, M.L.; Travia, D.; Bonora, E.; Bonadonna, R.C.; Trombetta, M. Crosstalk between Genetic Variability of Adiponectin and Leptin, Glucose-insulin System and Subclinical Atherosclerosis in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. The Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study 14. *Diabetes Obesity Metabolism* **2023**, *25*, 2650–2658, doi:10.1111/dom.15152.
275. Kerschnitzki, M.; Kollmannsberger, P.; Burghammer, M.; Duda, G.N.; Weinkamer, R.; Wagermaier, W.; Fratzl, P. Architecture of the Osteocyte Network Correlates with Bone Material Quality: OSTEOCYTE NETWORK ARCHITECTURE CORRELATES WITH BONE MATERIAL QUALITY. *J Bone Miner Res* **2013**, *28*, 1837–1845, doi:10.1002/jbmr.1927.
276. Choy, M.H.V.; Wong, R.M.Y.; Chow, S.K.H.; Li, M.C.; Chim, Y.N.; Li, T.K.; Ho, W.T.; Cheng, J.C.Y.; Cheung, W.H. How Much Do We Know about the Role of Osteocytes in Different Phases of Fracture Healing? A Systematic Review. *Journal of Orthopaedic Translation* **2020**, *21*, 111–121, doi:10.1016/j.jot.2019.07.005.
277. Pereira, M.; Gohin, S.; Lund, N.; Hvid, A.; Smitham, P.J.; Oddy, M.J.; Reichert, I.; Farlay, D.; Roux, J.P.; Cleasby, M.E.; et al. Sclerostin Does Not Play a Major Role in the Pathogenesis of Skeletal Complications in Type 2 Diabetes Mellitus. *Osteoporos Int* **2017**, *28*, 309–320, doi:10.1007/s00198-016-3718-0.
278. Cassidy, F.C.; Shortiss, C.; Murphy, C.G.; Kearns, S.R.; Curtin, W.; De Buitléir, C.; O'Brien, T.; Coleman, C.M. Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Human Bone Marrow Stromal Cell Number and Phenotypic Characteristics. *IJMS* **2020**, *21*, 2476, doi:10.3390/ijms21072476.
279. Mushahary, D.; Spittler, A.; Kasper, C.; Weber, V.; Charwat, V. Isolation, Cultivation, and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cytometry Pt A* **2018**, *93*, 19–31, doi:10.1002/cyto.a.23242.
280. Mirzaeicheshmeh, E.; Zerrweck, C.; Centeno-Cruz, F.; Baca-Peynado, P.; Martinez-

- Hernandez, A.; García-Ortiz, H.; Contreras-Cubas, C.; Salas-Martínez, M.G.; Saldaña-Alvarez, Y.; Mendoza-Caamal, E.C.; et al. Alterations of DNA Methylation during Adipogenesis Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose Tissue of Patients with Obesity Is Associated with Type 2 Diabetes. *Adipocyte* **2021**, *10*, 493–504, doi:10.1080/21623945.2021.1978157.
281. Moseley, K.F.; Doyle, M.E.; Jan De Beur, S.M. Diabetic Serum from Older Women Increases Adipogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Endocrine Research* **2018**, *43*, 155–165, doi:10.1080/07435800.2018.1441868.
282. Deng, X.; Xu, M.; Shen, M.; Cheng, J. Effects of Type 2 Diabetic Serum on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Diabetes Research* **2018**, *2018*, 1–9, doi:10.1155/2018/5765478.
283. Waqas, K.; Muller, M.; Koedam, M.; El Kadi, Y.; Zillikens, M.C.; Van Der Eerden, B.C.J. Methylglyoxal – an Advanced Glycation End Products (AGEs) Precursor – Inhibits Differentiation of Human MSC-Derived Osteoblasts in Vitro Independently of Receptor for AGEs (RAGE). *Bone* **2022**, *164*, 116526, doi:10.1016/j.bone.2022.116526.
284. Gkogkolou, P.; Böhm, M. Advanced Glycation End Products: Key Players in Skin Aging? *Dermato-Endocrinology* **2012**, *4*, 259–270, doi:10.4161/derm.22028.
285. Raza, H.; John, A.; Howarth, F.C. Increased Metabolic Stress in Zucker Diabetic Fatty Rat Kidney and Pancreas. *Cell Physiol Biochem* **2013**, *32*, 1610–1620, doi:10.1159/000356597.
286. Raza, H.; John, A.; Howarth, F.C. Increased Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Zucker Diabetic Rat Liver and Brain. *Cell Physiol Biochem* **2015**, *35*, 1241–1251, doi:10.1159/000373947.
287. Yan, J.; Tie, G.; Wang, S.; Messina, K.E.; DiDato, S.; Guo, S.; Messina, L.M. Type 2 Diabetes Restricts Multipotency of Mesenchymal Stem Cells and Impairs Their Capacity to Augment Postischemic Neovascularization in *Db/Db* Mice. *JAHA* **2012**, *1*, e002238, doi:10.1161/JAHA.112.002238.
288. Ohnishi, T.; Bandow, K.; Kakimoto, K.; Machigashira, M.; Matsuyama, T.; Matsuguchi, T. Oxidative Stress Causes Alveolar Bone Loss in Metabolic Syndrome Model Mice with Type 2 Diabetes. *J of Periodontal Research* **2009**, *44*, 43–51, doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01060.x.
289. Zhu, Q.; Hao, H.; Xu, H.; Fichman, Y.; Cui, Y.; Yang, C.; Wang, M.; Mittler, R.; Hill, M.A.; Cowan, P.J.; et al. Combination of Antioxidant Enzyme Overexpression and N-Acetylcysteine Treatment Enhances the Survival of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Ischemic Limb in Mice With Type 2 Diabetes. *JAHA* **2021**, *10*, e023491, doi:10.1161/JAHA.121.023491.