

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Technologies Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine,
Thérapie Cellulaire et Génique, Médecine Régénératrice et Biomatériaux

Par

Maude GLUAIS

**Médecine régénératrice du disque intervertébral :
Mise au point et évaluation de biomatériaux électrospinnés pour la
régénération de l'*Annulus fibrosus***

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 décembre 2018

Unité de recherche : INSERM, U1229, RMeS Regenerative Medicine and Skeleton

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Esther Potier	Chargé de recherche	Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-articulaires (B2OA) UMR CNRS 7052
Claire Wilhelm	Directeur de recherche	Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC) UMR CNRS 7057

Composition du Jury :

Président :	Hugues Pascal-Moussellard	Professeur des Universités / Praticien Hospitalier - Hôpital Universitaire Pitié Salpêtrière
Dir. de thèse :	Catherine Le Visage	Directeur de Recherche - Université de Nantes, Laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229
Co-dir. de thèse :	Jérôme Guicheux	Directeur de Recherche - Université de Nantes, Laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229
Co-encadrant :	Johann Clouet	Maître de Conférences des Universités / Praticien Hospitalier - Université de Nantes, Laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229

Invité :

Gwenaël Rolin	Ingénieur de recherche	Centre d'Investigation Clinique Inserm CIC-1431 - CHU de Besançon UMR INSERM 1098
---------------	------------------------	--

REMERCIEMENTS

Je tiens, tout d'abord, à remercier M. Pierre Weiss et M. Jérôme Guicheux de m'avoir accueillie il y a maintenant 6 ans au sein du laboratoire LIOAD INSERM UMRS 791, devenu en 2017 le laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229.

Je remercie Mme Catherine Le Visage, ma directrice de thèse, pour son encadrement tout au long de ces trois années. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir donné carte blanche sur ce projet d'avoir su me conseiller et me réorienter aux moments opportuns.

Je remercie également M. Jérôme Guicheux, co-directeur de thèse, pour avoir cru en moi ainsi que pour nos échanges scientifiques toujours plus « challenging » les uns que les autres.

Je remercie, M. Johann Clouet, co-encadrant de ce travail, pour son aide notamment pour la translation de ce projet vers une application *in vivo* et de ses paparazzades durant les implantations.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Mmes Esther Potier et Claire Wilhelm pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs ainsi que M. Hugues Pascale-Moussellard pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur et M. Gwenaél Rolin en tant que membre invité.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du laboratoire RMeS pour leur soutien, leur aide et leur bonne humeur au quotidien. Du fond du cœur un grand merci au quatuor du début : Elodie et les deux Nina (« Nina, Nina, Nina » ♪) ainsi qu'à Mélanie et Leslie pour leur soutien durant les moments difficiles, mais surtout pour tous les moments passés ensemble au labo et en dehors. Aux nombreuses personnes du « bureau des pétasses » avec qui j'ai eu la chance de partager ces 6 dernières années : Bobinette, Cécile, Alex, Lily, Eléonore, Cyrille, Antoine, Louise, Laure, Maeva, Greig, Brian. A tous les membres actuels et anciens du

laboratoire Giulia, Pierre, Boris, Cyril, Vincent, Kévin, Richard, Olivier, Paulette, Guillaume, Michaël, Solenne V., Maxence, Killian, Pauline, Hilel, Audrey S., Audrey F., Kenji, Chaton, Chacha pour leur amitié, leur bonne humeur, pour les délires et nombreux moments passés à l'embuscade (merci Etienne). Mais également un grand merci à Laurent et Sarah (♥), Carole, Anne, Sophie S., Angélique, Solenne T., Pierre W. et ses danses endiablées irlandaises, Aurore (que j'adore taquiner), Thierry, Julie, Maeva, Florent, Joëlle, Paul, Valérie et l'ensemble du laboratoire pour leur aide et les moments de rires partagés et plus particulièrement merci à Gilles (alias Mac Gyver) pour son aide précieuse toute en discrétion et efficacité. A l'ensemble de l'équipe véto pour sa bonne humeur et son aide : Marion, Olivier, Dominique, Stéphane, Patrice, Ingrid, Christian, Gildas, Gwenola.

Merci à mes coupling de cœur dispersés un peu partout dans le monde pour leur soutien et leur amitié sans faille : Elodie et Jérémy, Rachel, Jaclyn, Jérôme, Sarah, Séverine et Beax.

Et enfin, merci du fond du cœur à mon père et ma sœur pour m'avoir supportée pendant ces trois dernières années et bien avant ça également !

PUBLICATIONS

Article de revue

- « *Annulus fibrosus* of the intervertebral disc: from closure and repair to regenerative therapies ».

M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, A. Hamel, E. Bord, S.Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage - (En cours de soumission - Nature Biomedical Engineering)

Article expérimentale

- « *In vitro* and *in vivo* evaluation of an electrospun-aligned micro fibrous implant for *Annulus fibrosus* repair ».

M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, C. Decante, C. Moraru, M. Dutilleul, J. Veziers, J. Lesoeur, D. Dumas, J. Abadie, A. Hamel, E. Bord, S.Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage - (En cours de révision - Biomaterials)

COMMUNICATIONS

Communications orales

- M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, C. Decante, L. Terreaux, C. Moraru, J. Veziers, J. Lesoeur, S. Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage « Design and evaluation of electrospun structured polycaprolactone biomaterials for *Annulus fibrosus* repair ». **Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2018**, Kyoto, Japon.
- M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, C. Decante, L. Terreaux, C. Moraru, J. Veziers, J. Abadie, J. Lesoeur, S. Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage. « Design and evaluation of electrospun structured polycaprolactone biomaterials for *Annulus fibrosus* repair ». **European Orthopaedic Research Society (EORS) 2018**, Galway, Ireland.

Communications affichées

- M. Gluais, J. Clouet, J. Veziers, S.Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage. « Design and evaluation of electrospun structured biomaterials for *Annulus fibrosus* regeneration ». **Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress 2017**, Las Vegas, Nevada, Etats-Unis.
- M. Gluais, J. Clouet, S.Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage. « Design and evaluation of electrospun structured biomaterials for *Annulus fibrosus* regeneration ». **Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress 2018**, Liverpool, Angleterre.
- M. Gluais, L.H. Nguyen, J. Clouet, J. Guicheux, C. Le Visage, S.Y. Chew. « Electrospun nanofibers for intervertebral disc repair ». **Singapore-France Innovation forum 2017**, Singapour, Singapour.

ABREVIATIONS

ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats

AF : Anneau fibreux ou *Annulus fibrosus*

AFM : Microscopie à force atomique

AIS : Anti-Inflammatoire Stéroïdien

AINS : Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

BMP : Bone Morphogenic Protein

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

CF : Chloroforme

CRIP : Centre de Recherche et d'Investigations Précliniques

CSM : Cellules souches mésenchymateuses

DCM : Dichlorométhane

DIV : Disque intervertébral

DMA : Analyses mécaniques dynamiques

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF : Diméthylformamide

EGF : Epidermal growth factor

FDA : Food and Drug Administration

GAG : Glycosaminoglycane

GAP : Growth-Associated Protein

GDF-5 : Growth and Differentiation Factor-5

Ho : Holmium

IDET : Thérapie électrothermique intra-discale

IGF : Insulin-like Growth Factor

IL : Interleukine

iPSC : Cellules souches pluripotentes induites

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MEC : Matrice Extracellulaire

MMP : Matrix Metalloproteinase

Nd : Néodymium

NGF : Neural Growth Factor

NP : Noyau pulpeux ou *Nucleus pulposus*

PCL : Polycaprolactone

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PEEK : Polyétheréthercétone

PEO : Poly(oxyde d'éthylène)

PET : Polyéthylène téréphtalate

PG : Protéoglycanes

PGE₂ : Prostaglandine E₂

PGP : Protein Gene Product

PLA : Acide polylactique

PLGA : Acide poly(lactique-co-glycolique)

PLLA : Acide poly-(L)-lactique

PRP : Plasma riche en plaquettes

PTFE : Polytétrafluoroéthylène

PV : Plateaux Vertébraux

ROP : Ring-Opening Polymerization

SHG : Microscope à génération de second harmonique

Shh : Sonic Hedgehog

SVF : Sérum de veau fœtal

TENS : transcutaneous electrical nerve stimulation

TFE : Trifluoroéthanol

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TNF- α : Tumor Necrosis Factor

UV : Ultraviolet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

vWF ; von Willebrand factor

YAG : Yttrium-aluminium-garnet

ZHI : Zone de haute intensité

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. La colonne vertébrale.....	6
Figure 2. Structure et organisation de la colonne.....	7
Figure 3. Développement embryonnaire de la notochorde	9
Figure 4. Différenciation des somites	10
Figure 5. Morphogenèse embryonnaire du disque intervertébral du mammifère	10
Figure 6. Composition de la matrice extracellulaire du disque intervertébral	11
Figure 7. Matrice extracellulaire (MEC) du disque intervertébral.....	11
Figure 8. Structure d'un Annulus fibrosus (AF)	14
Figure 9. Innervation du disque intervertébral	16
Figure 10. Vascularisation du disque intervertébral.....	18
Figure 11. Illustration des forces subies par le disque intervertébral lors de différents mouvements du corps humain.....	19
Figure 12. Hernie discale postérieure.....	22
Figure 13. Ensemble des facteurs et cascade d'évènements impliqués dans la physiopathologie de la dégénérescence discale	24
Figure 14. Aspect macroscopique des DIV	28
Figure 15. Image IRM (T2) d'un rachis lombaire avec trois DIV à des stades différents	31
Figure 16. Classifications de Modic de la dégénérescence discale basées sur l'IRM.....	32
Figure 17. Classifications de Pfirrmann de la dégénérescence discale basées sur l'IRM.....	33
Figure 18. Procédure lors de la thérapie électrothermique intra-discale (IDET)	39
Figure 19. Procédure lors de la thérapie de coblation par radiofréquence	40
Figure 20. Procédure lors d'une discectomie partielle	42
Figure 21. Arthroplastie et arthrodèse de deux disques intervertébraux lombaires	44
Figure 22 : Prothèses lombaires totales.....	46
Figure 23. Nombre de publications par année (2000-2018).....	59
Figure 24 : Principe d'électrospinning	61
Figure 25 : Organisation en fibres de collagène de différents tissus musculo-squelettiques ...	63
Figure 26. Nombre de publications par année (2000-2018) utilisant le PCL et l'électrospinning comme mots clés pour la recherche documentaire.....	65
Figure 27. Dégradation du PCL	67
Figure 28. Dispositifs médicaux à base de PCL.....	68

Figure 29. Coloration histologique (hématoxyline-eosine-safran) d'un patch externe de PTFE après 1 mois d'implantation chez la brebis	79
Figure 30. Observation de cellules d'AF humain à la surface des membranes de PCL au microscope confocal.....	81
Figure 31. Collecteur composé de deux paires d'électrodes	83
Tableau 1. Comparaison des propriétés mécaniques entre l'AF humain et le NP humain	20

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE LA THESE	1
PARTIE I - LE DISQUE INTERVERTEBRAL : GENERALITES, PHYSIOPATHOLOGIE ET TRAITEMENTS DE LA HERNIE DISCALE	5
1. Le disque intervertébral.....	6
1.1. Généralités	6
1.2. Développement du disque intervertébral	7
1.3. Anatomie et composition	11
1.3.1. Les plateaux vertébraux	12
1.3.2. Le noyau pulpeux (Nucleus pulposus, NP).....	12
1.3.3. L'anneau fibreux (Annulus fibrosus, AF).....	13
1.4. Innervation et vascularisation du DIV	16
1.5. Relation structure-fonction	18
2. Physiopathologie discale	21
2.1. Dégénérescence discale.....	24
2.1.1. Première voie d'induction de la dégénérescence discale : voie « extrinsèque »..	25
2.1.2. Deuxième voie d'induction de la dégénérescence discale : voie « intrinsèque ».	27
2.2. Diagnostic	30
2.3. Modèles animaux	33
2.4. Traitements des douleurs lombaires, dégénérescence et hernie discale.....	34
2.4.1. Traitements non pharmacologiques	34
2.4.2. Traitements pharmacologiques	36
2.4.3. Traitements chirurgicaux	37
2.4.3.1. Annuloplastie.....	38
2.4.3.2. Décompression intra-discale	39
2.4.3.3. Discectomie	41
Discectomie partielle.....	41
Discectomie totale	44
2.4.4. Traitements innovants	47
2.4.4.1. Traitements de la dégénérescence discale	48
Thérapies cellulaires	48
Thérapies via des molécules biologiques	49
Thérapies géniques.....	51
Ingénieries tissulaires.....	51
2.4.4.2. Traitements des lésions au sein de l'AF.....	52

3. Article de revue.....	52
4. Objectifs de la thèse.....	54
PARTIE II – DEVELOPPEMENT D’UN BIOMATERIAU POUR LA REGENERATION DE L’AF	57
1. Rationnel de l’étude.....	58
1.1. Electrospinning.....	59
1.2. Polycaprolactone	64
1.3. Projet de thèse	70
2. Résultats expérimentaux.....	70
3. Article expérimentale	73
PARTIE III – CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	75
Conclusion personnelle.....	85
PARTIE IV – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86

INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE LA THESE

La lombalgie, définie comme une douleur siégeant au niveau lombaire (bas du dos), est un problème de santé publique majeur altérant la qualité de vie des patients en raison des douleurs engendrées¹. Elle peut être classée en lombalgie aiguë (d'une durée inférieure à 6 semaines), subaiguë (entre 6 et 12 semaines) ou chronique (supérieure à 12 semaines). Il s'agit du mal de dos le plus répandu dans les pays industrialisés et il affecte 80% de la population à un moment ou un autre de la vie². La lombalgie a d'importantes répercussions socio-économiques : en France, 30% des arrêts de travail de plus de 6 mois sont liés à une lombalgie et 25% des accidents du travail ont pour motif la lombalgie³. Reconnue comme étant la 3^e cause d'admission en invalidité pour le régime général de la sécurité sociale, la lombalgie engendre de nombreuses dépenses directes ou indirectes (traitements et visites médicales, hospitalisations, pensions d'invalidité...) et coûterait près de 15 milliards d'euros par an à l'assurance maladie^{3,4} (et 253 milliards de dollars par an aux Etats-Unis^{1,5}). Environ 85% de ces dépenses sont générées par les lombalgies dites chroniques ne touchant que 10% des patients³. Dans ce contexte, il apparaît essentiel de prévenir le risque d'évolution vers la chronicité.

Il est estimé que 40% des lombalgies chroniques ont pour origine une dégénérescence discale^{6,7}. Le disque intervertébral (DIV) est un composant fondamental de la colonne vertébrale jouant un rôle essentiel dans la mobilité du rachis. Le DIV est constitué de trois structures : les plateaux vertébraux (PV) recouvrant les vertèbres, une partie centrale gélatineuse, le *Nucleus pulposus* ou noyaux pulpeux (NP) et une partie périphérique fibreuse, l'*Annulus fibrosus* ou anneau fibreux (AF). La fonction principale du DIV est le résultat d'une action coopérative entre le NP et l'AF lui permettant d'absorber et de transmettre les charges le long de la colonne ainsi que de conférer une certaine flexibilité à celle-ci. Toute atteinte structurale de l'un de ces trois tissus a des conséquences sur la biomécanique globale du DIV. Il a été montré que des sollicitations répétitives ou des événements traumatiques peuvent fragiliser le DIV, en particulier aux étages

cervicaux et lombaires de la colonne vertébrale. Il a notamment été montré qu'environ 20% des douleurs lombaires chroniques sont liées à une hernie discale^{8,9}, définie comme la protrusion du NP, à travers l'AF, en dehors du DIV. Certaines de ces hernies conduisent au déversement de matériel du NP dans le canal rachidien pouvant induire la compression d'une racine nerveuse. Ce type de hernie est notamment à l'origine de douleurs dites « projetées », ressenties par les patients au niveau des fessiers et/ou des jambes¹⁰. De plus, les lésions au sein de l'AF sont des voies d'entrée de vaisseaux et terminaisons nerveuses périphériques (néovascularisation et néo-innervation) rendant le DIV lui-même douloureux, il s'agit de douleur dites « discogéniques »¹¹⁻¹⁴. Actuellement, la procédure chirurgicale la plus fréquemment utilisée pour les patients atteints d'une hernie discale est la discectomie partielle, également appelée herniectomy. Cette intervention consiste à enlever la partie herniée du DIV et ainsi décompresser la racine nerveuse impliquée dans la douleur projetée. Bien qu'efficace à court terme, les résultats cliniques à long terme sont plus ou moins satisfaisants. En effet, il a été démontré que les défauts au sein de l'AF, qui n'ont pas été refermés et réparés au cours d'une discectomie partielle, persistent avec le temps de par la capacité de réparation limitée de l'AF¹⁵. Ainsi, la persistance de ces défauts est associée à un risque de 20% de réapparition d'une hernie discale et conduit à une augmentation de 20% de la fréquence d'apparition de la dégénérescence discale comparé à la population générale¹⁶⁻²².

Dans l'ensemble, les lésions structurales de l'AF jouent un rôle majeur dans les douleurs lombaires et sont intimement liées à une dégénérescence discale. Pour ces raisons, le développement de nouvelles approches thérapeutiques d'ingénierie tissulaire s'oriente de plus en plus vers la réparation et la régénération de l'AF. Plus particulièrement, l'utilisation de biomatériaux, qui permettrait, d'une part, un comblement des lésions de l'AF post-opératoire et, d'autre part, une régénération tissulaire de l'AF.

Dans ce contexte, cette thèse a pour objectif, dans un premier temps, de développer à l'aide de la technique d'électrospinning un biomatériau non cellularisé dont la structure reproduit l'organisation fibreuse de l'AF natif. Dans un second temps, la capacité de ce biomatériau à promouvoir une infiltration spontanée de cellules de l'AF, leur orientation et le dépôt d'une matrice extracellulaire orientée, sera testée dans un modèle de culture d'explant d'AF de brebis. Enfin, la stimulation de la régénération de l'AF par ce biomatériau sera évaluée dans un modèle de défaut annulaire induit chez la brebis.

Dans ce mémoire, nous avons souhaité commencer par une présentation générale du DIV : son développement, son anatomie et sa fonction, afin de définir le contexte de cette thèse (Partie I - 1 : Le disque intervertébral). La physiopathologie discale sera ensuite abordée ainsi que les traitements actuels et en devenir (Partie I - 2 : Physiopathologie discale). Une revue de la littérature a été réalisée sur ces thématiques et est actuellement en cours de soumission dans le journal "Nature Biomedical Engineering".

Les résultats expérimentaux seront ensuite présentés dans la Partie II – Développement d'un biomatériau mimant l'organisation 3D de l'AF pour la régénération de ce tissu discale. Cette étude est illustrée par un article scientifique qui est actuellement en cours de révision dans le journal "Biomaterials".

Les parties III – Discussion générale et IV – Conclusions générales et perspectives nous permettront de synthétiser l'ensemble des travaux réalisés durant cette thèse et d'ouvrir vers de nouvelles perspectives de travail.

**PARTIE I - LE DISQUE INTERVERTEBRAL : GENERALITES, PHYSIOPATHOLOGIE
ET TRAITEMENTS DE LA HERNIE DISCALE**

1. Le disque intervertébral

1.1. Généralités

Les disques intervertébraux (DIV) sont situés entre les vertèbres, à partir de la deuxième vertèbre cervicale jusqu'au sacrum (Figure 1). Il y a un total de 23 DIV au sein de la colonne, dont 6 cervicaux, 12 thoraciques et 5 lombaires, occupant 1/3 de la longueur rachidienne totale.

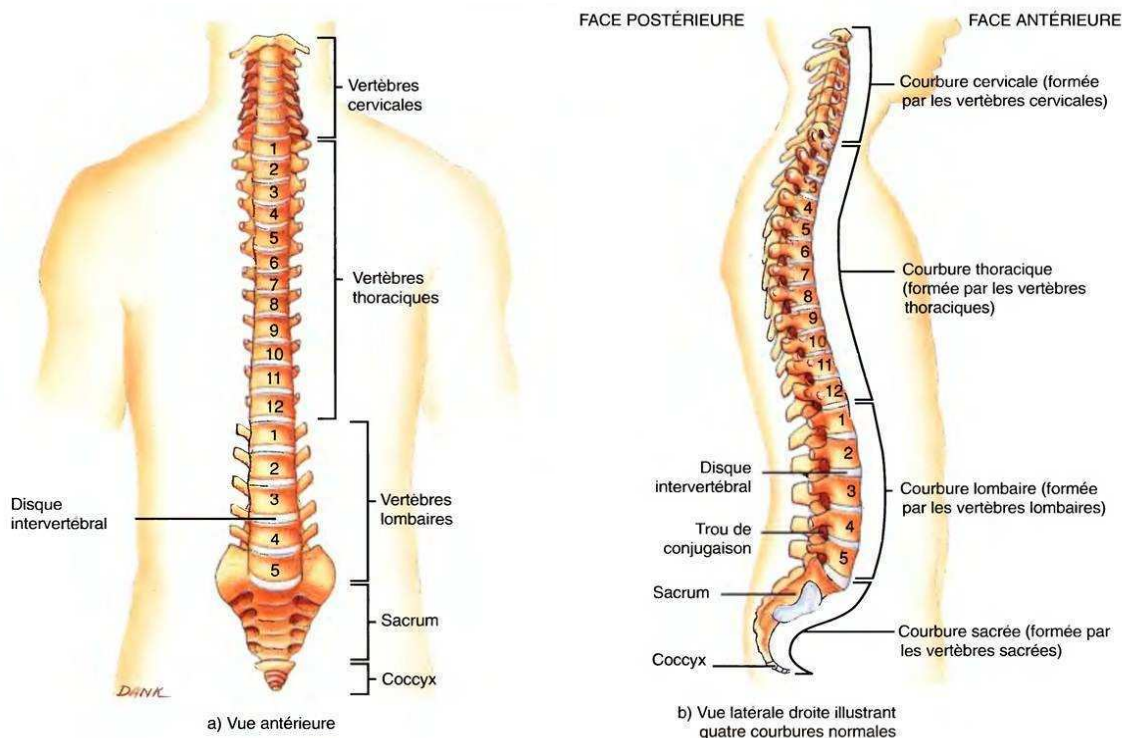


Figure 1. La colonne vertébrale : Vue antérieure et latérale de la colonne vertébrale montrant les régions de celle-ci et les disques intervertébraux (d'après Tortora et al. 2007²³).

La hauteur discale humaine varie entre 7 et 10 mm pour un diamètre moyen de 40 mm mais la taille des DIV varie le long de la colonne vertébrale avec une hauteur maximale au niveau des étages lombaires²⁴. La morphologie des DIV varie également, avec des DIV cervicaux ronds contrairement aux DIV thoraciques et lombaires qui présentent une partie ventrale légèrement plus épaisse et convexe que la partie dorsale, légèrement concave (Figure 2). Alors que la forme et la taille des DIV varient en fonction de l'étage discale, leur structure et leur composition restent les mêmes sur l'ensemble du rachis. Les DIV sont des structures fibrocartilagineuses

reliant de part et d'autre les corps vertébraux adjacents. Ces articulations semi-mobiles participent aux mouvements rachidiens et seront présentées plus amplement dans la partie 1.5. de ce manuscrit. Comme mentionné précédemment, le DIV est constitué de trois structures : les plateaux vertébraux, le *Nucleus pulposus* et l'*Annulus fibrosus*. L'anatomie et la composition de ces structures seront détaillées en partie 1.3. de ce mémoire.

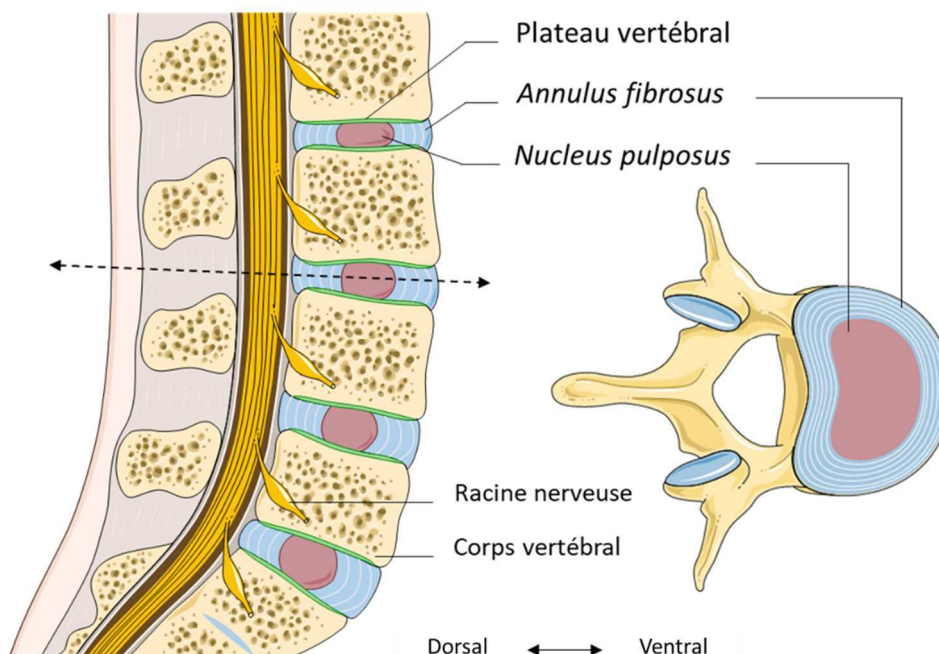


Figure 2. Structure et organisation de la colonne : Vue sagittale d'un rachis lombaire et vue transversale d'un disque intervertébral. Le disque intervertébral se trouve entre les vertèbres et est composé de l'*Annulus fibrosus* entourant le *Nucleus pulposus* au centre et des plateaux cartilagineux de part et d'autre. Les plateaux vertébraux se trouvent de part et d'autre du disque aux extrémités des corps vertébraux (modifié d'après Henry et al. 2014²⁵).

1.2. Développement du disque intervertébral

Avant tout, il est important de noter que les réglementations actuellement en vigueur, concernant l'utilisation de tissus embryonnaires et fœtaux humains à des fins de recherche (article L.1241-5 du code de santé publique - 2004), rendent l'étude du développement embryonnaire du DIV humain difficile. Les événements décrits dans ce paragraphe sont principalement issus des résultats de recherches réalisées chez les rongeurs, le poulet et le poisson zèbre. Cependant, il est important de noter que les quelques études faites chez l'Homme corroborent les observations réalisées dans les espèces citées ci-dessus. Les études des voies de

signalisation et des facteurs de transcription à l'origine de la mise en place du DIV, travaux effectués notamment chez les souris, ne seront pas exposés dans cette thèse.

Au cours de la gastrulation, (jour embryonnaire : 6,5 chez la souris et 13-16 chez l'Homme), la ligne primitive est formée et les trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) sont mis en place. Ces feuillets sont à l'origine du développement de l'ensemble des tissus du squelette, systèmes nerveux, digestif et respiratoire. Au cours du développement embryonnaire, la ligne primitive s'allonge et la partie postérieure donnera naissance au mésoderme extra-embryonnaire tandis que la partie médiane génèrera le mésoderme paraxial, intermédiaire et latéral et la partie antérieure sera à l'origine du mésoderme axial. Les AF et les PV ont pour origine le mésoderme paraxial alors que le NP a pour origine le mésoderme axial, également appelé la notochorde, qui repose sous la plaque neurale et au-dessus du tube digestif.

A la fin de la gastrulation (jour embryonnaire : 7 chez la souris et 20 chez l'Homme), lorsque la ligne primitive a atteint son maximum d'élongation, le nœud devient morphologiquement visible antérieurement à celle-ci²⁶. Le nœud est composé d'une partie dorsale participant à la formation du plancher du tube neural et d'une partie ventrale à l'origine de la formation de la notochorde. Certaines cellules de la partie ventrale du nœud s'intercalent au sein de l'endoderme pour former la plaque notochordale (Figure 3.b). La plaque notochordale va ensuite se détacher de l'endoderme par repliement dorsal pour former la notochorde, en forme de tige en position médiane dans l'embryon (Figure 3.d et e) (jour embryonnaire : 9 chez la souris et 26-30 chez l'Homme). Il a été observé par la suite (jour embryonnaire : 13,5 chez la souris et 44-48 chez l'Homme) que les cellules de la notochorde disparaissent progressivement dans les régions à l'origine des futurs corps vertébraux alors qu'elles s'accumulent au niveau des futurs NP^{27,28} (Figure 5). Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la transformation de la notochorde en NP restent encore peu connus aujourd'hui et font actuellement l'objet de recherches en embryologie ²⁹⁻³¹.

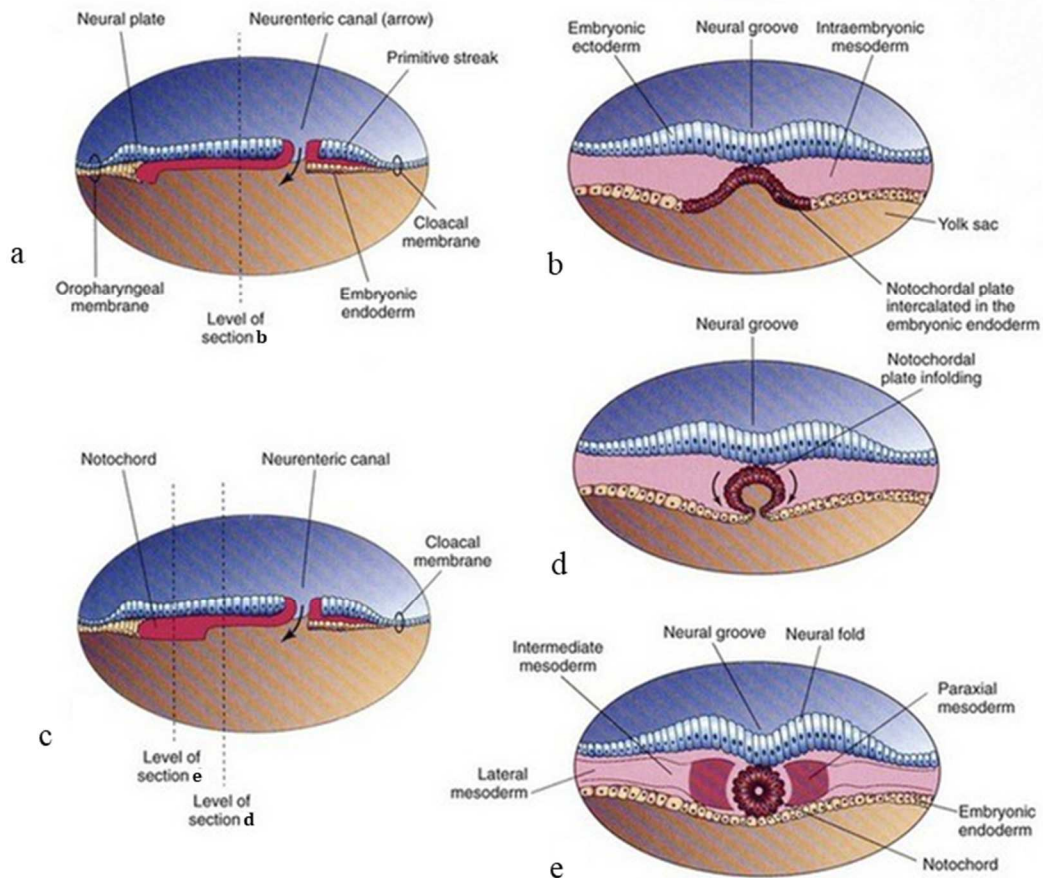


Figure 3. Développement embryonnaire de la notochorde : (a, c) Section médiane d'un embryon et (b, d et e) Sections transverses dans différentes zones de l'embryon (d'après Moore 1998³²).

La formation du squelette axial commence, lorsque le mésoderme paraxial se segmente pour former les somites, il s'agit de la somitogenèse (jour embryonnaire : 8 chez la souris et 19-21 chez l'Homme). Les somites sont des structures transitoires, de part et d'autre du tube neural et de la notochorde, à l'origine de l'organisation segmentée de l'embryon. Sous l'action de facteurs tels que Sonic hedgehog (Shh) et Noggin, sécrétés par la notochorde, les cellules des somites en position ventro-médiane vont subir une différenciation en sclérotome³³⁻³⁵ (Figure 4). Les cellules du sclérotome vont alors migrer autour de la notochorde et former des métamères avec différents niveaux de condensation³⁶. Les zones peu condensées formeront les corps vertébraux tandis que les zones fortement condensées seront à l'origine des AF (Figure 5).

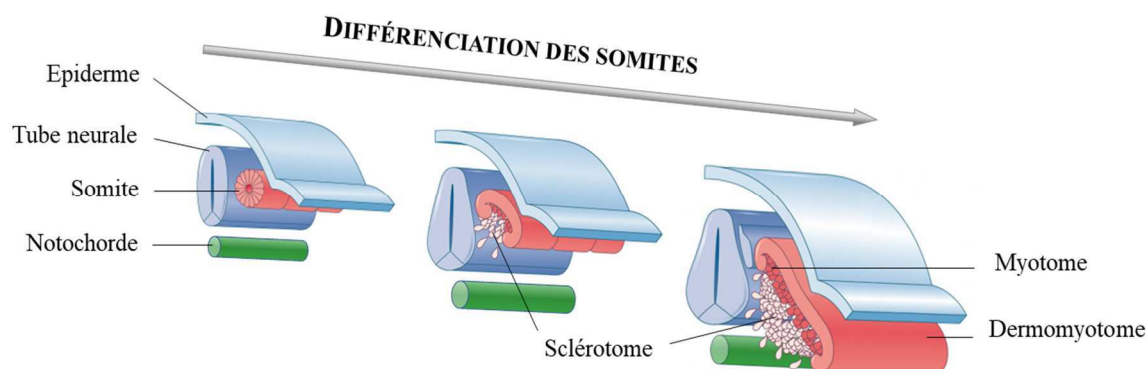


Figure 4. Différenciation des somites : Les somites, de part et d'autre de la notochorde et du tube neural se différencient et donnent naissance au dermomyotome dorsalement, au myotome et au sclérotome ventralement. Ce dernier va migrer autour de la notochorde (modifié d'après Gilbert et al. 2006³⁷).

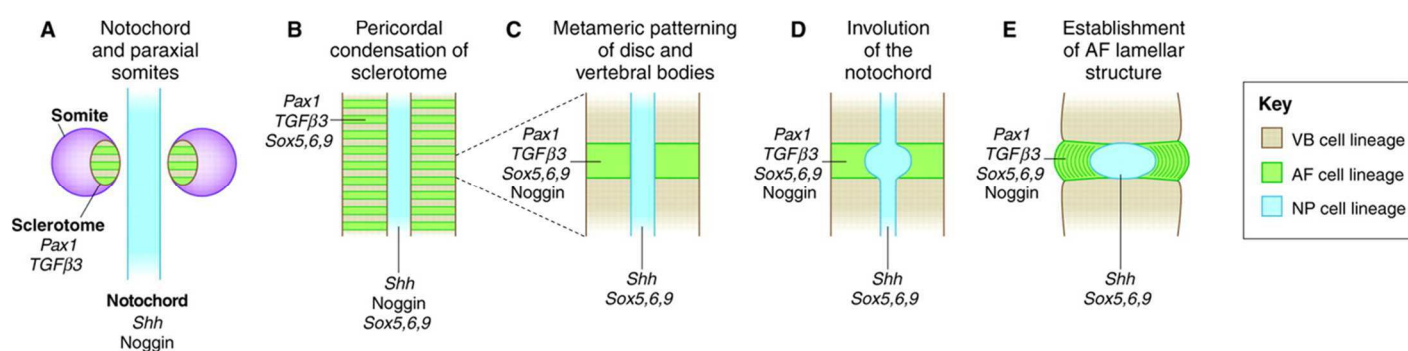


Figure 5. Morphogenèse embryonnaire du disque intervertébral du mammifère.(A) Paire de somites, contenant des cellules de sclérotome, de part et d'autre de la notochorde, (B) et (C) Migration et condensation des cellules du sclérotome autour de la notochorde, et formation des métamères avec des régions plus condensées (vertes) et moins condensées (brunes) qui donneront naissance aux DIV et aux vertèbres, respectivement, (D) La notochorde régresse dans les régions des futurs corps vertébraux tandis que les cellules de notochorde s'accumulent au niveau des futurs NP, (E) Les structures de base du disque sont établies et les cellules d'AF adoptent des orientations et des alignements qui sont précurseurs de la future structure lamellaire (d'après Smith et al. 2011).

Les zones plus condensées vont évoluer en structure fibrocartilagineuse dans laquelle les cellules du sclérotome s'allongent et s'organisent en cercles concentriques autour de la notochorde. Cet allongement cellulaire concentrique, médié par les fibres de stress comme les fibres d'actine, guide le dépôt d'une MEC orientée qui va, à terme, permettre la formation d'une structure tissulaire hautement organisée^{34,38-40}. Dans l'AF mature, deux régions distinctes sont visibles, l'AF interne « chondrogénique » et l'AF externe « collagénique » dont la composition sera donnée en partie 1.3 de ce mémoire.

1.3. Anatomie et composition

Le DIV est majoritairement composé d'eau (70 à 80 %), de 1% de cellules et de protéines de la MEC (protéoglycanes (PG) et collagènes majoritairement) (Figure 6 et 7)³⁹.

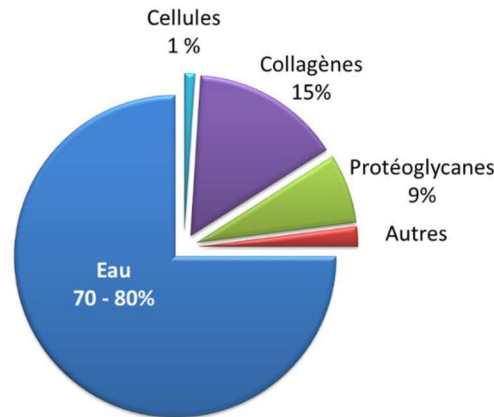


Figure 6. Composition de la matrice extracellulaire du disque intervertébral (modifié d'après Shapiro et al. ³⁹)

La MEC permet le maintien de la structure du DIV, les PG lui conférant sa capacité de résistance à la compression, alors que les fibres de collagène permettent la résistance aux tensions mécaniques (Figure 7). Les cellules permettent, elles, le maintien de la balance entre anabolisme et catabolisme au sein du DIV. Cependant la composition du DIV n'est pas homogène et varie grandement entre les 3 régions du DIV et est plus amplement décrite ci-dessous.

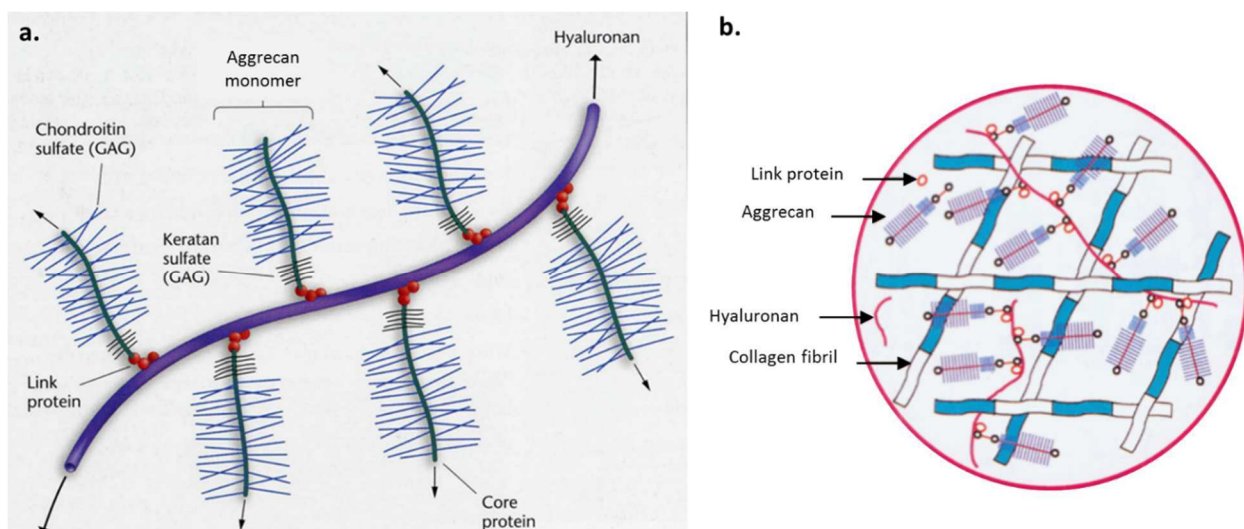


Figure 7. Matrice extracellulaire (MEC) du disque intervertébral. a. Agrégat d'agrécan, protéoglycane (PG) majoritaire de la MEC du disque intervertébral. Les monomères d'agrécan sont associés à une chaîne d'acide hyaluronique, b. MEC composée d'un réseau dense de fibres de collagène entourée de substance fondamentale composée essentiellement d'eau et de PG (d'après Gauci et al. 2017 et Kiani et al. 2002^{41,42}).

1.3.1. Les plateaux vertébraux

Les PV sont des cartilages hyalins couvrant 90% des corps vertébraux supérieur et inférieur des DIV. Ils sont fermement attachés à l'AF *via* les fibres de collagène de l'AF interne^{43,44}. Les PV humains ont une épaisseur variant le long du DIV, de 0,6 mm dans la région adjacente du NP à une épaisseur de 1 mm dans la région entourant l'AF⁴⁵⁻⁴⁷. Les PV contiennent des chondrocytes qui synthétisent des fibres de collagène de type II (60 à 80% de la masse sèche) orientées horizontalement par rapport aux corps vertébraux, des protéoglycanes (17% de la masse sèche) et d'eau (58% masse humide)³⁹. Cependant la proportion des composants des PV présente un gradient sur le plan transversal du DIV, avec une concentration élevée en fibres de collagène en périphérie, près de l'AF, et une concentration faible au centre, près du NP. Les PG et l'eau suivent une tendance inverse. A travers les PV, le collagène est plus dense dans la région juxtaposant les corps vertébraux tandis que le tissu en périphérie du NP est plus riche en PG et eau.

En raison de leur composition moléculaire et de leur organisation structurale, les PV jouent un rôle essentiel pour le DIV. D'une part, les fibres de collagène périphériques constituent une barrière solide qui empêche la protrusion du NP à ce niveau, d'autre part, le centre gélatineux hautement hydraté va faciliter la diffusion de molécules. En effet, les PV contiennent des vaisseaux sanguins vertébraux de petit diamètre et vont donc avoir un rôle primordial dans la diffusion de l'oxygène, des nutriments et des déchets au sein du DIV^{44,46}. Ils sont considérés comme étant des membranes semi-perméables présentes entre l'os sous-chondral des vertèbres adjacentes et le DIV^{44-46,48}.

1.3.2. Le noyau pulpeux (Nucleus pulposus, NP)

Le NP est composé majoritairement de protéoglycanes (50% de sa masse sèche), principalement d'agrécan, composés de glycosaminoglycanes (GAG) chargés négativement (chondroïtine sulfate et kératane sulfate) qui attirent les cations (notamment les ions sodiums

positifs) et donc les molécules d'eau par osmose, ce qui rend ce tissu hautement hydraté (~70 - 80% de sa masse humide)^{49,50}. Cette structure isotrope contient une matrice collagénique peu organisée (20% de sa masse sèche) et des fibres d'élastine. Le collagène du NP est majoritairement constitué de fibres de collagène de type II (80% du collagène total), le reste étant d'autres molécules de collagène (types V, VI, IX et XII) associées à la surface des cellules ou aux fibres de collagène de type II⁵¹. Le NP humain adulte contient approximativement 4000 cellules/mm³ et la présence de deux types cellulaires a été observée⁵². A la naissance, le NP est composé majoritairement de cellules notochordales qui ont de larges vacuoles, représentant jusqu'à 25% du volume de la cellule^{53,54}. Il a été montré que ces cellules tendent à disparaître au cours de la croissance au profit d'un autre type de cellules, plus petites, longtemps désignées comme « chondrocyte-like » de par leur phénotype proche des chondrocytes articulaires^{55,56}. De nombreuses études sont actuellement menées pour déterminer l'origine de ces cellules, qui pourraient être nommées « nucléopulpocytes »^{57,58}.

1.3.3. L'anneau fibreux (*Annulus fibrosus*, AF)

L'AF est une structure fibreuse complexe constituée de couches de lamelles concentriques superposées les unes par rapport aux autres s'étendant d'une vertèbre à une autre et enveloppant le NP. Le nombre de lamelles présentes dans l'AF varie entre 15 et 25, avec un nombre plus important dans les DIV lombaires et plus précisément dans les régions ventrales puis latérales des DIV. Les lamelles ont également une épaisseur variable au sein du DIV avec des lamelles plus fines au niveau dorsal et un diamètre diminuant graduellement de l'extérieur vers l'intérieur du DIV (de 400 µm à 200 µm chez l'homme)⁵⁹. Les lamelles sont majoritairement composées de fibres de collagène, ces fibres sont non seulement parallèles entre elles mais elles sont également orientées à un angle de 60° par rapport à l'axe de la colonne vertébrale (i.e. 30° par rapport au plan transverse du disque). Cette inclinaison alterne de droite à gauche entre chaque lamelle⁶⁰⁻⁶³ (Figure 8). Cependant, cet angle n'est pas constant: l'inclinaison des fibres

varie selon la région du DIV et au sein même d'une lamelle. Il a notamment été observé que l'orientation majoritaire des fibres de collagène varie de 60° à l'extérieur du DIV à 45° à l'intérieur, près du NP^{61,63-65}. Le collagène peut être trouvé sous forme de fibrilles de diamètre de 0,1 à 0,2 μm ou en association de fibrilles formant des fibres de collagène dont le diamètre varie de 0,5 à 3 μm ^{59,61}. Les fibres de l'AF présentes en périphérie du DIV sont directement ancrées dans les corps vertébraux supérieurs et inférieurs, tandis que les fibres de la partie la plus interne de l'AF, proche du NP sont insérées au niveau des PV, au centre du DIV.

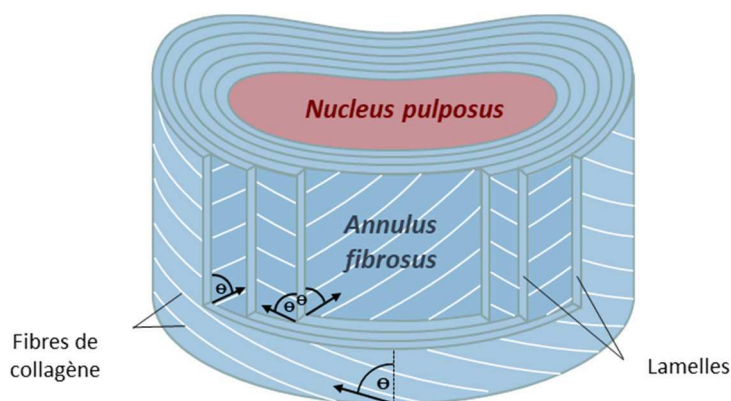


Figure 8. Structure d'un Annulus fibrosus (AF): L'AF est composé de couches de lamelles concentriques superposées les unes aux autres. Chaque lamelle contient des fibres de collagène alignées et orientées à un angle de 60° par rapport à l'axe vertical de la colonne vertébrale (modifié d'après Postacchini et al. 2012⁶⁶).

La morphologie et la composition de l'AF varient graduellement de l'extérieur vers l'intérieur, ce qui permet de dissocier deux régions : l'AF externe très organisé et l'AF interne peu organisé. La quantité de collagène diminue progressivement de 75% - 90% dans l'AF externe (masse sèche) à 40% - 75% dans l'AF interne (masse sèche)⁶⁴. De même, le type de collagène varie au sein de l'AF avec du collagène de type I majoritairement retrouvé dans l'AF externe et du collagène de type II retrouvé dans l'AF interne⁴⁹. D'autres types de collagène sont présents au sein de l'AF, dont les collagènes de types III, V, VI, IX et XI, mais en bien plus faible quantité^{44,51}. Les collagènes de types III et VI sont localisés au niveau de la matrice péri-cellulaire et seraient impliqués dans l'attachement des cellules à la matrice environnante et donc à la cohésion du tissu⁶⁷⁻⁷⁰. Le collagène de type V s'associe avec le collagène de type I en hétéro-fibrilles tandis que les collagènes de types IX et XI, eux, s'associent aux fibrilles de

collagène de type II. Bien que leurs rôles soient peu connus, ces collagènes semblent être impliqués dans le contrôle du diamètre des fibrilles de collagène auxquelles ils sont associés⁵¹.

Les PG sont également un composant de la MEC de l'AF représentant 10% dans l'AF externe (masse sèche) et 20% - 35% dans l'AF interne (masse sèche)^{44, 64,71}. Ces PG sont constitués d'une protéine axiale (« core protein ») attachée de manière covalente à plusieurs chaînes polysaccharidiques de GAG. Tout comme le NP, les deux GAG majoritairement présents dans l'AF sont le chondroïtine sulfate et le kératane sulfate. Les PG présents dans l'AF sont trouvés soit sous forme d'« agrégats » représentés majoritairement par l'agrécan et dans une plus faible mesure par le versicane, soit sous forme de petits PG interstitiels tels que la décorine, le biglycane, la fibromoduline et le lumican⁷²⁻⁷⁸. Les petits PG se lient au collagène, à la fibronectine et aux facteurs de croissance et sont donc impliqués dans l'homéostasie de la MEC de l'AF. Les PG larges, eux, sont constitués de GAG négativement chargés qui interagissent avec l'eau et jouent un rôle majeur dans l'état d'hydratation de l'AF avec 65 - 75% d'eau dans l'AF externe et 75 - 80% dans l'AF interne^{50,64}.

Enfin, la MEC de l'AF contient de nombreuses protéines qui ne sont ni du collagène, ni des PG et qui ont un rôle structurel important. Ces protéines, telles que l'élastine, la fibronectine, la laminine et la lubricine, ont un rôle dans la régulation de l'assemblage de la MEC, la reconnaissance et l'adhésion cellulaire et auraient un rôle dans la dégradation et la réparation du DIV⁵¹. Plus précisément, l'élastine, qui représente 2% de la masse sèche de l'AF, est présente à l'intérieur des lamelles de l'AF et est orientée dans la même direction que les fibres de collagène. Cette protéine fibrillaire serait impliquée dans le maintien de l'organisation du collagène et donc contribuerait aux propriétés mécaniques de l'AF⁷⁹. Elle est également retrouvée dans les zones inter-lamellaires où elle permettrait de connecter les lamelles entre elles^{63,80,81}.

Au sein de l'AF la cellularité est évaluée à environ 9000 cellules/mm³.⁸² Au niveau de l'AF externe les cellules sont allongées, fusiformes avec de nombreux filaments d'actine, synthétisant majoritairement du collagène de type I, classiquement assimilées à des cellules fibroblastiques. Ces cellules sont alignées entre elles et sont orientées parallèlement aux fibres de collagène. Au niveau de l'AF interne, la morphologie est différente, avec des cellules plus sphériques et moins allongées, synthétisant majoritairement du collagène de type II et de l'agrécan, proches des chondrocytes^{60,83}.

L'organisation lamellaire de l'AF combinée à l'orientation des fibres de collagène, variant entre chaque lamelle, confère à ce tissu une structure idéale pour résister aux charges complexes multidirectionnelles subies par le DIV au cours des mouvements du corps (cf. paragraphe 1.5).

1.4. Innervation et vascularisation du DIV

Le DIV est souvent décrit comme avasculaire et non innervé. Cependant, le DIV possède tout de même un système limité d'irrigation vasculaire et nerveux de surface, au niveau des PV et des premières lamelles de l'AF externe. Les prolongements nerveux sont des extensions du nerf sinu-vertébral, du rameau ventral du nerf rachidien et des chaînes sympathiques latérales (Figure 9)^{44,84,85}.

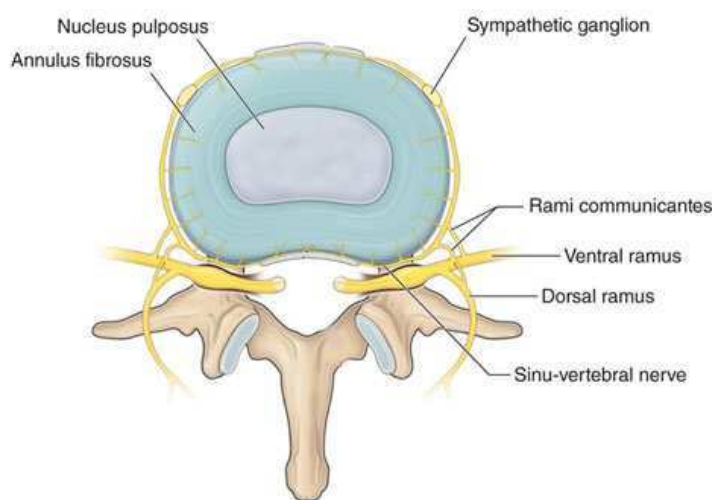


Figure 9. Innervation du disque intervertébral : Coupe transversale d'un disque intervertébral montrant les prolongements nerveux présents dans les couches superficielles de l'Annulus fibrosus provenant du nerf sinu-vertébral, du rameau ventral du nerf rachidien et des chaînes sympathiques latérales (d'après Pope et al. 2015⁸⁶).

Dans un DIV sain, des vaisseaux sanguins sont trouvés dans les PV et en périphérie de l'AF (Figure 10). Ces capillaires sanguins, qui proviennent de l'artère segmentaire, elle-même issue de l'aorte, s'insèrent dans les corps vertébraux, les irriguent et dont certains prolongements traversent l'os sous-chondral et sont la voie majeure d'approvisionnement en nutriments du DIV^{48, 82,87}.

Du fait du nombre limité de vaisseaux sanguins présents uniquement dans les couches superficielles du DIV, les conditions environnementales du DIV sont particulières avec une quantité limitée de nutriments et une faible tension en oxygène. La concentration en oxygène au niveau du NP est très faible avec seulement 1% d'oxygène au centre du NP, contre 2 à 7% dans le cartilage^{48, 82,87,88}. Les cellules du DIV, pouvant se retrouver à une distance de 8 mm du vaisseau sanguin le plus proche, vont avoir un métabolisme orienté vers la voie de la glycolyse anaérobie, qui est dépendante de la disponibilité du glucose et qui produit une grande quantité d'acide lactique⁸⁹⁻⁹¹. L'environnement discal est donc légèrement acide, avec un pH compris entre 6,9 et 7,2 en fonction de la concentration en acide lactique^{7, 44,45,82}. Afin de maintenir un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme, il est nécessaire que l'apport de glucose et l'élimination de l'acide lactique se fassent correctement au niveau de ces capillaires sanguins. Au cours de la journée, les mouvements du corps vont permettre la diffusion de ces composants au travers des membranes perméables que sont les PV et le DIV⁹²⁻⁹⁴.

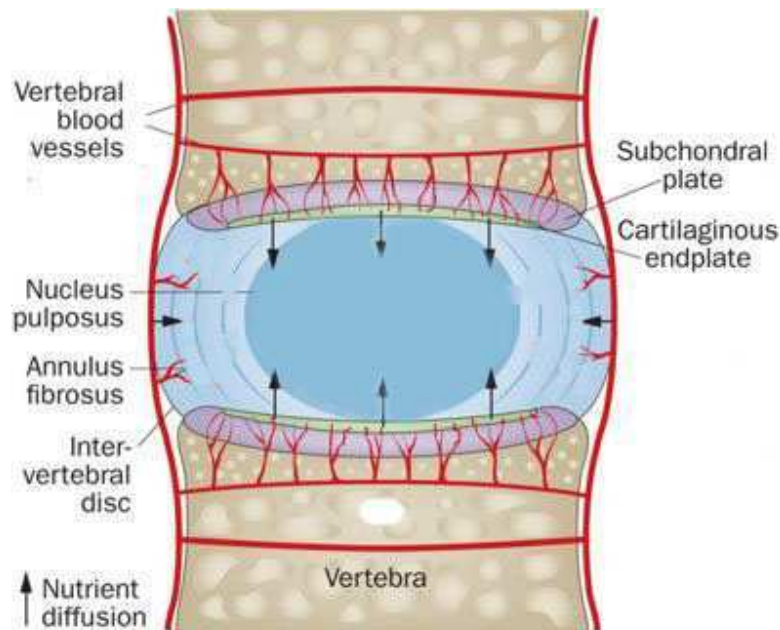


Figure 10. Vascularisation du disque intervertébral : Coupe coronale d'un disque montrant les prolongements vasculaires présents dans les couches superficielles de l'Annulus fibrosus et dans les plateaux vertébraux. Les nutriments (oxygène et glucose) et les déchets métaboliques (acide lactique) diffusent à travers ces capillaires (d'après Huang et al. 2014⁹⁵).

1.5. Relation structure-fonction

Les DIV sont des articulations semi-mobiles qui ont pour fonction d'absorber et de transmettre les contraintes mécaniques (charges pondérales et musculaires) d'une vertèbre à l'autre le long de la colonne. Ils confèrent également une certaine mobilité à la colonne vertébrale en lui permettant rotation, flexion et extension. C'est grâce à la composition et à la structure complexe du DIV que la colonne vertébrale peut se « mouvoir » et remplir correctement ses fonctions de maintien et de mobilité du corps.

En position neutre, le DIV est soumis à une compression axiale (verticale) (Figure 11). Cette compression est principalement absorbée par le NP. En effet, grâce à la présence de nombreux PG, le NP est une structure hautement hydratée, capable de se déformer et d'absorber des forces de compression élevées. Lors d'une compression axiale du DIV, sa hauteur va diminuer, le NP pressurisé va alors s'étendre vers l'extérieur, donc vers l'AF. L'AF lui va tenter de contenir la protubérance du NP et les fibres de collagène le composant vont être soumises à des forces de

tension. Le confinement du NP va induire une augmentation de la pression au sein de celui-ci, de 0,06 MPa en position allongée à 2,30 MPa lors du port d'une charge de 20 kg avec un dos arrondi^{39,96,97}.

Lors des mouvements de types torsion, extension et flexion, l'AF va également subir de nombreuses forces dans de multiples directions, dont des forces de tension, de compression et de cisaillement. Tout comme les tendons et les ligaments, l'AF est caractérisé par un comportement viscoélastique et anisotrope (i.e. dépendant de la direction), de par la présence de collagène, d'élastine et d'eau^{98,99}. Lorsqu'une tension est appliquée sur l'AF, les fibres de collagènes soumises à la tension, initialement ondulées et non étirées, vont progressivement s'orienter en direction de la force appliquée et commencer à s'étendre. C'est ainsi que les fibres vont « emmagasiner » une partie de la charge subie par le DIV et transmettre le reste aux vertèbres adjacentes. La présence d'élastine va permettre aux fibres de collagène de revenir à leur état initial lorsque la tension n'est plus appliquée. L'énergie qui était emmagasinée par les fibres de l'AF est alors retransmise au NP qui va lui aussi retourner à son état initial et restaurer la hauteur discale^{60, 79,100}.

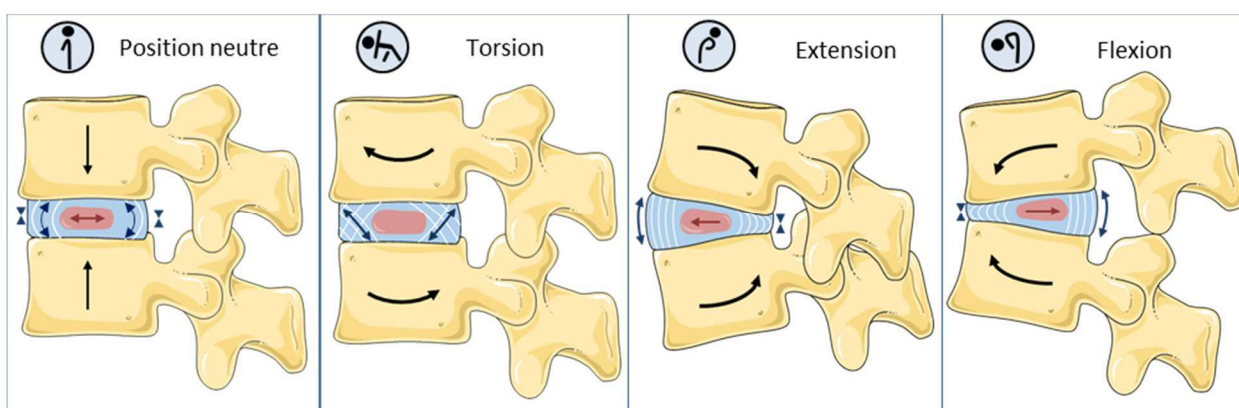


Figure 11. Illustration des forces subies par le disque intervertébral lors de différents mouvements du corps humain : En position neutre (debout) le DIV subit une compression verticale, sa hauteur diminue et le Nucleus pulposus (en rouge) va s'étendre radialement créant une tension circonférentielle sur les fibres de collagène de l'Annulus fibrosus (en bleu). Lors des torsion, extension et flexion, les fibres de collagène au sein de l'AF vont être soumises à des forces de tension dans la zone étirée, le NP, lui, va légèrement s'éloigner de la zone de compression, augmentant la tension exercée sur l'AF.

Le DIV va donc être soumis à de nombreuses forces de compression, de cisaillement et de tension et sa structure complexe va lui permettre de résister à ces forces et de stabiliser la colonne vertébrale. Plusieurs revues ont rassemblé l'ensemble des données de la littérature dans lesquelles les propriétés mécaniques des DIV humains étaient testées^{64,101-103}. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 1 :

Module (MPa)	AF	NP
Compression	0,4 à 2,5	0,3 à 1,0
Cisaillement	0,10 à 0,28	0,007 à 0,05
Tension	11 à 29	0,04

Tableau 1. Comparaison des propriétés mécaniques de l'AF humain et du NP humain.

Cependant, les propriétés mécaniques de l'AF varient entre l'AF externe et l'AF interne. Notamment, le module de tension de l'AF externe a été rapporté comme étant 5 fois supérieur à celui de l'AF interne.

Ceci s'explique par les composants présents dans ces deux régions avec :

- le collagène de type I dans l'AF externe, connu pour ses propriétés de résistance aux tensions et retrouvé dans les structures extensibles tels que les tendons et les ligaments;
- l'agrécan et le collagène de type II qui confèrent à l'AF interne moins de résistance aux tensions, mais adapté pour résister aux compressions.

Enfin, l'anisotropie de l'AF est due à l'inclinaison des fibres de collagène à 30° par rapport au plan transversal du DIV lui permettant d'avoir une grande résistance aux tensions dans la direction circonférentielle, afin de résister à toute protrusion du NP. Le module de tension circonférentielle a été évalué comme étant 10 à 20 fois supérieur à celui mesuré dans la direction axiale.

La structure complexe du DIV lui permet de stabiliser la colonne vertébrale tout en lui conférant une certaine mobilité. Toute déstabilisation d'une des trois régions du DIV altèrera donc ses fonctions et aura un impact majeur sur la stabilité de la colonne vertébrale dans son ensemble.

2. Physiopathologie discale

Le DIV est une articulation semi-mobile qui est soumise au vieillissement, à la dégénérescence et à des traumatismes tout au long de la vie. Comprendre les maladies discales est une étape importante pour réussir à développer des thérapies efficaces pour le traitement de la lombalgie d'origine discogénique. La lombalgie se définit comme une douleur ou une gêne fonctionnelle, située entre la douzième côte et le pli fessier, associée ou non à des irradiations dans les membres inférieurs¹⁰⁴. Comme expliqué précédemment, cette douleur a des impacts économiques et sociaux non négligeables et est qualifiée de chronique lorsqu'elle persiste plus de 3 mois. Cette douleur est localisée le plus souvent au niveau des étages lombaires L4-L5 et L5-S1 et a des origines multifactorielles pouvant impliquer les vertèbres, les ligaments, les muscles ou encore les DIV. Dans ce mémoire, nous nous intéresserons aux lombalgies d'origine discale. Il est estimé que 40% des lombalgies chroniques ont pour origine une dégénérescence discale^{6,7}. La dégénérescence discale est associée cliniquement à des radiculopathies (atteintes des racines nerveuses), des sténoses lombaires (rétrécissement du canal rachidien) ou à des hernies (saillie d'une portion du NP, à travers une déchirure dans l'AF, vers l'extérieur du DIV) pouvant engendrer des symptômes tels que des engourdissement, des faiblesses et douleurs dans les membres inférieurs et au niveau des DIV, voir des troubles sphinctériens, dans les conditions médicalement grave appelées syndrome de la queue de cheval^{105,106}.

Faisant partie intégrante du DIV, l'AF est impliqué dans de nombreuses maladies en rapport avec la dégénérescence. Il y a un lien direct entre les défauts au sein de l'AF et la dégénérescence du NP et la calcification des PV, mais à ce jour, il n'est pas clairement établi

quel phénomène apparaît en premier. A l'heure actuelle, deux voies d'induction de la dégénérescence discale sont rapportées dans la littérature :

- 1^{ère} voie d'induction : Sous l'action de mouvements répétitifs et/ou traumatiques, le NP hautement pressurisé va percer l'AF et se déverser à l'extérieur du DIV, créant ainsi une hernie discale (Figure 12). Le tissu hernié et l'AF lésé vont alors initier le processus de dégénérescence discale, avec un déséquilibre entre les facteurs anaboliques et cataboliques, qui va s'étendre à l'ensemble du DIV.
- 2^{ème} voie d'induction : Des facteurs génétiques ou environnementaux sont à l'origine d'une dégénérescence au sein du NP et des PV se traduisant, ici encore, par un déséquilibre entre les processus anaboliques et cataboliques au sein du DIV. Ceci conduit à la dégradation de la MEC et à un déclin progressif de l'hydratation des NP. Cette diminution de l'hydratation entraîne une perte des propriétés mécaniques du NP et exerce des charges anormales sur l'AF conduisant à l'apparition de lésions et, à terme, à des hernies discales. Ces hernies discales vont alors contribuer à l'accélération de la dégénérescence déjà présente dans ce DIV.

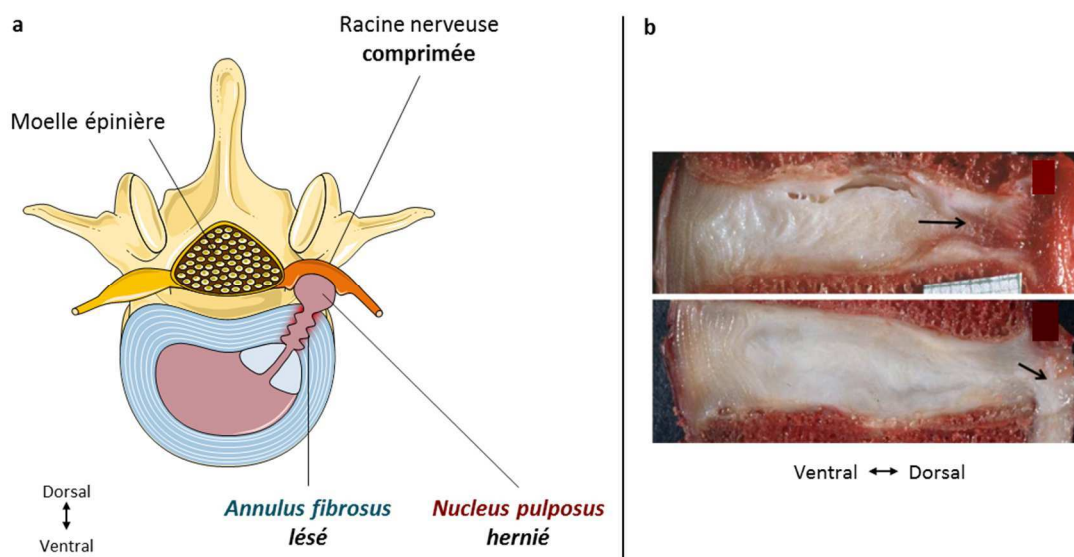


Figure 12. Hernie discale postérieure. a) Une hernie discale est une protrusion du Nucleus pulposus à travers une lésion radiale de l'Annulus fibrosus vers l'extérieur du disque intervertébral. Ce tissu peut venir compresser une racine nerveuse au niveau du canal rachidien et engendrer de vives douleurs projetées (notamment au niveau des membres inférieurs). b) Section sagittale médiane de disque intervertébral hernié en position dorsale (flèches) (d'après Adams 2015¹⁰⁷)

Ainsi, la dégénérescence discale implique un cercle « vicieux » de défaillances structurales et fonctionnelles. Les deux voies d'induction décrites ici ne s'excluent pas l'une l'autre et sont étroitement liées par les hernies discales (Figure 13). Ces hernies et donc les lésions au sein de l'AF seront, soit un facteur initiant la dégénérescence, soit un facteur accélérant une dégénérescence préalablement présente dans les autres régions du DIV. Il est donc indispensable d'aborder dans ce mémoire le thème de la dégénérescence discale en parallèle des lésions de l'AF car les deux maladies sont étroitement liées.

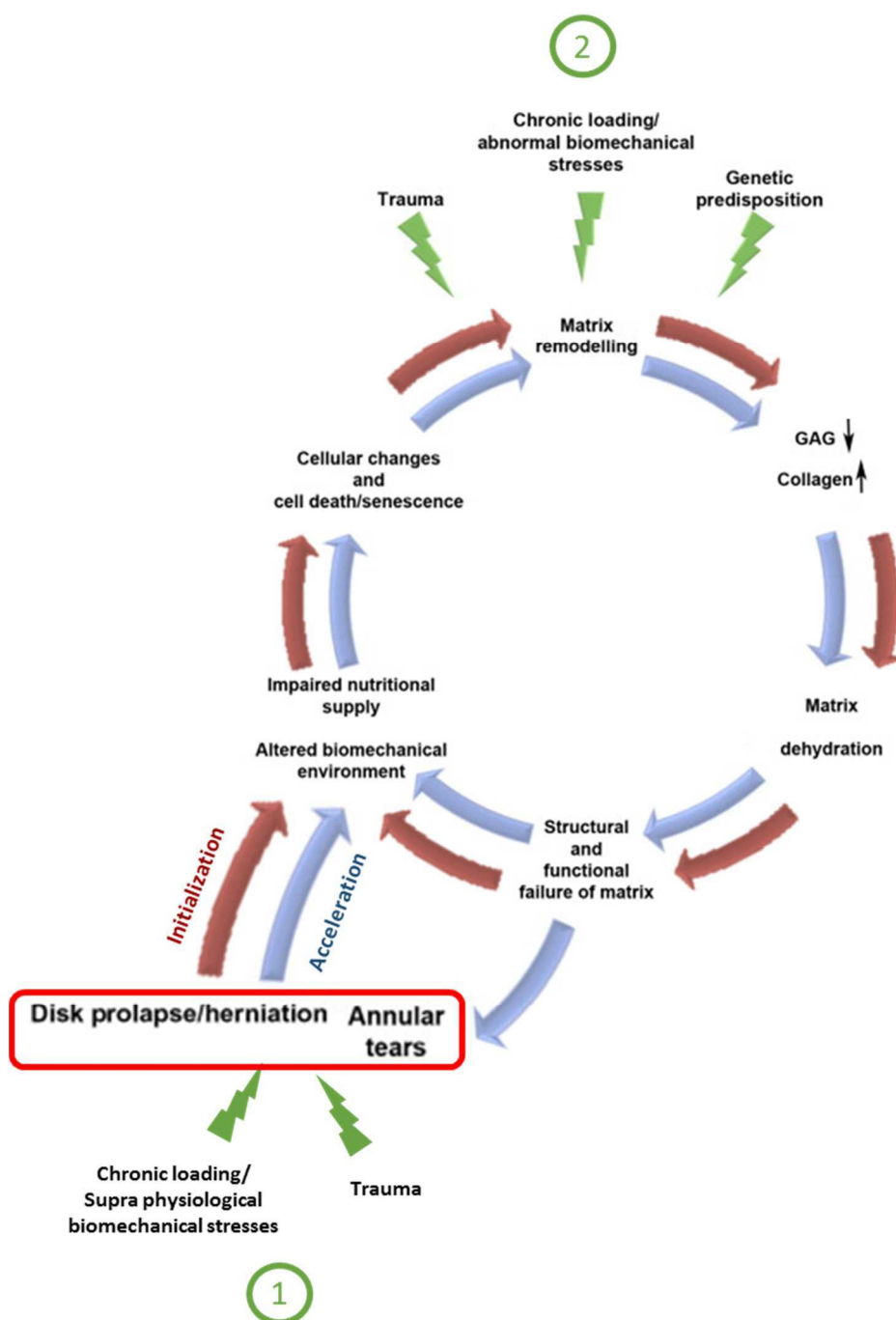


Figure 13. Ensemble des facteurs et cascade d'évènements impliqués dans la physiopathologie de la dégénérescence discale. La dégénérescence discale implique un cercle « vicieux » de défaillances structurales et fonctionnelles pouvant provenir : (1) D'évènements traumatiques à l'origine de hernies discales, qui initient alors l'entrée dans le cercle vicieux de la dégénérescence discale : voie rouge ; (2) D'évènements traumatiques, génétiques et/ou environnementaux induisant un déséquilibre entre l'anabolisme et le catabolisme au sein du disque intervertébral, conduisant à terme à des hernies discales : voie bleue. Ces hernies discales peuvent accélérer le processus de dégénérescence discale déjà en place (schéma modifié d'après Bergknut et al.¹⁰⁸).

2.1. Dégénérescence discale

De nombreuses revues scientifiques ont été consacrées à l'analyse des différents événements qui se produisent pendant la dégénérescence discale^{5, 57,109,110}. Nous établirons ici un rapport

succinct des changements fondamentaux qui se produisent dans la DIV au cours de la dégénérescence. La dégénérescence discale est définie comme un vieillissement « accéléré » des DIV^{105,111,112}. En effet, la dégénérescence discale et le vieillissement dit « normal » des DIV induisent des changements morphologiques et phénotypiques extrêmement similaires. La distinction entre ces deux phénomènes se fait en tenant compte du délai d'apparition de ces modifications structurales et cellulaires.

Comme expliqué précédemment, deux voies d'induction de la dégénérescence existent et seront plus amplement décrites ci-dessous.

2.1.1. Première voie d'induction de la dégénérescence discale : voie « extrinsèque »

De nombreuses études *ex vivo* ont démontré que l'application répétitive de forces de faible amplitude ou l'application d'une seule charge de haute intensité peuvent induire une hernie discale¹¹³⁻¹¹⁷. Elle peut être asymptomatique (lorsqu'elle ne comprime pas de racine nerveuse) ou induire des douleurs lors de la compression d'une racine nerveuse dans le canal rachidien pouvant irradier le long des membres inférieurs¹⁰. La hernie discale se localise dans toutes les régions de la colonne vertébrale (lombaire, thoracique et cervicale). Toutefois, les hernies discales thoraciques sont très rares, alors que les hernies lombaires sont les plus fréquentes en raison de leur position au bas de la colonne vertébrale où les charges et les efforts musculaires sont maximaux. Les hernies discales sont les plus souvent observées dorsalement ce qui peut facilement s'expliquer par la présence de lamelles plus fines et moins nombreuses dans cette région de l'AF, créant ainsi une zone de faiblesse (cf. paragraphe 1.3.3). Les déchirures au sein de l'AF persistent dans le temps en raison de la capacité de guérison intrinsèque limitée de ce tissu. En effet, il a été démontré que l'AF n'a que des processus d'autoréparation mineurs se produisant de manière centripète. Ceci entraîne la formation d'un tissu fibreux désorganisé aux

propriétés mécaniques faibles au niveau de l'AF externe et laisse la région interne de l'AF non réparée¹⁵.

Il a été établi que les DIV non dégénérés et fortement hydratés de patients d'âge compris entre 30 et 50 ans sont plus sujets aux hernies que les DIV dégénérés de patients plus âgés^{39,118,119}. Ceci est corroboré par les nombreux modèles animaux qui induisent une dégénérescence discale par création d'un défaut au sein de l'AF¹²⁰. Ces modèles ont été testés sur une grande variété d'espèces animales, comprenant les souris, rats, lapins, chiens, cochons et moutons. Ils ont montré que la perturbation structurelle de l'AF induit la fuite de NP à l'extérieur du DIV et active une cascade d'évènements médiés par les cellules, conduisant à une augmentation du catabolisme dans l'AF et le NP, à l'origine de la dégénérescence discale dans son ensemble¹²¹⁻¹²⁴. Cette cascade d'évènements rejoint celle existant dans la deuxième voie d'induction (Figure 13) et sera discutée dans le paragraphe suivant.

En parallèle de la dégénérescence, il a été montré que la hernie d'une partie du NP entraîne une diminution de la hauteur discale et une concentration des stress mécaniques au sein de l'AF. Suite à l'exposition à ces contraintes mécaniques fortes, les cellules de l'AF vont produire des cytokines pro-inflammatoires tel que le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), provoquant l'expression de facteurs tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et certaines interleukines (IL-6 et IL-8)¹²⁵⁻¹²⁷. Ces médiateurs inflammatoires vont induire la néo-vascularisation et la néo-innervation de la lésion qui sont à l'origine des douleurs au sein du DIV dites « discogéniques »^{11,12,128,129}.

Dans ce type de maladies, il apparaît donc primordial de réparer l'AF dès l'apparition des hernies discales afin d'inhiber l'initiation de la dégénérescence discale et l'invasion neurale de la lésion.

2.1.2. Deuxième voie d'induction de la dégénérescence discale : voie « intrinsèque »

Les facteurs psychologiques (stress, dépression), mécaniques (expositions professionnelles aux vibrations, port de charges lourdes) ou environnementaux (obésité, tabagisme) ont souvent été décrits comme étant des facteurs de risques importants pour la dégénérescence discale¹³⁰⁻¹³². Cependant, il a été montré récemment que les facteurs génétiques ont un rôle majeur et leur implication dans la dégénérescence discale pourrait être à hauteur de 75%. En effet, l'atteinte de gènes codant pour des protéines constitutives de la MEC (agrécan, collagène de types I, IX et XI), pour des interleukines (IL-1, IL-6), pour des enzymes de dégradation de la MEC (matrix metalloproteinases (MMP) MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9) ou pour la vitamine D, a été corrélée avec une augmentation du risque de dégénérescence discale¹³³⁻¹³⁹. L'ensemble de ces données épidémiologiques suggère une origine multigénique de la dégénérescence discale associée à des facteurs de risque non-génétiques précédemment cités dans ce paragraphe.

Les premiers signes de dégénérescence discale peuvent apparaître très tôt, dès l'âge de 20 ans et se traduisent par une cascade d'évènements médiés par les cellules discales^{47,140}. D'un point de vue tissulaire, la dégénérescence des plateaux vertébraux se traduit par une calcification de ce tissu cartilagineux¹⁴¹. Le transport des nutriments, en particulier de l'oxygène et du glucose, dans le DIV est alors inhibé et l'accumulation de déchets tel que l'acide lactique induit une acidification de l'environnement discale. En parallèle de ces modifications tissulaires, le stress cellulaire augmente et modifie le comportement des cellules. En effet, la diminution des apports nutritifs, conjointement à une accumulation des métabolites, induit des réponses cellulaires telles que l'apoptose, la sénescence prématurée ou l'autophagie¹⁴²⁻¹⁴⁹. Ceci se traduit par une diminution du nombre de cellules et de leur activité métabolique, ce qui entraîne une réduction de la synthèse de la MEC¹⁵⁰⁻¹⁵². Ceci se manifeste aussi par une augmentation du processus de catabolisme au sein du NP avec une surexpression de cytokines pro-inflammatoires tels que IL-

1 et $\text{TNF-}\alpha$. Ces cytokines augmentent le catabolisme de la MEC *via* la stimulation de l'expression d'enzymes cataboliques comme les MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -13 et -14) les ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats, ADAMTS-1, -4, -5, -9 et -15) et d'autres médiateurs inflammatoires (IL-6, IL-8 et prostaglandine E_2 (PGE_2)), ainsi que du VEGF et du Neural Growth Factor (NGF)¹⁵³⁻¹⁵⁸.

Cette augmentation des processus cataboliques au sein du NP va notamment induire une dégradation des protéoglycanes et par conséquent une diminution de la pression osmotique du NP, donc de la teneur en eau de celui-ci. Ceci s'accompagne d'une augmentation du collagène de type I au sein du NP au détriment du collagène de type II, ce qui est à l'origine de la perte de l'aspect gélatineux du NP sain au profit d'un aspect plus fibreux d'un NP dégénéré et rend la frontière anatomique entre le NP et l'AF de moins en moins précise (Figure 14).

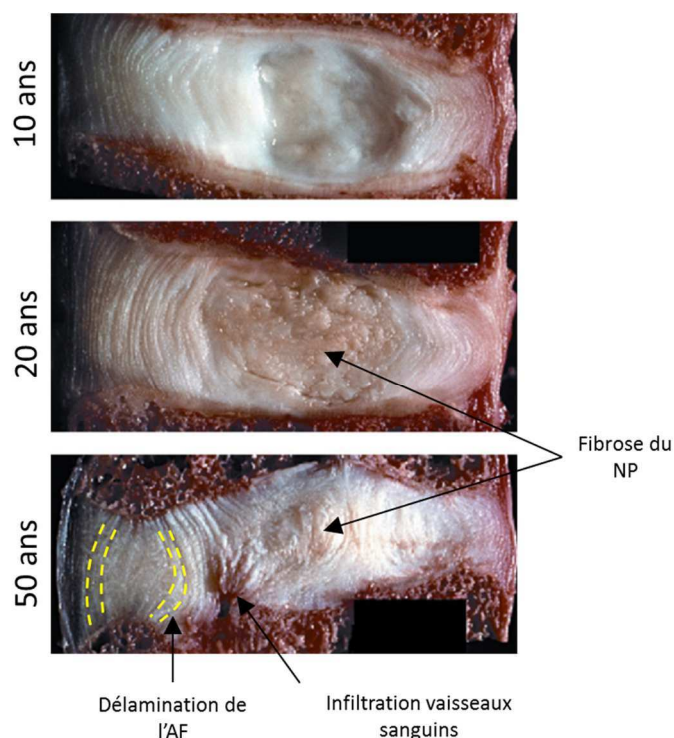


Figure 14. Aspect macroscopique des DIV au cours de la dégénérescence discale en fonction de l'âge. Le NP se déshydrate progressivement et perd son aspect blanc gélatineux au profit d'un aspect fibreux. L'AF se délamine (pointillés jaune) et des lésions apparaissent, envahies par des vaisseaux sanguins et des prolongements nerveux (d'après Adams et al.¹⁵⁹)

Les changements structuraux et osmotiques du NP induisent une perte des propriétés mécaniques de ce tissu, notamment sa capacité de résistance aux forces de compression. Les charges, normalement absorbées par le NP, sont alors transférées à l'AF qui va résister directement à la compression. Or, comme expliqué précédemment, l'AF présente des propriétés de résistance aux forces de tractions supérieures aux forces de compression. L'application directe de forces de compression, sans action coopérative du NP, va affecter négativement la structure de l'AF ainsi que le métabolisme des cellules de ce tissu¹⁶⁰. Ainsi, dans le cas d'une dégénérescence discale initiée dans les PV et le NP, les lamelles de l'AF deviennent progressivement irrégulières et plus épaisses et des délaminations apparaissent, accompagnées de ruptures ou fissures plus ou moins étendues au sein de l'AF allant, dans certains cas, jusqu'à la hernie discale¹⁶¹. Comme expliqué précédemment, dans les hernies discales d'origine traumatique, les cellules de l'AF vont à leur tour produire des cytokines pro-inflammatoires et une néo-vascularisation ainsi qu'une néo-innervation de la lésion vont apparaître.

Dans ce type de maladies, où la hernie discale apparaît au sein d'un DIV d'ores et déjà dégénéré, une réparation de l'AF et un traitement de la hernie seule seront insuffisants et un traitement de la dégénérescence est indispensable. De nombreuses thérapies sont actuellement développées pour le traitement de la dégénérescence et ont fait l'objet de nombreuses revues. Ces thérapies seront brièvement abordées dans ce mémoire (cf. paragraphe 2.4). Cependant, dans le cadre de notre étude, nous ne nous plaçons pas dans le contexte du traitement de la dégénérescence discale, mais nous avons pour but sa prévention. Nous nous plaçons donc dans le traitement de la première voie d'induction présentée ici. Notre thérapie pourra cependant intervenir dans le cas du traitement la deuxième voie d'induction car il peut être envisagé de l'utiliser en association avec les nombreuses stratégies de traitement de la dégénérescence discale actuellement développées (exemple : thérapie cellulaire combiné avec des biomatériaux).

2.2. Diagnostic

Afin de proposer des traitements adéquats aux patients, un diagnostic et donc une caractérisation du stade de dégénérescence sont indispensables afin d'orienter le choix du praticien. Dans un premier temps, une première évaluation clinique du patient est réalisée par le médecin. Cette prise en charge initiale repose avant tout sur un interrogatoire précis s'attachant notamment à recueillir l'historique documentant l'apparition et la progression des symptômes (anamnèse). L'interrogatoire doit aussi s'attacher à évaluer les conséquences de ces symptômes sur la vie quotidienne, sociale, professionnelle, en incluant les possibles conséquences anxieuses et/ou dépressives¹⁶².

L'examen clinique doit être rigoureux. En plus de l'examen de la douleur discogénique, le praticien s'attardera à rechercher la présence ou non d'une compression radiculaire. En cas de hernie discale, une manœuvre de Lasègue permet de mettre en évidence une compression d'origine discale des racines nerveuses au niveau des disques lombaires L4-L5 ou L5-S1.

Des tests complémentaires d'imageries peuvent alors être réalisés afin de diagnostiquer des lombalgies symptomatiques. Ces tests incluent :

- La radiographie du rachis (face/profil) qui peut être utilisée pour éliminer d'autres causes possibles de douleur notamment des lésions osseuses. Cette technique d'imagerie permet une analyse de critères indirects de la dégénérescence discale et des hernies par l'observation de la hauteur discale et d'éventuelles calcifications du DIV ou du tissu hernié. La radiographie est un examen peu coûteux, très peu invasif et permet de détecter les dégénérescences discales avancées;
- Le scanner qui permet d'évaluer la morphologie du DIV et d'apprécier sa densité. Cette technique permet également d'observer la hauteur discale et les calcifications intra-discales. C'est un outil de diagnostic sensible et non-invasif ;

- L'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permet, par visualisation d'un contraste important, d'avoir une vue détaillée des tissus mous et ainsi de différencier le tissu discal sain du tissu dégénéré. Deux pondérations du signal, T1 et T2, permettent d'estimer les modifications au niveau des plateaux vertébraux et l'état d'hydratation du DIV, respectivement. Ainsi, en cas de dégénérescence, la perte d'hydratation se traduit par une perte du signal en T2. Les hernies discales au sein d'un DIV bien hydraté peuvent être visualisées par la présence d'un signal en T2 relativement intense, on parle de « zone de haute intensité » (ZHI) (Figure 15).



Figure 15. Image IRM (T2) d'un rachis lombaire avec trois DIV à des stades différents : L3/L4 : disque sain avec un signal hyper-intense blanc au centre, L4/L5 : signal intermédiaire avec un disque gris et une distinction entre NP et AF difficile, présence de protubérance dorsale, L5/Sacrum : signal intermédiaire avec un disque gris, une hauteur discale diminuée et présence d'une zone de haute intensité en position dorsale du DIV correspondant à une hernie discale (d'après Mayfield Clinic & Spine Institute¹⁶³).

- La discographie qui peut être réalisée en injectant un produit de contraste dans un DIV suivie d'une tomodensitométrie / IRM, permet de déterminer des anomalies et d'évaluer la douleur. C'est un examen qui analyse de manière très précise l'état du NP et de l'AF. Cependant il est important de noter que cette technique, plus sensible pour la détection de déchirures annulaires, est plus invasive et peut en fait exacerber les dommages (injection trans-annulaire du produit de contraste induisant des lésions au sein de l'AF, possible toxicité du produit de contraste ...) ¹⁸.

Ces analyses, notamment les images IRM, ont permis de mettre en place plusieurs classifications de la dégénérescence discale, notamment celle de Modic et de Pfirrmann. La classification de Modic, existant depuis 20 ans, repose sur l'analyse conjointe des images IRM en T1 et T2 et permet la distinction de 3 stades de dégénérescence discale (Figure 16)¹⁶⁴ ainsi que la distinction des patients symptomatiques et asymptomatiques. La classification de Pfirrmann, plus récent (2001), repose sur l'analyse du signal T2 et permet la distinction de 5 stades de dégénérescence discale (Figure 17)^{165,166}.

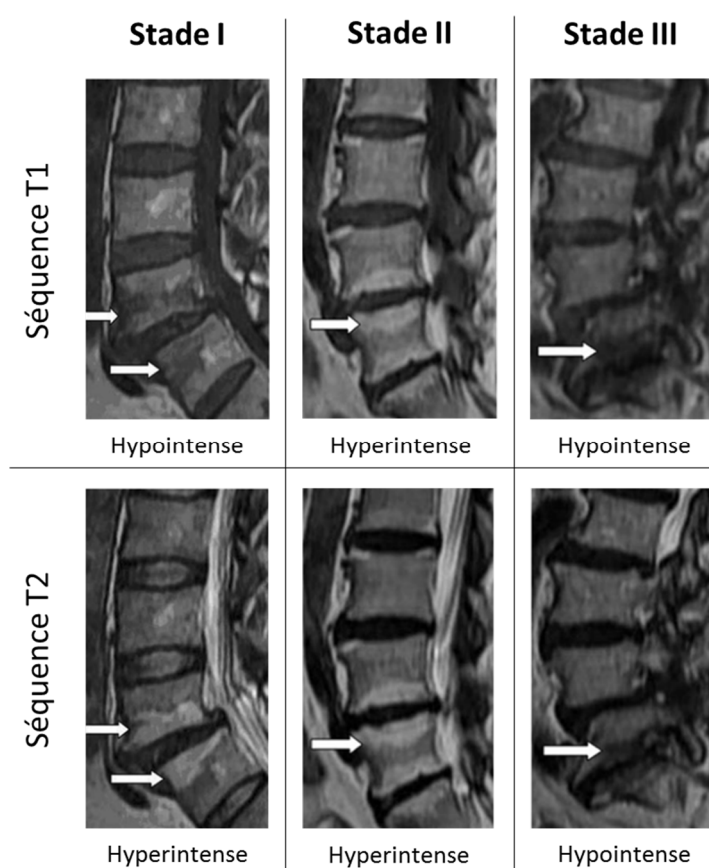


Figure 16. Classifications de Modic de la dégénérescence discale basées sur l'IRM. Les différents signaux hypointenses et hyperintenses (flèches) en séquences T1 et T2 permettent de distinguer 3 stades (d'après Zhang et al. 2008¹⁶⁷)

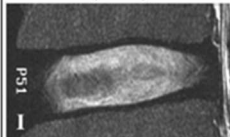
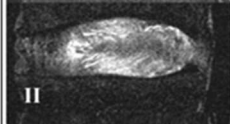
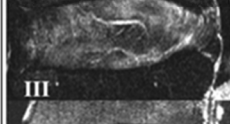
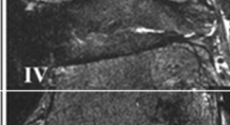
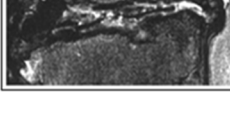
Grade de Pfirrmann (IRM)	Grade	Structure	Distinction AF/NP	Intensité du signal	Hauteur discale
	I	Homogène blanche brillante	Nette	Hyper-intense	Normale
	II	Inhomogène ± barres horizontales	Nette	Hyper-intense	Normale
	III	Inhomogène gris	Difficile	Intermédiaire	Normale à légèrement diminuée
	IV	Inhomogène gris à noir	Impossible	Intermédiaire à hypo-intense	Normale à modérément diminuée
	V	Inhomogène noir	Impossible	Hypo-intense	Nulle

Figure 17. Classifications de Pfirrmann de la dégénérescence discale basées sur l'IRM. (d'après Pfirrmann et al., 2001¹⁶⁵ et Zhang et al., 2011¹⁶⁸)

L'ensemble des techniques d'imagerie permet donc d'évaluer la maladie à l'origine des douleurs ressenties par le patient afin d'établir une prise en charge thérapeutique adaptée.

2.3. Modèles animaux

L'utilisation de modèles animaux est primordiale pour la compréhension de la dégénérescence discale ainsi que l'évaluation de nouvelles thérapies. Deux grandes catégories de modèles animaux sont couramment décrites comprenant les modèles spontanés et les modèles induits¹²⁰. Les modèles spontanés comprennent les animaux qui, comme les humains, développent spontanément une dégénérescence en relation directe avec le vieillissement, une altération génétique ou des conditions spécifiques de reproduction. Les modèles induits expérimentalement sont subdivisés en modèles basés sur des lésions mécaniques ou structurelles (altérations directes du DIV au moyen de blessures, d'inflammations ou de lésions chimiques). La durée et l'ampleur de la dégénérescence des DIV diffèrent fortement en fonction de la méthode d'induction. Il est donc primordial de choisir un modèle d'induction adapté à la

maladie étudiée. Dans le cadre de notre étude, visant à intervenir lors de hernies discales afin de prévenir une dégénérescence discale, l'utilisation d'un modèle d'induction d'une dégénérescence basée sur une lésion au sein de l'AF semble donc la plus adaptée¹²⁰. Les dommages induits au sein de l'AF sont les modèles les plus utilisés et ont été testés sur diverses espèces animales, notamment souris¹²¹, rats¹⁶⁹⁻¹⁷¹, lapins¹⁷²⁻¹⁷⁴, chiens¹⁷⁵, cochons^{176,177} et moutons¹⁷⁸. Les lésions de l'AF peuvent être induites par un modèle de lacération annulaire utilisant un scalpel, un foret^{169, 176,179-185} ou une blessure plus superficielle avec piqure d'aiguille^{121, 123, 170,171, 173,186,187}. La taille du défaut induit est déterminante pour la vitesse d'apparition de la dégénérescence ; ainsi plus la lésion est grande, plus la dégénérescence est rapide et peut s'apparenter à une hernie discale.

2.4. Traitements des douleurs lombaires, dégénérescence et hernie discale

Comme expliqué précédemment, les hernies discales et la dégénérescence discale sont étroitement liées, les traitements des douleurs lombaires en découlant le sont donc également. Les traitements actuels comprennent des approches non pharmacologiques, pharmacologiques ou chirurgicales, toutes visant à contrôler la douleur et seront détaillés ici. Les approches conventionnelles et symptomatiques (non pharmacologique et pharmacologique) sont proposées en première intention au patient afin de lui permettre de contrôler et de gérer sa douleur le plus rapidement possible.

2.4.1. Traitements non pharmacologiques

L'alitement est le traitement conservateur le plus simple et rationnel pour la hernie discale lombaire. Ses effets bénéfiques sont liés à une diminution de la pression intradiscale grâce à une diminution des mouvements de la colonne vertébrale, du poids exercé sur les DIV et d'une relaxation des muscles paravertébraux. La position assise n'est pas conseillée puisque cette position implique une augmentation de la pression intradiscale et des symptômes radiculaires.

Cependant, le repos au lit n'a pas montré de réel effet bénéfique et la durée optimale de cette modalité thérapeutique est sujet à controverse. De nos jours, le repos au lit est peu recommandé, et doit être de courte durée (3 à 7 jours maximum) si il s'avère nécessaire car l'alitement prolongé pourrait avoir des effets psychologiques et physiques (atrophie musculaire, déconditionnement cardiovasculaire...) indésirables⁶⁶.

La suite de la prise en charge non pharmacologique des hernies discales consiste majoritairement à l'utilisation de physiothérapie^{188,189}. En effet, bien que leur efficacité à long terme n'ait pas été démontrée, l'exercice physique adapté et régulier (yoga, tai-chi, pilates), la réalisation de massages, la balnéothérapie, l'acupuncture et la stimulation électrique transcutanée (TENS) semblent montrer une efficacité antalgique à court terme¹⁹⁰⁻¹⁹². De plus, la rééducation par kinésithérapie et la thérapie par traction peuvent être proposées au patient pour diminuer la pression intradiscale, soulager la douleur, renforcer les muscles à proximité du DIV et donc récupérer une certaine mobilité^{66,189}.

Par ailleurs, une approche « éducative » peut être envisagée. En effet depuis 1970 de nombreuses « école du dos » ont vu le jour, développant diverses approches de la gestion de la douleur. Les médecins et les thérapeutes impliqués dans la prévention ou le traitement de la lombalgie donnent fréquemment des conseils « d'hygiène posturale » ou proposent au patient d'effectuer des stages dans ces « écoles du dos ». Ces approches consisteront à informer le patient des positions corporelles adéquates lors des divers mouvements quotidiens permettant de limiter la participation du dos (verrouillage de la colonne lors d'efforts, utilisation des membres inférieurs lors du port de poids), mais également à conseiller le patient sur le type de couchage, chaussage et ergonomie. L'utilisation de telles techniques permettrait de ralentir la récurrence de la lombalgie cependant, malgré de nombreuses études publiées sur ce sujet, aucune preuve n'a été apportée démontrant l'efficacité de ces mesures sur le traitement de la lombalgie chronique¹⁹³⁻¹⁹⁵.

Enfin, l'obésité est un facteur de risque du développement de la dégénérescence discale, *via* l'augmentation du stress mécanique imposé aux DIV lors de l'ensemble des mouvements du corps, mais a également été montré comme étant un facteur de risque augmentant significativement la prévalence d'une hernie discale lombaire et des récurrence de la hernie¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Une diminution du surpoids peut donc être préconisée.

De manière générale, les traitements conservateurs non pharmacologiques sont souvent sujets à controverse et un ajustement des traitements à chaque patient est nécessaire pour l'obtention de résultats positifs. Dans le cas d'une persévérance des symptômes, les recommandations de l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) insistent sur l'importance d'une prise en charge complète et multidisciplinaire amenant à proposer en parallèle un traitement pharmacologique.

2.4.2. Traitements pharmacologiques

Ces traitements ont pour objectif de soulager la douleur, minimiser la gêne fonctionnelle et améliorer la qualité de vie des patients afin de favoriser leur réinsertion sociale et professionnelle le plus rapidement possible¹⁶². Les traitements pharmacologiques sont basés sur l'utilisation d'antalgiques et d'anti-inflammatoires (AI), qui peuvent être administrés par voie orale, cutanée ou par injection. Dans un premier temps, les antalgiques de niveau 1 et 2, comme le paracétamol, ainsi que les opiacés faibles (tramadol...) sont utilisés. En cas d'échec, l'utilisation d'antalgiques de niveau 3 (opioïdes forts comprenant morphines et dérivés morphiniques) peut être envisagée mais présente des risques et des effets secondaires non négligeables. Enfin, l'utilisation de myorelaxant est envisageable (thiocolchicoside...) mais la durée de traitement ne doit pas excéder 2 semaines¹⁹⁹⁻²⁰¹.

Les antalgiques peuvent alors être utilisés seuls ou en association avec des anti-inflammatoires comme les AI stéroïdiens (AIS) et non stéroïdiens (AINS)^{2,202-205}. L'administration par voie générale de stéroïdes et corticostéroïdes (dexaméthasone,

méthylprednisolone) n'est pas recommandée, il est préférable de les injecter par voie épidurale, directement au niveau de la hernie discale. Ils permettent une action efficace et immédiate en inhibant la sécrétion de substances pro-inflammatoires mais présentent également une activité immunosuppressive^{206,207}. Les AINS (ibuprofène, naproxène...) sont les plus couramment prescrits pour soulager les douleurs lombaires à court terme, cependant, à ce jour, aucune molécule n'a fait preuve d'une efficacité supérieure aux autres à l'intérieur de cette classe médicamenteuse²⁰⁸⁻²¹⁰.

La thérapie pharmacologique semblant démontrer le plus d'efficacité (à court terme) sur les patients atteints d'une hernie discale, est l'injection périodurale de molécules actives directement au niveau de la zone d'inflammation^{2,207}. Cependant, l'utilisation d'infiltrations rachidiennes de corticostéroïdes est un domaine particulièrement controversé du fait d'une injection dans une zone « délicate » (proximité de la moelle épinière, présence de vaisseaux ...) et la nécessité de réaliser des injections répétées pour une efficacité prolongée²⁰⁷.

Cependant, les prises en charge non médicamenteuses et les traitements pharmacologiques ne sont pas toujours suffisantes et certaines douleurs invalidantes persistent. Une prise en charge chirurgicale est alors envisagée.

2.4.3. Traitements chirurgicaux

Pour les cas plus avancés qui se traduisent par des douleurs invalidantes résistantes à tout traitement médical, des déficits moteurs et sensitifs, des approches chirurgicales sont envisagées si les méthodes conservatrices échouent. Ces procédures comprennent des mesures comme l'annuloplastie, la décompression intra-discale, la discectomie d'une partie plus ou moins importante du DIV et peuvent aller jusqu'à l'excision totale du DIV et l'arthroplastie ou l'arthrodèse dans le cas de dégénérescence sévère du DIV.

2.4.3.1. Annuloplastie

Le concept d'annuloplastie est issu de la technique de thérapie électrothermique intra-discale (IDET) décrit par Saal et Saal dans les années 2000 qui implique principalement le chauffage thermique de l'anneau pour dénaturer les fibres de collagène et dénervier les fibres nerveuses annulaires postérieures²¹¹⁻²¹³. En effet, comme expliqué précédemment dans ce mémoire, les lésions au sein de l'AF peuvent être envahies par des terminaisons nerveuses qui vont alors être exposées aux substances inflammatoires synthétisées au cours de la dégénérescence. Cette augmentation des récepteurs à la douleur provoque des douleurs lombaires accrues. L'IDET a donc été développée et consiste à introduire une aiguille de 17G dans le DIV de manière postéro-latérale. Un cathéter de 30 cm avec un embout chauffant flexible est alors introduit dans le DIV par le NP jusqu'à la zone lésée dans l'AF. L'extrémité du cathéter est alors chauffée à 90°C pendant quatre minutes (Figure 18). Le cathéter et l'aiguille sont ensuite retirés. La chaleur produite par le courant électrique va pouvoir renforcer les fibres de collagène, sceller les fissures ainsi que coaguler les nocicepteurs et dénervier l'AF. Cependant, les données relatives à l'efficacité de cette technique pour soulager la douleur lombaire d'origine discale sont modérées et les difficultés techniques lors de la procédure (proximité des racines nerveuses, hernie discale post-IDET) ainsi que le manque de suivi à long terme des patients recevant l'IDET ont conduit à limiter son utilisation^{211,212,214-216}.

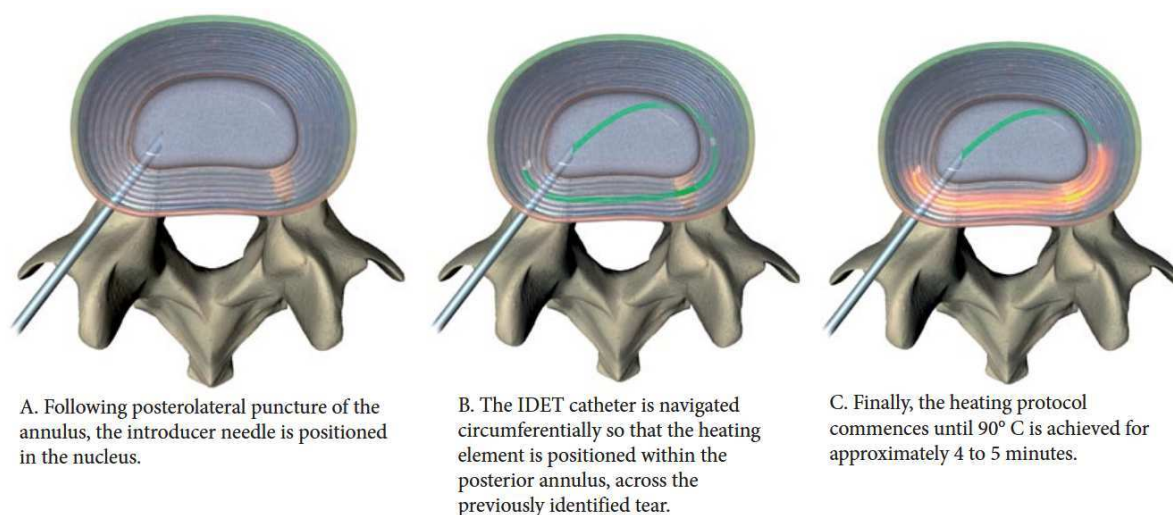


Figure 18. Procédure lors de la thérapie électrothermique intra-discale (IDET) (d'après Kloth et al. 2008²¹⁷)

2.4.3.2. Décompression intra-discale

Dans le cas d'une hernie discale « contenue », les fibres périphériques de l'AF externe sont distendues mais non rompues, la protrusion du NP peut tout de même être associée à une douleur radiculaire. Des techniques de décompression peuvent être utilisées comme la coblation par radiofréquence (nucléoplastie) ou par laser. L'utilisation de radiofréquence pour la décompression d'un DIV a été réalisée pour la première fois en 2000 et consiste à détruire de petites portions du NP en utilisant des ondes radio. Celles-ci vont permettre de relâcher la pression au niveau de l'AF externe, ce qui permettra au DIV de revenir à sa taille normale, décompressant ainsi la racine nerveuse^{214,215,218}. A l'aide d'une canule de 17G introduite par voie postéro-latérale, des ondes de radiofréquence sont appliquées au niveau du NP, provoquant un processus de dissociation moléculaire qui transforme le tissu en gaz, et celui-ci est alors évacué par l'aiguille. Lorsque la canule est retirée, une énergie thermique est générée permettant la destruction des fibres nerveuses le long du canal ainsi tracé (Figure 19). La procédure, réalisée sous contrôle radioscopique, est répétée 5 à 6 fois sur un même DIV créant ainsi plusieurs canaux. La décompression par différents types de laser (yttrium-aluminium-garnet (YAG), neodimyum (Nd) ou holmium (Ho)), s'effectue selon le même protocole. Cette technique est basée sur le principe de conversion de la lumière en chaleur (~100°C) pour

vaporiser une partie du NP, décomprimant ainsi le DIV qui va revenir à son état « normal »²¹⁹. Cependant, une fois encore, peu de données de la littérature sur l'efficacité de ces deux techniques à long-terme sont disponibles à l'heure actuelle²²⁰. La restauration de la biomécanique de la colonne vertébrale et l'introduction répétée de canule au sein du DIV sont discutables car cela pourrait entraîner une dégénérescence plus importante des tissus environnants et des DIV voisins.

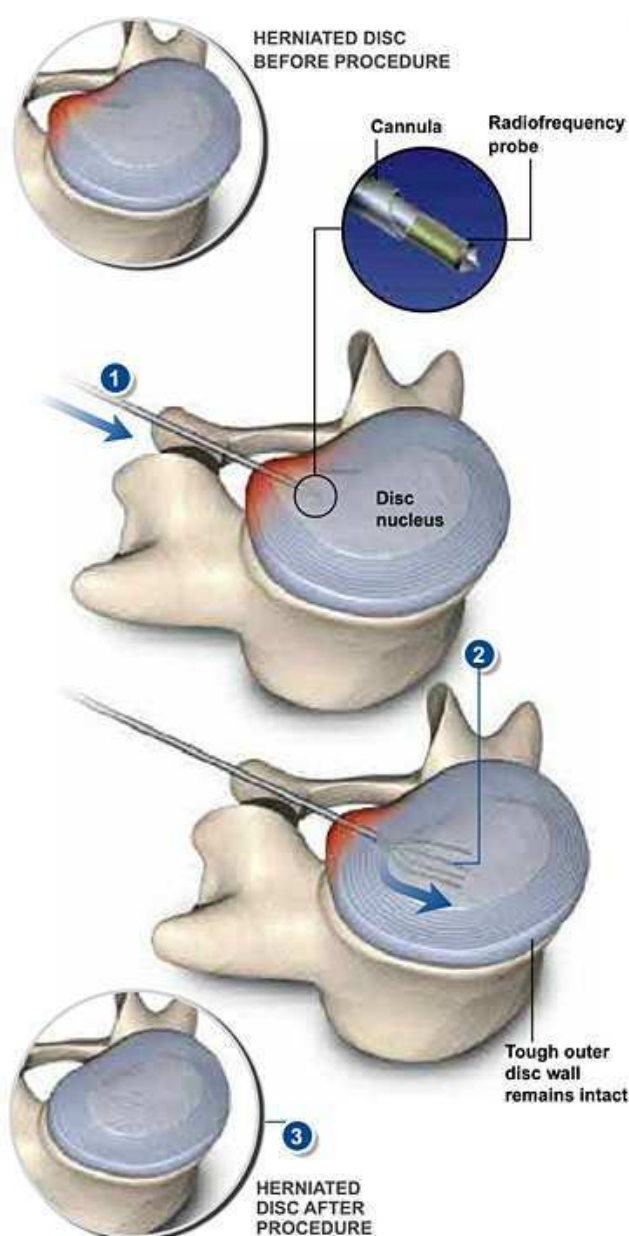


Figure 19. Procédure lors de la thérapie de coblation par radiofréquence. Etape 1 : Insertion d'une canule de 17G par voie postéro-latérale. Etape 2 : des impulsions d'ondes radio sont envoyées pour dissoudre de petites parties du NP. Etape 3 : la pression sur l'AF externe est relâchée, le DIV revient à sa taille normale et le nerf est décomprimé²²¹.

2.4.3.3. Discectomie

Dans le cas d'une hernie discale accompagnée de douleur radiculaire, résistante au traitement médical, la discectomie partielle ou totale, est la technique chirurgicale de référence. Durant cette chirurgie, la racine nerveuse est libérée et le tissu hernié (une partie du NP) ou le DIV endommagé dans son ensemble sont enlevés.

Discectomie partielle

Le principe est d'aborder le DIV du côté de la hernie discale. Après avoir exposé la partie inférieure de la lame sus-jacente et la partie supérieure de la lame sous-jacente de l'espace incriminé, le ligament jaune est incisé et partiellement réséqué. Une laminectomie (ablation de la lame de la vertèbre) partielle peut être nécessaire dans certains cas pour augmenter l'espace de travail. Une discectomie partielle du tissu hernié, également appelée herniectomy, est réalisée à l'aide de pinces (Figure 20). Certains fragments discaux libres qui sont présents à l'extérieur du DIV peuvent également être retirés en plus de la hernie. La microchirurgie à l'aide d'un microscope permettant de limiter la taille des cicatrices cutanées n'est pas utilisée systématiquement puisque les gestes thérapeutiques peuvent se faire à l'œil nu mais elle peut être utile pour aborder des récidives de hernie ou pour certaines voies postéro-latérales^{215,222-}

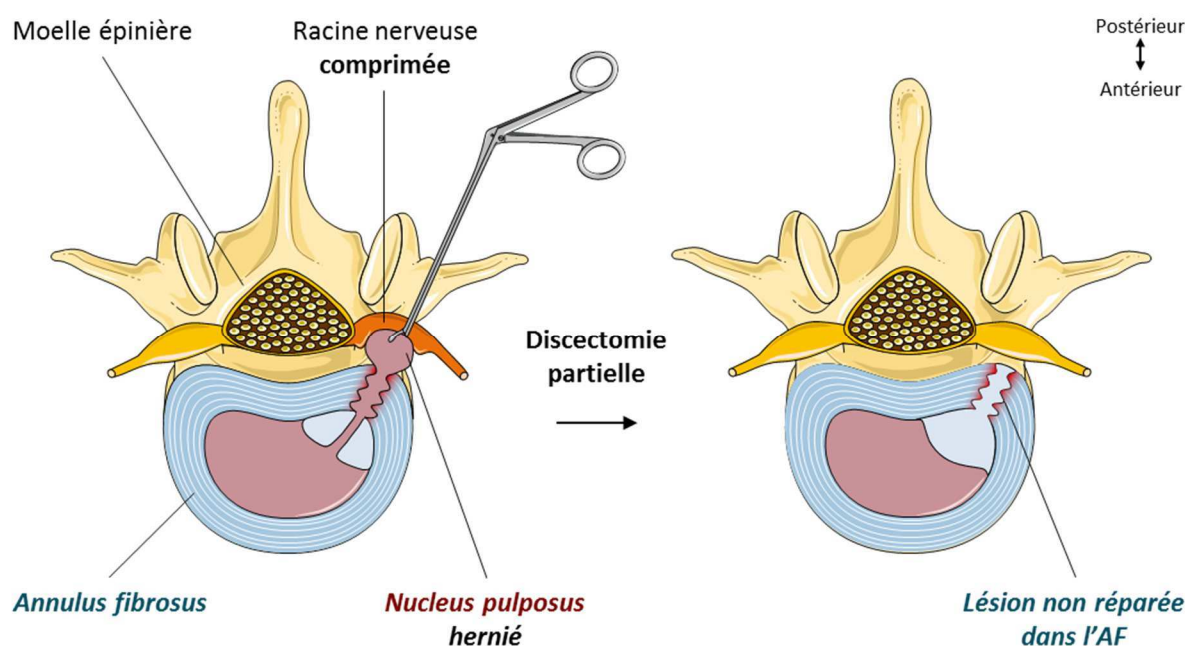


Figure 20. Procédure lors d'une discectomie partielle (d'après Gluais et al. en cours de soumission, voir paragraphe Partie I.3)

Bien que cette procédure donne de bons résultats cliniques concernant la réduction de la douleur radiculaire ressentie par les patients, la lésion de l'AF n'est pas refermée et reste donc une voie d'entrée pour l'envahissement des vaisseaux et des terminaisons nerveuses. Il a été démontré que les déchirures au sein de l'AF persistent dans le temps en raison d'une capacité de guérison de l'AF extrêmement limitée. En effet, la guérison intrinsèque de l'AF se produit principalement à la frontière extérieure de l'AF, ce qui entraîne la formation d'un tissu fibreux fin et superficiel et laisse la région interne de l'AF non réparée^{15,176,225–228}. Ce tissu est désorganisé et n'est pas aussi résistant que l'AF sain du fait de l'absence de structures lamellaires hautement organisées et d'orientation des fibres de collagène. Les résultats cliniques confirment que la discectomie partielle permet de soulager les symptômes douloureux. Néanmoins, les défauts non réparés de l'AF sont associés à 20% de réherniation post-opératoire et augmentent de 20% la prévalence de la dégénérescence discale par rapport à la population générale^{16–22}. Dans ce contexte, la fermeture des déchirures de l'AF est d'une importance non négligeable. En effet, un dispositif médical efficace de fermeture/réparation de l'AF pourrait

permettre une amélioration des résultats cliniques chez le patient, une réduction de la douleur liée à la fois à une réduction de l'invasion neurale au sein du tissu lésé et à une diminution des risques de réapparition des futures hernies.

L'option la plus directe pour refermer une lésion au sein de l'AF est la suture. Historiquement, un dispositif de suture, appelée XcloseTM (Annulex Technologies, USA), a été commercialisé. Ce dispositif composé de polyéthylène téréphtalate (PET) utilisait des ancres en T de chaque côté de la lésion de l'AF pour rapprocher les marges. Lors d'une étude clinique avec un suivi de 2 ans (NCT00760799), aucune amélioration significative de l'état général du patient n'a été observée (pas de diminution de la douleur ni du risque de hernie post-opératoire)²²⁹. Par ailleurs, la procédure étant difficile à mettre en place (manque d'espace et d'accès) et les sutures présentant un risque élevé d'apparition de déchirures supplémentaires dans le tissu environnant et donc d'accélération du processus de dégénérescence, la commercialisation de ce dispositif médical a été rapidement stoppé.

Certains implants permanents ont également été commercialisés, comme les systèmes IncloseTM (Annulex Technologies, USA), Disc Annular Repair Technology DARTTM (Magellan Spine Technologies, USA) et BarricaidTM (Intrinsic Therapeutics, USA). La technologie IncloseTM est un patch en PET qui se déploie, tel un parapluie, à l'intérieur de la cavité du NP, tandis que la technologie DARTTM est un implant en polyétheréthercétone (PEEK), qui se place directement au sein du défaut de l'AF. Cependant, à notre connaissance, aucune évaluation de ces deux dispositifs médicaux, pouvant prouver leur efficacité à sceller le défaut de l'AF, n'a été publiée dans la littérature. Actuellement, l'implant IncloseTM n'est plus commercialisé. Enfin, l'implant BarricaidTM est composé d'un côté d'un implant en PET inséré dans le défaut de l'AF et de l'autre d'un insert en titane ancré à la vertèbre sous-jacente. Des résultats prometteurs ont été rapportés lors d'une évaluation clinique à 2 ans

(NCT01283438)^{230,231} et cet implant est actuellement évalué dans deux registres de surveillance post-commercialisation (NCT03366779 et NCT03180749).

Bien que certains de ces produits disponibles sur le marché semblent prometteurs, un seul semble faire actuellement l'objet d'une évaluation clinique. Il n'y a en effet pas de preuve significative de leur effet sur la réduction du risque de reherniation ni de leur capacité à promouvoir la réparation annulaire à long terme.

Discectomie totale

La discectomie totale est particulièrement utilisée dans le cas de dégénérescence sévère du DIV ou lors d'une récurrence d'une hernie discale. La discectomie totale est une approche plus agressive avec un retrait d'un maximum de tissu discal et est accompagnée d'une arthrodèse intervertébrale ou d'une arthroplastie (Figure 21).

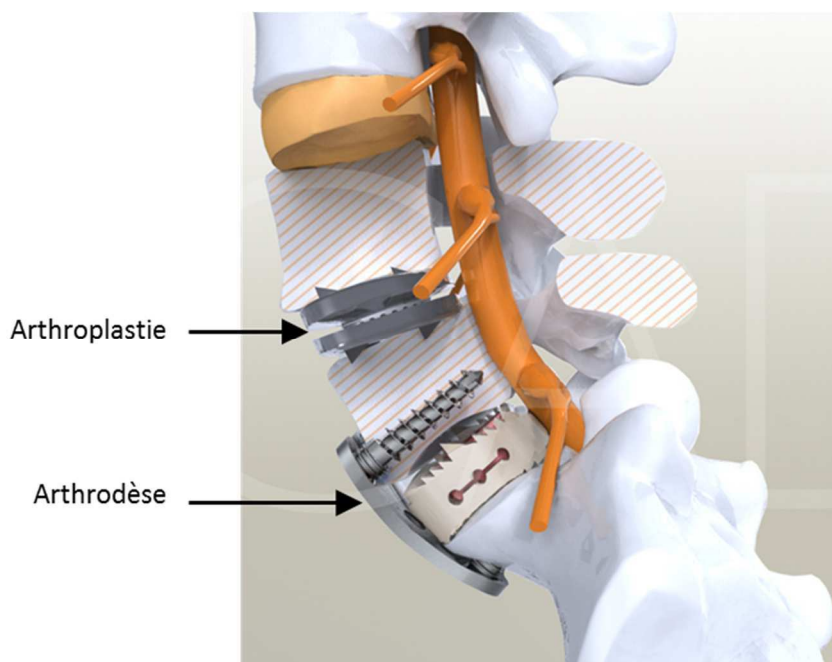


Figure 21. Arthroplastie et arthrodèse de deux disques intervertébraux lombaires. L'arthroplastie consiste à implanter une prothèse discale totale ou partielle tandis que l'arthrodèse consiste à fusionner les deux vertèbres bordant le DIV (Source iconographie : Centre Aquitain du Dos²³²)

L'arthrodèse lombaire consiste à fusionner les deux vertèbres bordant le DIV dégénéré, afin d'immobiliser définitivement l'articulation intervertébrale. Les cages de fusion biocompatibles utilisées sont constituées de fibres de carbone ou de PEEK²³³. Ces implants polymériques peuvent contenir un greffon osseux, provenant dans la plupart des cas de la crête iliaque, associé à un système de maintien permettant la stabilisation de l'implant lors de la fusion. Cette technique est efficace en ce qui concerne les symptômes neurologiques (dans 70 à 80 % des cas), mais elle présente plusieurs inconvénients, comme la réduction de la flexibilité de la colonne du patient, la diminution de la hauteur du DIV associée à une lombalgie amplifiée et persistante ainsi qu'une augmentation du stress des vertèbres adjacentes²³⁴⁻²⁴⁰. C'est pourquoi des DIV artificiels, ou prothèses discales, ont été développés et pourraient non seulement soulager la douleur mais également maintenir une certaine mobilité de l'articulation. Ainsi, un remplacement total du DIV peut être nécessaire en cas de dégénérescence discale sévère. Deux types de prothèses totales ont été développés, selon le matériau de la surface de contact qui peut être soit en métal (Maverick[®], Flexicore[®], Kineflex[®]), soit en polymère (SB Charité III[®], Prodisc-L[®], M6-L[®], LP-ESP[®], activeL[®]) (Figure 22). Bien que les résultats à court terme (2 ans) de l'utilisation de ces disques artificiels soient prometteurs, de nombreuses revues ont pendant longtemps mis l'accent sur la nécessité d'évaluer ces dispositifs médicaux à long terme²⁴¹⁻²⁴⁹. Récemment, plusieurs études à long-terme ont été publiées dont certaines confirment la continuité des bénéfices de l'utilisation de certains dispositifs médicaux à long terme (5 à 10 ans) comme ProDisc[®], Charité[®], LP-ESP[®] ou encore Kineflex[®]^{246, 248,250,251}. Cependant, d'autres études soulignent l'importance d'une sélection rigoureuse des patients pour l'obtention de résultats positifs et la nécessité de mener des études complémentaires pour valider l'utilisation de ces dispositifs comme traitement efficace²⁵²⁻²⁵⁴. Des études à long terme soulignent un manque de soutien interne, un tassement et une dégénérescence des facettes articulaire notamment lors de l'utilisation du dispositif Charité[®]^{252,255,256}. Il est important de

noter qu'un certain nombre de ces disques comme le disque Charité® ainsi que les trois dispositifs médicaux purement métalliques cités ci-dessus ne sont plus commercialisés. Les disques relativement récents comme M6-L® et activeL® ne sont encore qu'au stade d'étude à moyen terme et doivent encore être vérifiés par des études randomisées à long terme.

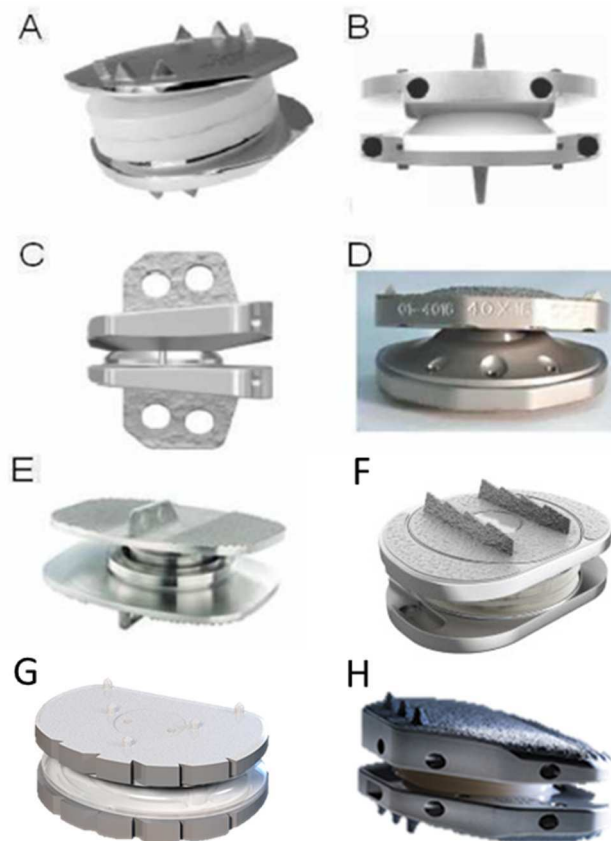


Figure 22 : Prothèses lombaires totales. A. SB Charité III® (DePuy), B. PRODISC® (Synthes), C. MAVERICK® (Medtronic), D. FLEXICORE® (Stryker), E. KINFLEX® (SpineMotion), F. M6-L (SpinalKinetics), G. LP-ESP (FH Ortho Inc), H. ActivL (Aesculap AG).

Pour les patients avec un diagnostic de dégénérescence discale où l'AF n'a pas dégénéré de façon significative, le remplacement du NP seul peut être une méthode très efficace et beaucoup moins drastique que le remplacement d'un DIV en entier, pour soulager les symptômes liés à la maladie. Des prothèses partielles ont donc été développées, soit par l'insertion d'un matériau porteur ayant une haute résistance à la compression, soit par le remplissage du DIV avec un grand volume de matériau plus mou^{218,257,258}. Les polymères les plus utilisés sont les hydrogels (GelStix®, NucleoFix®, Neudisc®) du fait de leur structure très hydratée pouvant mimer le

microenvironnement du NP²⁵⁹. Cependant, certaines complications peuvent être rencontrées et résultent de la nécessité d'une adaptation précise de la taille et de la forme finale de l'implant dans la cavité discale, ainsi que de la migration, de la défaillance et de la dislocation du dispositif²⁶⁰. En effet, le bon fonctionnement d'un implant au sein du NP dépend de son confinement par l'AF. Ainsi, encore une fois, des lésions non réparées au sein de l'AF auront des effets négatifs sur le succès de ce type de thérapies. Si l'AF ne peut pas sécuriser la prothèse du NP, elle sera expulsée et aucun bénéfice biomécanique ne pourra être attendu. Ici, les déchirures et les fissures au sein de l'AF peuvent être la cause de douleurs même en l'absence de hernie.

En conclusion, l'ensemble des approches médicamenteuses et chirurgicales actuellement disponibles permet un traitement symptomatique de la lombalgie par la gestion de la douleur, la décompression du DIV, l'immobilisation, l'élimination du tissu hernié ou le remplacement du DIV lésé. La compréhension du processus de dégénérescence discale en lui-même a permis de mettre en place des thérapies de médecine régénératrice visant à restaurer la fonction du DIV notamment en ralentissant le processus de dégénérescence discale. Ces traitements font l'objet de très nombreuses revues scientifiques et ne seront abordés que très brièvement dans la section suivante.

2.4.4. Traitements innovants

Comme expliqué précédemment, les lombalgies d'origine discale peuvent être dues à une dégénérescence avancée du DIV ou à une hernie discale apparaissant en premier lieu au sein d'un DIV sain. Deux grands axes de traitement ont alors été développés en parallèle, le premier ayant pour but de stopper et d'inverser le processus de dégénérescence, le deuxième visant à réparer l'AF afin d'éviter la mise en place de la dégénérescence.

2.4.4.1. Traitements de la dégénérescence discale

L'utilisation d'implants permanents qu'ils soient totaux (disque artificiel) ou partiels (prothèse de NP) a généralement pour objectif une réparation mécanique de la maladie mais ne vise pas à traiter la maladie du NP sous-jacente. C'est pourquoi de nombreuses stratégies de médecine régénératrice portant sur les fondements biologiques de la maladie ont été développées. Ces stratégies peuvent être classées comme suit : les thérapies cellulaires, les thérapies basées sur l'utilisation de molécules biologiques, les thérapies d'ingénierie tissulaire combinant des supports biodégradables associées avec des cellules et/ou molécules biologiques ou encore l'utilisation de thérapies géniques²⁶¹⁻²⁶³.

Thérapies cellulaires

Dans le DIV dégénéré, lorsque les cellules existantes ne répondent à aucun stimulus biologique ou lorsque la capacité de réparation intrinsèque a été entravée par des processus inflammatoires et cataboliques, la transplantation de cellules saines dans ce DIV pourrait rétablir partiellement ou totalement sa fonction. En effet, ces cellules transplantées pourraient produire des protéoglycanes, du collagène et d'autres composants de la MEC en quantités abondantes et ainsi ralentir voire même inverser le processus de dégénérescence discale. Le fait que le NP soit confiné et avasculaire est souvent considéré comme un avantage pour ce genre de thérapies car cela pourrait limiter la migration des produits injectés ainsi que la réponse immunitaire à celui-ci. Pour cette raison, des cellules de NP allogéniques ou d'origine différente du DIV comme les chondrocytes ont été envisagées pour la transplantation^{25, 58, 264, 265}.

Parmi les différentes sources cellulaires potentielles disponibles pour la thérapie cellulaire, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont une source cellulaire déjà largement étudiée dans de nombreux domaines d'ingénierie tissulaire. Ces cellules peuvent être utilisées non différenciées ou différenciées en cellules de NP⁵⁸. Plusieurs facteurs peuvent alors être utilisés pour induire cette différenciation, tels que la culture en présence de facteurs biologiques,

l'application de forces mécaniques et la co-culture avec des cellules différenciées^{25,264-268}. L'utilisation de cellules non différenciées fait l'objet d'un certain nombre d'essais cliniques, qui ont récemment été décrits dans deux revues^{265,269} où un soulagement de la douleur et de la gêne ressenties par le patient a été démontré, résultant probablement des propriétés anti-inflammatoires et pro-anaboliques des CSM transplantées^{270,271}. Cependant, la plupart des études cliniques n'ont pas montré de rétablissement de la hauteur discale et restent encore très préliminaires^{5, 25, 264, 269,272-275}. De plus, certaines études ont montré que les CSM ne survivent pas longtemps après transplantation. En effet, l'environnement discale dégénéré est assez hostile du fait d'une très faible tension en oxygène et de faibles taux d'échange de nutriments et de métabolites. C'est pourquoi l'utilisation de cellules de NP autologue, allogénique ou des cellules prédifférenciées, présentant donc un phénotype plus adapté au microenvironnement spécifique du DIV, pourrait permettre une meilleure survie des cellules post-injection. L'objectif futur de la recherche sur les thérapies cellulaires pourrait donc être d'identifier la source cellulaire optimale à implanter (cellules souches mésenchymateuses (CSM), cellules notochordales, cellules du NP adulte, cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ...).

Thérapies via des molécules biologiques

Au sein du DIV les molécules biologiquement actives, tels que les cytokines, les enzymes et les facteurs de croissance, jouent un rôle primordial dans l'homéostasie du DIV et y maintiennent un équilibre entre les processus anaboliques et cataboliques^{155-157,276,277}. Afin de stimuler et induire une réparation endogène du DIV dégénéré les recherches se tournent vers l'injection de solutions protéiques contenant des facteurs pro-anaboliques, anti-cataboliques ou encore chimio-attractants. Parmi ces nombreux candidats, plusieurs ont montré des résultats prometteurs dans des modèles animaux, cependant peu d'études cliniques ont été publiées²⁷⁵. Toutefois, plusieurs essais cliniques examinent l'effet du facteur de croissance/différenciation-5 (GDF-5) sur la réparation du DIV. Le GDF-5 fait partie de la superfamille du facteur de

croissance transformant- β (TGF- β) et de la sous-famille des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et est connu pour influencer la croissance et la différenciation de divers tissus, dont le DIV²⁷⁸. Actuellement, 4 essais cliniques sont à notre connaissance encore en cours, afin d'étudier le potentiel régénératoire de ce facteur de croissance dans le traitement de la dégénérescence discale (NCT01182337, NCT01158924, NCT01124006, NCT00813813)²⁶⁴.

En ce qui concerne le rôle des facteurs anaboliques dans le traitement de la dégénérescence, l'utilisation du plasma riche en plaquettes (PRP), qui contient une myriade de facteurs de croissance multifonctionnels (TGF- β , Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) et insulin-like growth factor-1 (IGF-1)), a récemment été proposée comme thérapie pour la dégénérescence discale. Deux essais cliniques ont montré que l'injection de PRP a procuré un certain soulagement symptomatique des patients à court terme²⁷⁹⁻²⁸¹. Cependant, l'amélioration des symptômes douloureux à long terme reste à démontrer.

Il est important de noter que l'administration des facteurs biologiques mentionnés ne sera efficace que lorsque des cellules sont présentes dans le DIV. En effet, le faible nombre de cellules fonctionnelles, notamment dans les DIV dégénérés, peut limiter les effets thérapeutiques désirés. De plus, ces facteurs biologiques ont une courte demi-vie dans l'organisme et des administrations répétées ou continues peuvent-être nécessaires pour obtenir un maximum de bienfaits tout en augmentant le risque de lésions au niveau de l'AF. Pour pallier à ces problèmes, le développement de systèmes à libération prolongée et contrôlée pour le traitement du DIV sont actuellement très en vogue notamment pour la libération de facteurs de croissance en association avec des chimiokines. En effet, le développement de système avec différentes cinétiques de libération pourrait permettre d'avoir une libération rapide de chimiokines afin de recruter des cellules réparatrices au site d'intérêt, suivie d'une libération continue de facteurs de croissance afin de stimuler la différenciation en cellules du NP des cellules progénitrices recrutées²⁶⁵.

Thérapies géniques

La thérapie génique est apparue comme une approche permettant de contourner les limites actuelles associées à l'administration de protéines. Cette stratégie consiste à transférer des acides nucléiques dans des cellules cibles afin d'induire une expression prolongée de protéines d'intérêt pro-anabolique ou anti-catabolique pour induire la régénération du DIV dégénéré. Malgré des résultats probants obtenus sur des modèles animaux, aucun essai clinique n'a été réalisé chez l'homme^{5, 218, 275}. De plus, l'utilisation de vecteurs viraux pour transporter et libérer les séquences génétiques possède des risques non négligeables de transfection non spécifique dans les tissus et cellules environnants, rendant les études cliniques chez l'homme sur ce genre de thérapie très controversées.

Ingénieries tissulaires

Une approche alternative pour surmonter les problèmes associés aux stratégies de libération de molécules et de cellules consiste à appliquer ces stratégies en combinaison avec des biomatériaux. Comme expliqué précédemment, ces matériaux pourraient être utilisés pour la libération contrôlée de composés biologiquement actifs ou de cellules tout en permettant une stabilité mécanique du DIV²¹⁸.

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du DIV, le NP a principalement retenu l'attention des équipes de recherche. Ceci est peut-être attribué au fait que, jusqu'à récemment, les lésions au sein de l'AF étaient considérées comme une conséquence du processus de dégénérescence discale et non une des causes à l'origine de cette maladie. En raison de la nature hautement hydraté du NP, une large gamme d'hydrogels (principalement naturels) a été utilisée pour l'ingénierie du NP, comprenant l'alginate, le chitosan, la gélatine, le collagène ou l'acide hyaluronique^{282, 283}. Cependant, à notre connaissance, un seul hydrogel à base de polyéthylène glycol (PEG), d'albumine et d'acide hyaluronique a fait l'objet d'un essai clinique (NCT01640457) et les résultats de cette étude ne sont pas encore publiés^{284, 285}.

Encore une fois, il est important de souligner que, sans un dispositif fonctionnel de fermeture de l'AF, les lésions persistantes au sein de l'AF lors de l'implantation d'un biomatériau ou d'un hydrogel pressurisé au sein du NP peuvent entraîner l'extrusion de ces dispositifs d'ingénierie tissulaire pour le NP.

2.4.4.2. Traitements des lésions au sein de l'AF

En l'absence d'un matériau de soutien, la réparation de l'AF se limite aux couches externes de l'anneau fibreux. La lésion externe est alors remplie par un tissu conjonctif dont les propriétés mécaniques sont inférieures à celles du tissu AF natif¹⁵. Le remplacement d'un tissu AF lésé ou dégénéré par un tissu hautement organisé permettrait la reconstitution de la biomécanique du DIV en permettant le confinement du NP lors des divers mouvements du corps. Comparée à l'ingénierie tissulaire pour le NP, l'ingénierie tissulaire pour l'AF est plus complexe étant donné la structure hautement organisée de l'AF qui est essentielle pour pouvoir remplir sa fonction biomécanique.

3. Article de revue

La compréhension de l'implication de l'AF au sein du processus de dégénérescence discale ainsi que les connaissances approfondies de la structure de ce tissu ont été à l'origine de l'émergence de nombreuses études visant à développer diverses stratégies innovatrices de fermeture et réparation de l'AF. L'ensemble de ces stratégies ont fait l'objet d'une revue en cours de soumission.

Article I: ***Annulus fibrosus of the intervertebral disc: from closure and repair to regenerative therapies.*** M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, A. Hamel, E. Bord, S.Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage - (En cours de soumission - Nature Biomedical Engineering)

ARTICLE I

Annulus fibrosus of the intervertebral disc: from closure and repair to regenerative therapies

M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, A. Hamel, E. Bord, S.Y. Chew, J. Guicheux*,

C. Le Visage* (*En cours de soumission - Nature Biomedical Engineering*)

Résumé

L'altération de la structure de l'*Annulus fibrosus* (AF) est considérée comme une source de la dégénérescence discale et de douleurs radiculaire et discogénique. Les déchirures radiales importantes de l'AF peuvent entraîner une hernie du disque intervertébral (DIV), définie comme la protrusion du *Nucleus pulposus* (NP) à l'extérieur du DIV, pouvant causer une compression de la racine nerveuse dans le canal rachidien et entraînant une douleur projetée, dite radiculaire. Actuellement, la prise en charge de la maladie se limite au traitement symptomatique de la douleur et se concentrent principalement sur la réparation du NP, au détriment de l'intégrité structurale de l'AF. Il a été démontré que les déchirures annulaires persistent dans le temps en raison de la capacité de guérison intrinsèque limitée de ce tissu. Les défauts non réparés sont également associés à un risque de réapparition d'une hernie postopératoire pouvant aller jusqu'à 20 % et à une augmentation de 20 % de la prévalence de la dégénérescence discale par rapport à la population générale. Pour ces raisons, au cours de la dernière décennie, les stratégies d'ingénierie pour le traitement des DIV ont de plus en plus mis l'accent sur le développement de nouveaux matériaux pour la fermeture et la réparation de l'AF. Dans cette revue, nous décrirons les diverses approches actuellement en cours d'évaluation pour la réparation de ce tissu et mettrons en évidence les thérapies innovantes et prometteuses ainsi que les perspectives d'évolution possibles dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

* *Auteurs co-last*

ANNULUS FIBROSUS OF THE INTERVERTEBRAL DISC: FROM CLOSURE AND REPAIR TO REGENERATIVE THERAPIES

1	Introduction	2
2	The intervertebral disc.....	2
2.1	Structure of the IVD	3
2.1.1	Cartilage endplates	3
2.1.2	Nucleus pulposus.....	4
2.1.3	Annulus fibrosus.....	4
2.2	IVD specific environment	5
2.3	Mechanical function of the normal IVD	6
3	Annular structural defects and consequences.....	8
4	<i>Annulus fibrosus</i> closure and repair	9
4.1	Clinical approved medical devices	9
4.2	<i>Annulus fibrosus</i> closure strategies	12
4.2.1	Sutures for AF closure.....	12
4.2.2	Adhesives for AF closure	15
4.2.3	Implants for AF closure.....	18
4.2.4	Combined strategies for AF closure	23
5	Discussion and future work	28
6	Conclusion.....	32
7	Bibliography	32

ANNULUS FIBROSUS OF THE INTERVERTEBRAL DISC: FROM CLOSURE AND REPAIR TO REGENERATIVE THERAPIES

M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, A. Hamel, E. Bord, S.Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage**

* : co-last authors

1 Introduction

Impairment of the *Annulus fibrosus* (AF) structure is believed to be a major source of disc degeneration and discogenic pain. Extensive AF radial tears lead to intervertebral disc (IVD) herniation, defined as the protrusion of the NP outside the IVD, causing a compression of the nerve root in the spinal canal leading to radicular pain. Current surgical strategies are limited to symptomatic treatment of pain and are mainly focused on the repair of the *Nucleus pulposus* (NP), at the expense of the structural integrity of the AF. Annular tears have been shown to persist in time due to the limited intrinsic healing capacity of the AF. Unrepaired defects in the AF are also associated with up to 20% of postoperative reherniation and an increase by 20% of the IVD degeneration prevalence when compared to the general population¹⁻⁷. For these reasons, in the last decade, engineering strategies for IVD treatment have increasingly focused on AF regenerative medicine and will be presented in this review.

2 The intervertebral disc

The intervertebral disc (IVD) is a fundamental component of the spine and has a vital contribution to its biomechanics. This fibrocartilaginous structure is embedded between the bone vertebral bodies, joining them together (Figure 1). There are a total of 23 IVDs in the human column, occupying one-third of the spinal length. Its function is to absorb shocks and transmit load, arising from body weight and muscle tension, from one vertebral body to the next. It plays a major role in the flexibility of the spine by allowing bending, flexion and torsion.

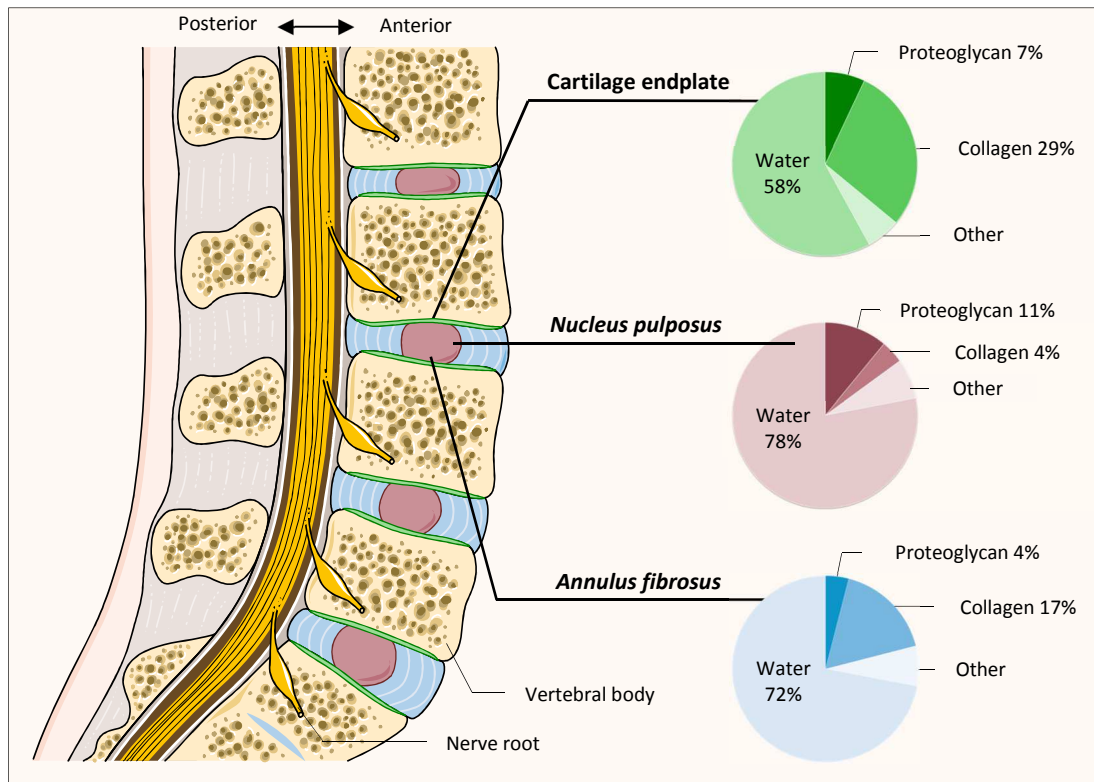


Figure 1. General organization of lumbar spine and global composition of the three IVD tissues. Cartilage endplates, *Nucleus pulposus* and *Annulus pulposus* are mainly composed of water, collagen and proteoglycans (wet weight % (w/v)).

2.1 Structure of the IVD

The IVD is confined between two cartilage endplates (CEPs) covering the vertebral bodies and is divided in two macroscopically different tissues: the *Nucleus pulposus* (NP) in the center and the surrounding *Annulus fibrosus* (AF) (Figure 1).

2.1.1 Cartilage endplates

The CEP are formed by hyaline cartilage that covers up to 90% of the inferior and superior vertebral bodies. Interestingly, the CEP are only weakly attached to the vertebral bodies, and are often considered to be a part of the IVD^{8,9}. The human endplate thickness varies across the width of the IVD, from 0.6 mm in the adjacent region to the NP, to 1 mm in the region surrounding the AF¹⁰⁻¹². The CEPs are composed of cells, mainly chondrocytes, type II collagen fibers (60 to 80% dry weight) running in parallel to the vertebral bodies, near the AF, while proteoglycans (PGs, 17% dry weight) and water (58% wet weight) are concentrated in the center, near the NP^{9,11}.

Due to their composition and organization, endplates are essential to the IVD. Indeed, their collagen fibers constitute a strong barrier to prevent the NP protrusion into the adjacent vertebrae and they play a major role in the diffusion of essential nutrients and waste in and out of the IVD. With their high content of PGs, water and blood vessels, CEPs can be considered as a semi-permeable membrane between the subchondral bone of the vertebra and the IVD^{9-11,13}.

2.1.2 *Nucleus pulposus*

The NP, derived from the embryonic notochord^{14,15}, is composed of hydrophilic proteoglycans (50% dry weight), chiefly aggrecan, and forms a highly hydrated gelatinous tissue (water ~70-80% NP wet weight)^{16,17}. This isotropic structure contains loosely organized collagen (20% of dry weight) and elastin fibers. The NP is mainly composed of type II collagen (80% of total collagen), with other collagen molecules (types V, VI, IX and XII) associated to the surface of type II fibrils¹⁸. The adult human NP contains approximately 4 000 cells/mm³, which are cells presenting a phenotype compared to articular chondrocytes, called nucleopulpocytes¹⁹.

2.1.3 *Annulus fibrosus*

The AF, derived from the mesenchyme, confines the hydrated NP to avoid its protrusion outside the IVD when the spine is subjected to high compressive loads. The AF is composed of concentric rings, or lamellae, of parallel collagen fibers, running from one vertebra to the next and firmly anchored directly to the periphery of the subchondral plate above and below, while fibers of the inner part of the AF are inserted to the cartilage endplates²⁰⁻²². The number of lamella in the AF ranges from 15 to 25, with higher number of fibers in lower IVD of the spine, and in the lateral and ventral region of the AF. The lamellae can be complete or incomplete and they are slightly thinner in the dorsal than in the ventral portion, with an increasing thickness from the inner region to the outer one (ranging from 200 to 400 µm, respectively)²¹. The collagen can be found in the form of fibrils, which in the adult human IVD have a diameter of about 0.1 to 0.2 µm, or as an association of fibrils forming a collagen fiber of about 0.5 to 3 µm diameter^{21,23}. Within a lamella, collagen fibers are parallel to each other and are oriented obliquely at a precise angle of 60° to the vertical axis of the spine (Figure 2). This inclination alternates to the left and right with each lamella, conferring a cross-ply structure. Therefore, every other lamella has the same orientation, but has an opposite inclination from the adjacent lamellae²³⁻²⁶.

Furthermore, the AF has a gradient of composition in term of cell type and extracellular matrix (ECM) components and two distinct regions can be distinguished (Table 1): the outer *Annulus fibrosus* (OAF), which is made of dense and highly structured network of collagen lamellae, and the inner *Annulus fibrosus* (IAF), which is less dense and lacks the high degree of organization of the OAF²⁷⁻³¹. The IAF is mainly composed of type II collagen and contains greater amounts of GAGs compared to the OAF which is predominantly made of type I collagen. This gradient of composition within the AF gives rise to a tissue with specific mechanical properties. Uniaxial tension tests on human single AF lamellae revealed that the OAF has higher tensile modulus than the IAF (64.8 MPa and 31.2 MPa, respectively)^{32,33}. AF contains approximately 9 000 cells/mm³ and cell morphology also vary from inner to outer region³⁴. Cells in the periphery of the AF are elongated with very thin processes and numerous actin and vimentin filaments and have a parallel orientation to the collagen fibers. These OAF cells are described as fibroblast-like cells. Toward the center of the IVDs, the annular cells become more

spherical, with only a few processes. These IAF cells are described as chondrocyte-like cells^{29,30}. PGs constitute another structural elements present in the ECM of the AF, although in a more sparsely manner (10 - 20% of total AF dry weight)^{18, 30,35}. The IVD possesses a variety of PGs including large aggregating PGs, such as aggrecan and versican, and small interstitial PGs, which are decorin, biglycan, fibromodulin and lumican³⁶⁻⁴². While small PGs bind collagen, fibronectin and growth factor in the ECM and are believed to be involved in the ECM integrity homeostasis, large PGs (carrying an overall negative charge that is responsible for retention of water molecules) play a major role in the hydrated state of the IVD^{17,24}. The proportion of PGs in the AF also differs according to the region, with the IAF containing more proteoglycans than the OAF (Table 1)^{9, 24,43}. Finally, elastin is another structural protein which constitutes only 2% of the dry weight of the AF but has nevertheless an important role in the maintenance of collagen organization and in the rapid recovery of IVD size and shape following flexion or extension^{30,44,45}. The elastic fibers are present within the collagen lamellae but also between lamellae in the region called interlamellar septae where they connect adjacent lamellae together⁴⁵.

	Outer AF	Inner AF
Cells	Elongated fibroblast-like cells	Spherical chondrocytes-like cells
Collagen	75 to 90 % dry weight - Type I collagen	40 to 70% dry weight - Type II collagen
Proteoglycans	10% dry weight	20 to 35% dry weight
Water	65 - 75%	75 - 80%

Table 1. Difference in composition and cellularity between outer and inner *annulus fibrosus*.

2.2 IVD specific environment

The IVD has limited innervation, with some nerves found only at the surface and in the first layers of the OAF. These nerve endings are believed to be extensions of the sinuvertebral nerve, the ventral ramus of the spinal nerve and the sympathetic chain^{9,46,47}. The healthy adult IVD is a relatively hypovascular tissue with blood vessels present only in the OAF periphery and across the cartilage endplates, creating a gradient of oxygen concentration reaching 1% in the center of the NP^{13, 28,48}. Overall, the endplates and the IVD ECM play a major role in the IVD nutrition by being both permeable barriers to selective molecules according to their charge, shape and molecular weight⁴⁹. Due to its hypovascular nature, the center of the IVD directs cell metabolism toward the anaerobic glycolysis pathway, which is dependent on the availability of glucose, and produces large amounts of lactic acid^{50,51}. The IVD environment is thereby slightly acidic, with a pH ranging from 6.9 to 7.1, according to the concentration of lactic acid^{9,10, 28,34}. To maintain a balance between anabolism and catabolism, the adequate delivery and removal of glucose and lactic acid, respectively, is vital for cell survival.

2.3 Mechanical function of the normal IVD

The IVD has a pivotal role in the spine kinematic. It provides stability during motion such as compression, distraction, sliding/twisting and bending. The adaptive structure and composition of the IVD allow load absorption and uniform distribution between vertebral bodies. When exposed to a vertical load (during standing position or weight lifting) both the AF and NP are subjected to axial compressive stress (Figure 2). The pressurized NP will then translate the vertical compression into circumferential tension through the cartilage endplates and the AF. Indeed, due to its fluid-like behavior, the NP experiences a reduction of its height but not of its volume. Thus, the NP expands radially toward the AF, where the highly organized structure undergoes some circumferential stretching to limit NP deformation. As the tension is applied to the AF, the initially wavy collagen fibers, progressively stretch toward the loading direction. Once a fiber is completely straighten, it starts taking load and contributes to the overall stiffness of the AF^{52,53}. When the load or pressure is released, the energy stored in the AF is returned to the NP and used to restore any deformation it might have endured. This energy storage system allows the IVD to protect the underlying vertebra. When a load is rapidly applied, the pressure is temporarily diverted into the AF fibers, reducing the rate at which the load is transmitted to the next vertebra.

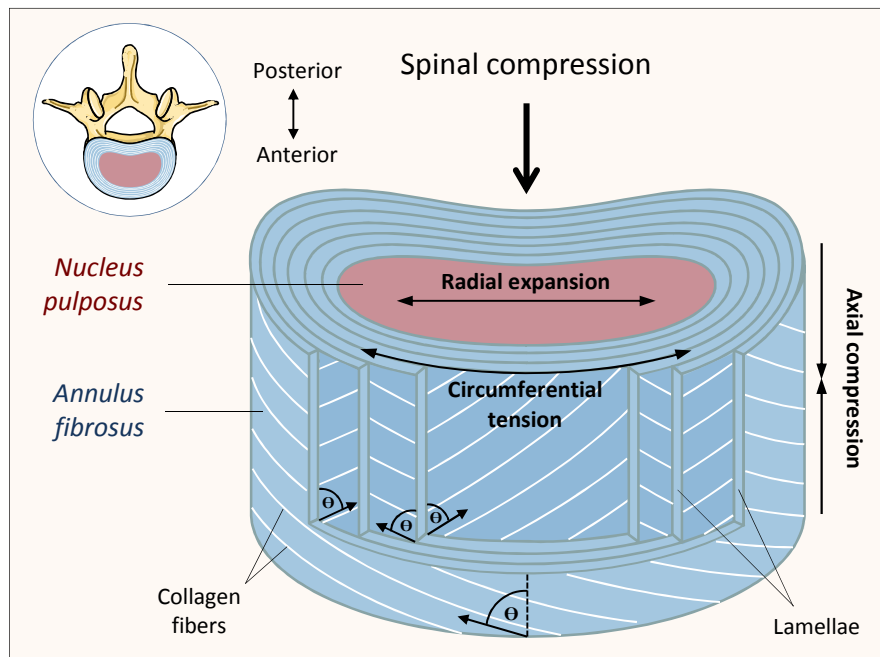


Figure 2: Detailed structure and mechanical deformation endured by the AF upon spinal compression. The AF is composed of concentric lamella composed of aligned collagen fibers oriented obliquely at $\theta = 60^\circ$ to the vertical axis of the spine. During spinal compression, the AF is subjected to axial compression, radial expansion and circumferential tension (schematics adapted from Bogduk *et al.* ⁹).

Recently, the human intradiscal pressures reported in the literature were compiled in a review³³ and are summarized here in Table 2. Intradiscal pressure varies from 0.06 to 1.50 MPa with a maximum pressure reported during lifting a 20 kg weight to be about 2.30 MPa.

Position	Min Pressure (MPa)	Max Pressure (MPa)
Prone	0.06	0.41
Sitting	0.32	1.50
Standing	0.27	1.07
Lifting 20 kg weight	N/A	2.30

Table 2. Differences in human intradiscal pressure between prone, sitting and standing positions (table adapted from Long et al. ³³).

The stability of the spine during movements is mainly provided by the inherent structure of the AF, whose integrity is therefore primordial for normal human activity. Indeed, the left to right alternating angled collagen lamella, interspersed with elastin fibers, allow the AF to resist large and complex loads in multiple directions. The anisotropic nature of the AF is evidenced by mechanical properties varying in radial, axial and circumferential directions (Figure 2). It was shown that upon uniaxial tension, the circumferential tensile modulus of the multi-lamellar AF is about 10 to 20 times greater than in the axial direction, itself an order of magnitude greater than in the radial direction (Table 3)^{33,54–59}. This is easily explained by the fact that during circumferential load, the parallel collagen fibers of each lamella are stretched, while during axial loading, fibers are not extended⁵³. The failure strain (ϵ) and stress (σ) also vary between the outer and the inner AF, mainly in circumferential directions^{52,53}.

Parameter	Outer AF	Inner AF
Multi-lamellae		
Tensile modulus (E)		
<i>Circumferential</i>	11.04 - 29.30 MPa	2.00 - 5.60 MPa
<i>Axial</i>	0.42 - 0.82 MPa	0.96 MPa
<i>Radial</i>	0.21 - 0.45 MPa	0.44 MPa
Failure Strain (ϵ)		
<i>Circumferential</i>	34 - 38%	49%
Ultimate tensile strength (σ)		
<i>Circumferential</i>	3.29 - 3.80 MPa	1.18 MPa
Single lamellae		
Tensile modulus (E)	64.80 MPa	31.20 MPa
Failure Strain (ϵ)	19 - 30%	
Ultimate tensile strength (σ)	2.40 – 4.0 MPa	

Table 3. Difference in human mechanical properties between outer and inner *annulus fibrosus* (AF) of single or multi-lamellae.

From all these data, it is evident that any disruption in the AF structure will impair its properties to store energy during loading and properly resist NP radial expansion, which will have a tremendous effect on the overall mechanical properties of the IVD.

3 Annular structural defects and consequences

Impairment of the AF structure is believed to be one of the sources of low back pain (LBP). Indeed, AF fissures have been shown to give rise to discogenic and subsequent radicular pain. AF outer lesions are invaded by blood vessels (neo-vascularization) penetrating deep inside the defect, frequently accompanied by nociceptive fibers (neo-innervation), making this herniated IVD pain sensitive^{60,61}. In addition, extensive AF radial tears may lead to IVD herniation, defined as the protrusion of the NP outside the IVD, thus compressing the nerve root in the spinal canal and leading to radicular pain⁶². These tears have been shown to persist in time due to the limited intrinsic healing capacity of the AF. Indeed, AF was shown to have only minor self-repair processes occurring in a centripetal manner, that results in the formation of a disorganized fibrous tissue and leaves the inner region of the AF unrepaired⁶³.

AF disruptions leading to discogenic and subsequent radicular pain can arise from repetitive or traumatic events. This has been extensively investigated *ex vivo*, where herniation, hence AF ruptures, can be induced by either the repetitive application of low magnitude forces or a single high-intensity load^{64–68}. Annular lesions can also emerge from surgery during NP regenerative therapies. Indeed, the majority of NP treatments involves the use of a needle that punctures through the AF inducing lesions that have been shown to promote herniation of the injected materials towards the spinal canal⁶⁹. Finally, AF lesions are often associated with IVD degeneration, but it is still unclear which comes first. Some postulate that degeneration processes are first encounter in the NP and later spread outwards to the AF. The progressive decrease of PGs content in the NP during degeneration leads to its dehydration and volume reduction, thus causing an overall IVD height narrowing⁷⁰. From this point on, this physiologically altered NP is unable to fulfill its biomechanical role as “shock absorber” and compels the AF to resist compression directly which ultimately leads to the appearance of tears and IVD herniation⁷¹. However, numerous studies are in disagreement with this hypothesis, and showed that non-degenerated, highly hydrated IVD are more prone to IVD herniation than degenerated IVDs^{53,72,73}. This is reinforced by the fact that IVD herniation frequently affects young and middle aged-patients ranging from 30 to 50 years old but has a lower prevalence in elderly population²⁰. This can be explained by the fact that healthy IVD have a higher intradiscal pressure in the NP compared to degenerated IVDs. Hence, degeneration processes would not be a cause of AF disruption but rather a consequence of an AF lesion. This is confirmed by the fact that damage to the AF is one of the most extensively used model for induction of IVD degeneration in animal model⁷⁴. These models have been tested in a large variety of animal species including mice, rats, rabbits, dogs, pigs, and sheep and showed that structural disruption of the AF induces the leakage of NP outside the IVD and activates a cascade of cell-mediated response, leading to IVD degeneration^{75–80}. These results are also found in human clinical studies where the efficiency of current surgical strategies to treat IVD herniation have poor long-term outcomes. Indeed, discectomy is the most common surgical procedure performed for patients experiencing discogenic and

radicular pain caused by herniated lumbar IVD. It consists in the removal of the herniated tissue to stop the nerve compression. However, this surgical treatment only alleviates the symptoms and unrepaired defects in the AF have been proved to be associated with up to 20% of postoperative reherniation and increase by 20% the prevalence of IVD degeneration compared to the general population¹⁻⁷.

Overall, AF structural impairment plays a major role in LBP and induces IVD degeneration, leads to NP treatments failures and cannot naturally heal properly. For these reasons, in the last decade, engineering strategies for IVD regeneration and repair have increasingly focused on AF closure and repair.

4 Annulus fibrosus closure and repair

As previously mentioned, annular tears are associated with degeneration of the IVD and are also involved in the re-herniation phenomenon appearing after discectomy or NP surgery (Figure 3). It is, therefore, necessary to adopt an appropriate strategy to close and repair this damaged AF. This section will review the different commercial devices and approaches, such as suture, adhesive, implant or the combination of these techniques, that are being developed up to date to treat AF rupture and the overall herniated IVD.

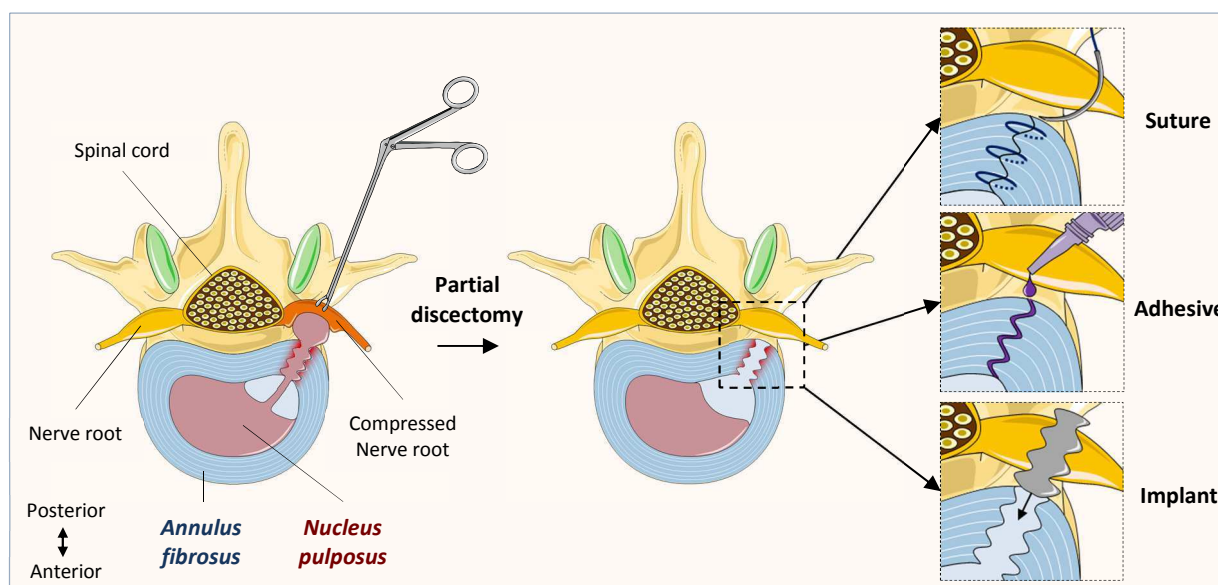


Figure 3. Strategies overview for AF closure and repair. Three closure techniques can be considered to repair an AF lesions following a partial discectomy: suturing, gluing and implantation.

4.1 Clinical approved medical devices

Four medicals devices were approved to seal and reinforce a teared AF: Xclose™ tissue repair system, Inclose™ surgical mesh system, Disc Annular Repair Technology DART™ and Barricaid™ implant (Table 4). The Xclose™ system is a polyethylene terephthalate (PET) suture method using T-anchors on each side of the AF lesion to approximate the margins. Despite some early attractiveness, a 2 years clinical study (NCT00760799) demonstrated no significant difference of post-operative pain and

reherniation rate between sutured and non-treated group⁸¹. The Inclose™ technology is a PET patch affixed to the interior side of the defect, while the DART™ technology is a poly(etheretherketone) (PEEK) implants, that can be placed inside an AF defect. However, to our knowledge, no evaluation of these two technologies have been published in peer-review medical literature to prove their efficiency in sealing the AF defect. The commercially available Barricaid™ technology, uses a dual strategy to maintain an implant in an AF defect. It consists of a PET implant inserted in the AF defect on one side and anchored to the adjacent vertebrae by a titanium insert on the other side. Promising results were reported in a 2 years clinical evaluation where the implant was shown to improve leg and back pain, preserve disc height and reduce symptomatic reherniation (NCT01283438)^{82,83}. This device is currently evaluated in two post-market surveillance registries (NCT03366779 and NCT03180749). However, to our knowledge no evaluation on the impact of such an invasive procedure on surrounding endplate or vertebral have been performed.

Although some of these products seem promising, the two Annulex closure devices (Xclose™ and Inclose™) previously cleared by FDA are no longer available and only one of the remaining two commercially available permanent closure device (Barricaid™) seems to be currently under post-market evaluation. Moreover, there is a lack of significant evidence to prove that they have any effect on reducing the risk of reherniation and their ability to promote long term annular repair is limited.

Besides commercially available products, numerous research studies have been focused on the development of new strategies to appropriately close and repair AF lesions including suture, adhesives and implants.

NAME	DESIGN	REGULATORY STATUS	CLINICAL EVALUATION
XcloseTM tissue repair system (Annulex Technologies, USA)	Polyethylene terephthalate suture system with anchors	FDA approved (2006)	- Multicenter, prospective, randomized, controlled clinical study⁸¹ NCT00760799 - 728 participants: - XcloseTM sutured group (478 participants) - No repair - control group (250 participants) - 3 month, 6 month and 2 year follow-up - Outcome: - No statistical difference in post-operative pain - After 2 years, 12 patients (2.5%) underwent reoperation due to reherniation in the sutured group vs 11 patients in the control group (4.4%). - No studies on long-term IVD degeneration
IncloseTM surgical mesh (Annulex Technologies, USA)	Polyethylene terephthalate mesh implant that expands beneath the AF defect	FDA approved (2005)	No evaluation found in peer-review medical literature
Disc Annular Repair Technology (DART) (Magellan Spine Technologies, USA)	Poly(etheretherketone) cone shaped implant	CE Mark (2009)	No evaluation found in peer-review medical literature
BarricaidTM implant (Intrinsic Therapeutics, USA)	Polyethylene terephthalate mesh implant + titanium bone anchor	CE Mark (2009) Australian Register of Therapeutic Goods (ARTG) (2011)	- Multicenter, prospective, non-randomised comparative study⁸² NCT01534065 - 76 participants: - BarricaidTM implanted group (30 participants) - No repair - control group (46 participants) - 12 month follow up - Outcome: - Trend towards preservation of IVD height in implanted patients compared to control - After 1 year, 0 patient presented reherniation in implanted group vs 3 patients (6.5%) in control group - No significant difference of reherniation rate between groups - No studies on long-term IVD degeneration - Ongoing prospective, randomized study (2010 - estimated completion date: 2019) NCT01283438 - Estimated enrollment: 550

Table 4. Clinical approved medical devices developed for AF closure and repair

4.2 Annulus fibrosus closure strategies

4.2.1 Sutures for AF closure

Initial attempts to close AF defects using sutures was made by Ahlgren et al. in an ovine model, where different AF defects were allowed to heal for up to 6 weeks⁸⁴ (Table 5). Explanted IVDs were then subjected to a “pressure - volume” test where a saline injection within the NP was used to measure maximal pressure reached before leakage. No significant improvement in the healing strength of sutured groups using standard suturing methods was seen when compared to non-treated groups. Thus, the development of new suturing methods specific to the AF has been contemplated. A novel minimally invasive Kerrison-shaped closure device has been tested in *ex vivo* and in a pig model (Table 5). This ultra-high molecular-weight polyethylene suture with Dines knot conferred enough strength in the *ex vivo* model to withstand up to 4000 cycles of 1500 N of axial load (approximating the forces experienced in the human lumbar spine during lifting a light load) but did not show any significant differences compared to untreated IVDs *in vivo* (MRI volumetric assessment)⁸⁵. However, this could be attributed to the short period of implantation (4 weeks). Thus, this new technique needs to be evaluated in a long-term *in vivo* model.

A modified purse-string suture method (MPSS) was tested in an *ex vivo* pig model to close different types of defects: needle punctures (18-, 20-, 22-, and 24- gauge) and a 3 x 4 mm annulotomy box. The MPSS technique was shown to restore the mechanical integrity of the AF after small needle punctures to a degree able to withstand normal daily loading pressures (upright position: up to 1 MPa). However, for larger defects (18G puncture and box), IVDs could barely resist normal loading pressures, suggesting a failure when IVD pressure increases for example when lifting weight (~2.3MPa)⁸⁰. Moreover, the MPSS was tested to close a 4 mm slit incision (12 mm depth) in an *in vivo* cervical pig model, after 6 months the IVD degeneration was only slightly decrease compared to untreated group but not avoided compared to control group⁶².

While these new suturing methods seem to reduce short-term risk of IVD herniation, no studies have evaluated their long-term efficiency on limiting IVD degeneration. Moreover, suturing techniques exhibit some major limitations (Table 9). Indeed, to correctly retain intradiscal pressure the two margins of the defect need to be pulled closely together and the suture needs to be tight enough to properly seal the defect during motions. This could change the orientation of the collagen fibers and induce a permanent tension of these fibers, hence modifying the mechanical properties of the AF tissue. The sutured portion of the AF could no longer be able to store additional load during displacement and correctly distribute the load to surrounding tissues, increasing the risk of failure and degenerative process. Moreover, puncturing the surrounding AF to close a defect with sutures could enhance the risk of appearance of additional tears in the aligned collagen structure and accelerate the degeneration

process. To our knowledge, no studies have been carried out on the suture retention strength of the AF tissue. Finally, due to the complex structure of the spine, there is a limited access to the AF posterolateral region during a discectomy, and proper suturing would be difficult and usually be limited to the outer portion of the AF.

SUTURES	MODELS	OUTCOMES
Material 3.0 Vicryl suture ⁸⁴	Animal model • Sheep lumbar IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 6 weeks Injury method - AF scalpel incisions : slit 5 mm or cruciate 5 x 5 mm + partial NP removal - 5 x 3 mm box annulotomy + partial NP removal	Benefits • Inexpensive • Commonly used in surgery Limitations • No significant differences between sutured IVDs and untreated IVDs
Material 2.0 non-absorbable suture Ultra-high molecular-weight polyethylene ⁸⁵	Animal model • Pig cervical IVD <i>ex vivo</i> model - Mechanical loading : between 50 and 4000 cycles of flexion/extension with 1500N of axial load • Pig cervical IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 4 weeks Injury method - AF scalpel incision (<i>ex vivo</i>) - AF scalpel incision + partial NP removal (<i>in vivo</i>)	Benefits • Withstand up to 4000 cycles of 1500 N axial load in <i>ex vivo</i> model Limitations • No significant differences between sutured IVDs and untreated IVDs in <i>vivo</i>
Material 4.0 non-absorbable polypropylene Modified purse-string suture method (MPSS) ^{62,80}	Animal model • Pig lumbar IVD <i>ex vivo</i> model - Leakage testing • Pig cervical IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 2, 4 and 6 months Injury method - Needle puncture (18-, 20-, 22-, 24- gauge) and 3 x 4 mm, 12 mm deep annulotomy box (<i>ex vivo</i>) - AF scalpel incision : slit 4 mm, 12 mm deep (<i>in vivo</i>)	Benefits • MPSS on small defects withstand normal daily loading pressures in <i>ex vivo</i> model • Sutured slightly slow down degenerative process compared to untreated IVDs in <i>vivo</i> Limitations • MPSS on larger defects (18G puncture and box defect) barely resist normal loading pressures • Sutured do not avoid degenerative process compares to healthy IVDs in <i>vivo</i>

Table 5. *Ex vivo* and *in vivo* studies using suture for AF repair

4.2.2 Adhesives for AF closure

Gluing technique appears as a relevant alternative technique to suturing. An ideal adhesive component for AF closure should exhibit several criteria: ease of application, biocompatibility, appropriate biomechanical properties, tight binding of AF margins, and induction of tissue repair (Table 6). To our knowledge, no comparative studies have been performed to compare the different adhesives developed for AF closure. This could be explained by the fact that authors do not use similar evaluation criterion and models as well as the lack of *in vivo* study render the selection of an appropriate adhesive difficult. Nevertheless, some adhesives seem promising and are discussed below.

An adhesive made of genipin-crosslinked fibrin hydrogel with tunable mechanical properties has been investigated in an *ex vivo* bovine model where a large (4.5 x 4.5 mm) box defect or a 5 mm biopsy punch were made. The adhesive could strongly adhere to the AF tissue thus allowed a tight seal of the defect with no herniation under moderate and rigorous conditions ($0.50 \text{ MPa} \pm 8^\circ$ bending), but only partial restoration of functional and biomechanical properties was achieved (maintenance of disk height but no statistical difference of torque, rotation and nominal axial stress compared to unrepaired group)^{86,87}. The authors suggested a need to enhance the formulation of this adhesive to allow a complete restoration of the IVD biomechanical properties, but this type of adhesive seems promising regarding the limitation of the herniation and should be evaluated in a long-term *in vivo* study. Recently, the same group has developed a biodegradable isocyanate-terminated polyethylene glycol-trimethylene carbonate (PEG-TMC) adhesive which was evaluated in a caprine *ex vivo* model where a 13-gauge needle puncture was performed. This tissue adhesive strongly sealed the puncture wound and no herniation of the NP was found compared to untreated group (under loads up to $\sim 0.4 \text{ MPa}$). However, complete restoration of the mechanical properties was, once more, not achieved⁸⁸. Here again, an *in vivo* evaluation of this adhesive is needed to confirm these results in the natural environment.

Recently, a riboflavin crosslinked high-density collagen gel was evaluated in a small, then a large animal model (Table 6Table 8). The first one was conducted in a 18-gauge needle-punctured rat-tail model where the gel strongly attached to the host AF thus allowing a tight seal of the defect and the retention of the NP. The progression of the IVD degeneration was inhibited for up to 18 weeks of experimentation (modified MRI Pfirrmann grading and histological Han grading systems). However, complete AF healing was not obtained, with only outer AF repair and an inner AF still disrupted^{78,89,90}. In the second *in vivo* study, this adhesive was tested in an ovine model where a defect was created with a 3.2 mm drill bit. Once again, the NP herniation was prevented but, this time, the adhesive had only a mildly effect on prevention of the IVD degeneration (MRI, X-ray, and histological analyses). This could be attributed to the non-organized fibrous tissue synthesized at the injury site which properly sealed the defect but did not present a lamellar structure matching biomechanical properties of AF tissue⁹¹.

Overall, the few *in vivo* evaluations that have been reported on these tissue adhesives are not sufficient to serenely envision their use in clinical trials. Indeed, studies are either conducted in small animal models, where the mechanical forces endured by the treated IVD are uniaxial and inferior to the one in human spine; or in large animal models where the efficiency of the adhesives were proved to be insufficient on their own. Collectively, these data point out the fact that the use of tissue adhesive alone, for larger defect sealing, such as the one occurring during IVD herniation, is challenging. Indeed, the lack of flexibility of these products could be inadequate for a repetitive high-tension area such as the IVD (Table 9).

When used on their own, suturing or gluing techniques are usually not satisfactory for proper AF defect closure, especially in cases of large AF defects. A combination of these two techniques was investigated in a calf *ex vivo* model and showed that the combination of a cyanoacrylate glue plus suture was a more efficient closure technique than adhesive and suture alone. Nonetheless, this combined fixation technique was shown to fail at continuous load, demonstrating its incompatibility for long-term AF sealing⁹². Consequently, sutures and adhesives do not seem to be adequate as a sole treatment strategy but can be considered as a dual attachment system of an implant in an AF defect and this will be reported in the next paragraph.

TISSUE ADHESIVES	MODELS	OUTCOMES
Material Genipin-crosslinked fibrin hydrogel ^{86,87}	Animal model - Cow caudal IVD <i>ex vivo</i> model - Mechanical loading : 14,000 cycles during 6 days of 8 h of dynamic compression up to 0.4 MPa at 0.1 Hz frequency, followed by 16 h of resting static load at 0.2 MPa. 20 cycles of compression from 0.06 MPa to 0.50 MPa at 0.1 Hz, and off injury axis and on injury axis bending to $\pm 8^\circ$ Injury 4,5 x 4,5 mm annulotomy box 5 mm biopsy punch	Benefits - Strong attachment to the AF tissue - Retention of the nucleus Limitations - Only partial restoration of biomechanical properties
Material Isocyanate-terminated polyethylene glycol-trimethylene carbonate (PEG-TMC) ⁸⁸	Animal model - Goat IVD <i>ex vivo</i> model - Mechanical loading: 864,000 cycles during 10 days of 16 h of dynamic compression up to 0.4 MPa at 1Hz, followed by 8 h of resting static load at 0.1 MPa Injury 13-gauge needle puncture	Benefits - Strong attachment to the AF tissue - Retention of the nucleus Limitations - Only partial restoration of biomechanical properties
Material Riboflavin crosslinked high-density collagen ⁷⁸	Animal model - Rat caudal IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 18 weeks Injury 18-gauge needle puncture	Benefits - Strong attachment to the AF tissue - Retention of the nucleus - Cell recruitment and ECM deposition within the adhesive Limitations - Only partial restoration of biomechanical properties <i>ex vivo</i> - Only outer AF repair - Non-organized fibrous tissue synthesized
Material Riboflavin crosslinked high-density collagen ⁹¹	Animal model - Sheep lumbar IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 16 weeks Injury 3.2 mm drill bit puncture	Benefits - Strong attachment to the AF tissue - Retention of the nucleus - Cell recruitment and ECM deposition within the adhesive Limitations - Non-organized fibrous tissue synthesized - No prevention of the IVD degeneration

Table 6. Ex vivo and in vivo studies using tissue adhesives for AF repair

4.2.3 Implants for AF closure

Barrier devices, such as plugs and patches, have been widely investigated for AF closure. Indeed, unlike suture and adhesive, an implant, with tunable shape and mechanical properties, would adequately fill an AF defect without damaging the surrounding tissue and induce cell infiltration to deposit an organized ECM throughout the defect (Table 9). To overcome the lack of clinically effective therapies, a large number of natural and/or synthetic biomaterials for AF closure are currently under investigations.

Natural biomaterials

A wide variety of natural materials have been tested as AF implants, due to their biocompatibility and low cytotoxicity, such as collagen^{93–103}, alginate^{104–109}, chitosan^{102,110}, agarose^{95,111}, silk^{112–117}, hyaluronan (HA)^{118–121}, fibrin^{95,122–124}, small intestine submucosa (SIS)^{125,126}, composites of collagen/HA^{127,128}, alginate/collagen¹²⁹ and alginate/chitosan¹³⁰. Often present in the native ECM, natural materials provide relevant features involved in cell adhesion, migration and matrix deposition. One ideal candidate for AF closure would be a collagen-based implant, since it is the main component of the AF (50 - 70% of dry weight). However, collagens, as well as all the above mentioned natural biomaterials, are known to possess poor mechanical properties, lack stability after being processed from their native forms, are difficult to obtain in large quantities and easily degrade upon sterilization¹³¹. They are usually synthesized in the form of gel or sponges through crosslinking techniques, salt leaching and freeze drying. These types of implants usually lack an anisotropic organisation, and lead after implantation to disorganized fibrous tissue formation with inadequate mechanical properties.

Thus when compared to synthetic scaffold, the poor mechanical properties and lack of organisation of natural implants present a major limitation to their use for closing a tissue like the AF which is subjected to a wide range of mechanical loads¹³¹. However, recently, few studies have successfully produced organized natural materials. For instance, a silk-based multilayered angle-ply construct was developed using a unidirectional freezing technique followed by lyophilization and a methanol treatment. This construct reproduced the multi-lamellar structure of the native AF with each lamella presenting elongated channel opening that were aligned at 30° with opposing directions between lamellae. This organization allowed alignment of porcine AF cells and ECM deposition *in vitro*, but *in vivo* implantations in AF defects need to be achieved to validate this implant in a native environment¹³². In another study, a total IVD construct composed of aligned collagen and alginate hydrogel was created to mimic both the AF and NP, respectively. In this study, a fibril alignment within the collagen gel was induced by contracting the gels around a seeded alginate NP center. They seeded allogenic canine NP and AF cells and implanted the biphasic construct in a beagle cervical model after total discectomy (Table 7). After 16 weeks of implantation, some organized collagen fibers were deposited within the alginate AF construct. However, half of the biphasic scaffolds were displaced, suggesting a lack of

adhesion of the collagen gel with the surrounding tissue^{94,133}. Finally, other researchers have reported a new method of fabrication of a dense, aligned and porous type I collagen scaffolds. These scaffolds were generated using a novel biaxial compression apparatus in association with hydrophilic porogens to create a micro-porosity in the scaffolds. The obtained scaffolds exhibited a collagen density close to that of native AF tissue (~10%/wt compared to 17%/wt in AF), and an alignment of the meso-scale collagen fibers (scale from 200 μm to 1 mm) throughout the scaffold thickness. However, the mechanical properties of these natural materials (modulus up to 3MPa) were still lower than that of the AF native tissue, probably due to the low alignment of collagen fibers at the micro- (1 μm - 100 μm) and nano-scales (< 1 μm)¹³⁴. While, this material did not reproduce the multi-lamellar structure of the native tissue, it might be interesting to see whether such scaffold could be assembled in angle-ply multilayer to mimic more closely the AF biomechanics. Overall, all these new techniques to produce anisotropic natural biomaterials seem promising, further investigations using *in vivo* model in large animals would allow a better assessment of their efficiency and enable a comparison between these new biomaterials.

Synthetic biomaterials

Unlike natural materials, synthetic scaffolds have high and tunable mechanical properties, and usually are easily processed with high repeatability. Numerous synthetic scaffolds have been investigated in the last decade for AF tissue engineering such as polycaprolactone (PCL)^{135–148}, poly (polycaprolactone triol malate) (PPCLM)¹⁴⁹, polyurethane (PU)^{100, 137,150–153}, poly(ether carbonate urethane)-urea (PECUU)^{154–156}, polylactic acid (PLA)^{157–164}, polyglycolic acid (PGA)^{118,119, 162,163,165–167}, polylactic/glycolic acid (PLGA)^{124,168}, polylactic co-trimethylene carbonate (PTMC)^{169–172}, polyethylene glycol (PEG)¹²¹ and polyoctanediol malate (POM)¹⁷³. However, such materials are often criticized for their lack of bioactivity and their poor capacity to support cell attachment, migration and viability¹³¹. Various strategies have been adopted over the years to successfully alleviate these limitations such as surface functionalization with diverse biomolecules, chemical modifications with plasma treatments or supplementation with biological materials. Although there is not a specific biomaterial prevailing over another one^{43, 69,174,175}, numerous *in vitro* investigations have helped understand the crucial parameters required for an AF implant. Particularly, it was early shown *in vitro* that the scaffold architecture and mechanical properties are closely linked to the ECM deposition and the gene expression profile of cells cultured onto the scaffold surface^{51, 113, 144,145, 164,176–182}. Moreover, the implant chosen to replace the AF needs to possess, in the short-term, mechanical properties comparable to the AF tissue, to be able to withstand biomechanical charges until the newly formed ECM takes over. Indeed, in an *in vivo* study, due to the inadequate mechanical properties of some polyethylene barbed implants, all the devices were deformed and displaced from the site of implantation after 6 weeks¹⁸³ (Table 7). Therefore, recent efforts have been made in developing scaffolds mimicking the anatomical features of the AF and matching the biomechanical properties of the native tissue to promote an AF-cell like phenotype and an anisotropic fibrous tissue formation. To this end, techniques like wet-spinning, freeze-drying, electrospinning and

3D printing have extensively been used to produce scaffold for AF repair which allowed the production of implants composed of aligned fibers with a wide range of diameter, from nano- to micro-sized fibers^{137–141, 144,145, 148, 155,156,184}. However, to our knowledge, only two studies reported scaffolds with tensile modulus matching that of a single human AF lamellae (ranging from 31 MPa and to 65 MPa, Table 3). The first material was made of electrospun nano-sized fibers of polycarbonate polyurethane (fibers diameter: 200 - 400 nm) with an uniaxial tensile modulus of 46 MPa¹⁵². The second material was made of electrospun micro-sized PCL fibers (average fibers diameter around 2 μ m) with an average tensile modulus of 50 MPa¹³⁷. On the other hand, only two studies developed bilayers scaffolds with mechanical properties matching the native circumferential tensile modulus of human multi-lamellar AF (ranging from 11 MPa to 29 MPa for the OAF, Table 3). In the first study, a PCL-based electrospun bilayer scaffold was seeded with mesenchymal stem cells (MSCs) and exhibited a 14.2 MPa tensile modulus after 10 weeks of *in vitro* cell culture. In the second study, a gelatine-coated PCL based-bilayer scaffold combining electrospun nano-fibers (670 $\pm$ 350 nm diameter) and 3D printed microfibers (200 μ m diameter) was developed and reached a tensile modulus of 13.2 MPa. To our knowledge, these four studies are the only one that developed biomaterial exhibiting mechanical properties close to the native human AF. Thereby, further experiments need to be performed to obtain a wider range of biomaterials matching native tissue biomechanics.

Despite the lack of adequate mechanical properties of most of the scaffolds produced till now, their intrinsic organization was shown to promoted the alignment of cell, followed by the deposition of an aligned and anisotropic collagen-rich ECM^{137–141, 144,145, 148,184}. Thus, the use of aligned fiber-based implants for AF closure could potentially induce the production of a highly organized tissue *in vivo*. However, due to the relatively new emergence of this field of investigation, there is still a lack of *in vivo* investigations of these implants in an induced-AF defect site. The scarce *in vivo* all highlight one of the most challenging aspects of closing an AF: the proper maintenance of the implant inside the defect⁶⁹. Indeed, the AF tissue is subjected to a wide range of motions and has to contain the pressurized NP material¹³¹; hence, it is mandatory that the implant properly seals the defect while allowing natural motion of the IVD segment. Only one report described the successful development of an implant that does not experience extrusion from the implantation site. Authors have investigated the use of a press-fitting method to anchor a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) sponge in a 1.8 mm circular defect of a rabbit AF (Table 7). This technique seems promising since no extrusion of the implant was observed after 6 months of implantation suggesting a tight fit with the surrounding tissue. However, despite an improvement of the IVD height and a delay of the degenerative process (MRI grading) compared to the untreated group, these parameters were not compared to those of the control group. Moreover, histological staining showed a disorganized regenerated tissue that did not mimic the specific structure of native AF¹⁶⁸. This could suggest that the nature of the implant is not appropriate for the regeneration

of the AF. Nonetheless, the use of press-fitting method to implant a plug inside an AF defect seems promising and could be investigated with more adequate biomaterials presenting an aligned feature.

Overall, the few *in vivo* studies that were carried out on the implantation of a plug in an induced-AF defect, pointed out the importance of the organization and mechanical properties of the implants and its adhesion to the surrounding tissue. Indeed these properties are mandatory to induce an aligned fibrous tissue deposition within the defect, and to properly maintain the implant inside the defect during the natural motion of the spine. There is a need of a combined strategy to induce better sealing of an AF defect, such as a combination of suture and/or adhesive technology with the plug and patch systems.

IMPLANTS	MODELS	OUTCOMES
Natural Material Composite of contracted collagen gel (AF) + alginate gel (NP) ¹³³	Animal model - Beagle cervical IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 16 weeks Injury - Total discectomy	Benefits - Aligned fibrous tissue deposit in AF part of the implant - Cartilaginous matrix deposition in NP part of the implant - Retention of IVD height and hydration compare to untreated group Limitations - Half of the implants displaced upon implantation - Decrease of hydration and IVD height from 4 weeks to 16 weeks - Lower IVD height and hydration compare to healthy group
Synthetic Material Barbed polyethylene closure system ¹⁸³	Animal model - Goat lumbar IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 6 weeks Injury 3 mm circular defect	Benefits - Withstand axial compression forces over 1,000 N Limitations - Majority of implants deformed or displaced
Synthetic Material Poly(lactic-co-glycolic acid) sponge ¹⁶⁸	Animal model - Rabbit lumbar IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 26 weeks Injury 1.8 mm mini-trephine puncture	Benefits - Cell recruitment and ECM deposition within implant - No extrusion of implant - Delay of degenerative process compare to untreated group Limitations - Non-organized fibrous tissue synthesized - Higher IVD degeneration compares to healthy group

Table 7. *Ex vivo* and *in vivo* studies using implants for AF repair

4.2.4 Combined strategies for AF closure

Combining two or more closure strategies for AF repair appears as a relevant approach since it could integrate each strategy benefit (tissue repair induction, strong adhesion to native tissue...) while alleviate some of their limitations (leakage, dislocation, limited cell infiltration...). This section will review the combined strategies that have been reported in the literature for AF closure.

First, to limit the dislocation of the implant, a dual device composed of a small intestinal submucosa (SIS) implant and patch which can be anchored to the surrounding vertebrae with titanium bone screws has been developed (Table 8). After implantation in an ovine model for up to 26 weeks, authors reported a substantial closure of the AF and a reduction of the degeneration process when compared to the annulotomy group. However, the newly synthesized fibrous tissue did not present the specific organization of the native AF and the MRI grading was inferior to that of the control group. Moreover, the screw used to attach the implant induced undesirable osteophyte formation that would be a concern for clinical translatability¹²⁶. Taken together, although the strategy seems promising, the architecture of the patch and the anchoring system need to be optimized to allow the formation of an organized fibrous tissue with no side effect on the surrounding bone.

Suturing was used to implant a triphasic composite to the inner region of an AF defect in an *in vivo* ovine model. This implant was made of two outer phases of absorbable melt-spun PGA and a centric phase of non-absorbable warp knitted polyvinylidene fluoride (PVDF) mesh (Table 8). After 12 weeks of implantation, this construct promoted native cell infiltration and enhanced fibrous repair tissue formation while accurately sealing the defect without any implant dislocation¹⁶⁵. However, despite the prevention of the dislocation, this suturing technique, performed in the inner portion of the AF, was reported to be challenging. Indeed, due to the limited access to the inner tissue, multiple suturing attempts were required which led to numerous damages to the AF adjacent to the defect.

The fibrin-genipin adhesive, previously presented in this review, was tested to attached a photo-crosslinkable poly(trimethylene carbonate) (PTMC) implant to the surrounding AF tissue in an *ex vivo* bovine model (Table 8). The defect was filled with a fibrin-genipin loaded PTMC scaffold then a polyurethane (PU) patch was sutured on top of a bovine AF defect. This *ex vivo* model showed that the glue strongly adhere to native tissue however it was not sufficiently attached to the PTMC implant to withstand the pressure of the NP during moderate loading (0.50 MPa) and implant dislocation was seen⁸⁷. In another study, the same type of adhesive was used in an *ex vivo* bovine model in which a 2 mm circular defect was filled with the adhesive and closed with a silk-fleece composite (Table 8). The glue was able to hold the silk fleece membrane in place and prevent NP herniation during complex loading (0.2MPa $\pm$ 2° bending). However, the IVD height was not restored in the repaired group and the histological analyses showed no cell recruitment within the adhesive after 14 days of organ culture which will hinder its use for AF tissue regeneration *in vivo*¹⁸⁵.

A riboflavin crosslinked high-density collagen gels that successfully sealed AF defects but did not induced organized fibrous tissue formation was previously reported in this review⁹¹. The same group managed to produce an aligned collagen gel which upon implantation allowed organized collagen fibers deposition within the AF construct but numerous dislocation from the site of implantation was reported⁹⁴. We can then postulate that a combination of these two studies could be of interest. Indeed, creating an organized riboflavin crosslinked collagen gels could allow the formation of an organized collagenous gel that would strongly attached to the surrounding tissue. The riboflavin gel could also be used as a sealant to attach the organized collagen gel to the surrounding AF tissue.

Finally, in another study the combination of a non-absorbable suture (SURGIPRO™) and a commercial cyanoacrylate glue (LiquiBand™) has been recently tested for the fixation of a complex multi-lamellar PCL nano/microfibrous scaffold to a porcine AF defect (Table 8). The implant, reported earlier in this review, combine electrospinning and 3D printing technology and was inserted 1-2 mm deeper than the opening of the defect. The opening of the defect was subsequently filled with glue and covered by a piece of fascia. The defect was then closed tightly using the MPSS modified suture technique as discussed earlier in this review. The combined fixation method seems to avoid dislocation of the implant up to 12 weeks after implantation, with no infiltration of the glue inside the scaffold. The retention of the implant in the defect allowed the deposition of aligned collagen fibers on the nanofibrous layers and this new organized tissue seems to be well integrated with the surrounding, at least from a histological point of view. Moreover, this combined strategy for AF closure seems to have reduced the degeneration process, with only moderate degeneration, compared to the severely degenerated unrepaired group (MRI Pfirrmann grading system)^{186,187}. In regard to this preliminary results, this strategy seems to be one of the most promising one for the proper closure and regeneration of AF defects. Optimization of the implant and longer *in vivo* evaluation could be considered to limit the inflammatory reaction seen around the scaffold and to allow complete repair of the defect and reduction of degeneration.

COMBINED STRATEGIES	<i>In vivo</i> model	Outcomes
Material Small intestinal submucosa (SIS) implant + SIS Patch + Titanium screws to anchor patch to vertebrae ¹²⁶	Animal model • Sheep lumbar IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 26 weeks Injury - 4 x 8 mm annulotomy box	Benefits • No extrusion of implant • Cell recruitment and ECM deposition within implant • Strong attachment to the AF tissue • Reduction of the degenerative process compare to untreated group Limitations • Non-organized fibrous tissue synthesized • Higher IVD degeneration compares to healthy group • Osteophyte formation where the screw was used
Material Absorbable polyglycolic acid (PGA) + non-absorbable polyvinylidene fluoride (PVDF) implant + 4.0 non absorbable suture ¹⁶⁵	Animal model • Sheep lumbar IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 12 weeks Injury - 3,5 x 3,5 mm annulotomy box	Benefits • No extrusion of implant • Cell recruitment and ECM deposition within implant Limitations • Non-organized fibrous tissue synthesized • Damaged of adjacent AF at puncture site
Material Photo-crosslinkable poly(trimethylene carbonate) (PTMC) implant + genipin-crosslinked fibrin adhesive + polyurethane (PU) patch + suture ⁸⁷	Animal model • Cow caudal IVD <i>ex vivo</i> model - Mechanical loading : 20 cycles of compression from 0.06 MPa to 0.50 MPa at 0.1 Hz, and bending to $\pm 8^\circ$ Injury - 5 mm biopsy punch	Benefits • Strong attachment between adhesive and native AF tissue Limitations • No sufficient attachment between adhesive and PTMC implant • Implant dislocation at moderate loading 0.50MPa
Material Genipin-crosslinked fibrin adhesive + silk fleece-membrane patch ¹⁸⁵	Animal model • Cow caudal IVD <i>ex vivo</i> model - Mechanical loading : - Static loading: 14 days of 8 h compression at 0.2 MPa at 0.2 Hz - Complex loading: 14 days of 8 h compression at 0.2MPa at 0.2 Hz and bending to $\pm 2^\circ$ Injury - 2 mm biopsy punch	Benefits • Strong attachment between adhesive and native AF tissue • Retention of the nucleus Limitations • No cell recruitment within the adhesive • No restoration of IVD height in the repaired group

Material Multilamellar polycaprolactone implant + 4.0 non-absorbable suture + cyanoacrylate glue¹⁸⁷	Animal model • Pig lumbar IVD <i>in vivo</i> model - Duration: 13 weeks Injury - 4 mm biopsy punch defect	Benefits • No extrusion of implant • No infiltration of glue inside the scaffold • Cell recruitment and aligned collagen deposition on nanofibers • Integration of newly formed tissue with surrounding AF - Reduction of the degenerative process compare to untreated group Limitations • Inflammatory reaction around scaffold • Incomplete repair of the defect • Higher IVD degeneration compared to control group
---	---	---

Table 8. *Ex vivo* and *in vivo* studies using combined strategies for AF repair

Strategies for AF closure	Advantages	Disadvantages
<i>Suture</i>	Tissue margins closely approximated Adequate for small and large defects Good tensile strength	No proof of long-term proper sealing of AF defect Do not restore full AF mechanical properties Hard to put in place in limited access area Permanent stretching of tissue margins Risk of additional AF tearing at the needle puncture site
<i>Tissue adhesive</i>	Ease of use in limited access areas Strong adhesion to surrounding tissue	No proof of long-term proper sealing of AF defect Do not restore full AF mechanical properties High stiffness not adequate for the IVD high tension area Potential chemical instability
<i>Implant</i>	Adequate to fill an AF defect Tunable shape Tunable mechanical properties Guide cell infiltration Guide anisotropic tissue formation	Weak adhesion to native AF tissue - displaced from the defect Do not promote full thickness repair

Table 9. Strategies for treatment of AF defect.

5 Discussion and future work

Overall, all *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* investigations that have been carried out in the last decade have allowed a better understanding of the crucial parameters required for the proper repair of the complex AF tissue. In this review, we reported on one side the development of appropriate sealing techniques that prevented implants dislocation despite the harsh mechanical environment of the IVD, while on the other side, few research teams have produced highly organized implants that induce host cells infiltration followed by an anisotropic ECM deposition. The combination of these two crucial aspects of AF closure and repair seems promising and could produce an ideal biological annular repair strategy and should be investigated in the near future, in long-term studies performed in large and appropriate animal models.

However, despite the promising results of AF repair strategies, it is important to note that, to our knowledge, in the few *in vivo* experiments reported in the literature, no full thickness annular repair was ever obtained, and the inner AF was often left unrepaired. This might suggest that the developed biomaterials could be appropriate for the outer repair but are insufficient for the inner closure. To our knowledge no study has attempt to develop highly organized biphasic scaffold to mimic the structural gradient of the native tissue. While natural biomaterials are often reported to mismatch mechanical properties of OAF, they could actually be of interest for the inner part of a scaffold, which is less dense and has lower mechanical properties than the OAF³⁰. We might consider the use of organized natural biomaterials mentioned in this review, such as a silk-based multilayered angle-ply construct or an aligned and porous type I collagen scaffolds that might present relevant features that could enhance the production of an aligned matrix deposition in the IAF compared to synthetic scaffolds. In this context, the development and the combination of 3D printing technology and electrospinning could be a real opportunity to closely replicate the gradient of composition of the native AF tissue. It could allow the creation of a continuous compositional gradient throughout the scaffold, from synthetic to natural material, from nano- to micro-sized fibrous scaffold, from high to low concentration of material and/or cells and/or bioactive molecules, while depositing aligned fibers with specific orientation mimicking the complex organization of the native tissue (Figure 4).

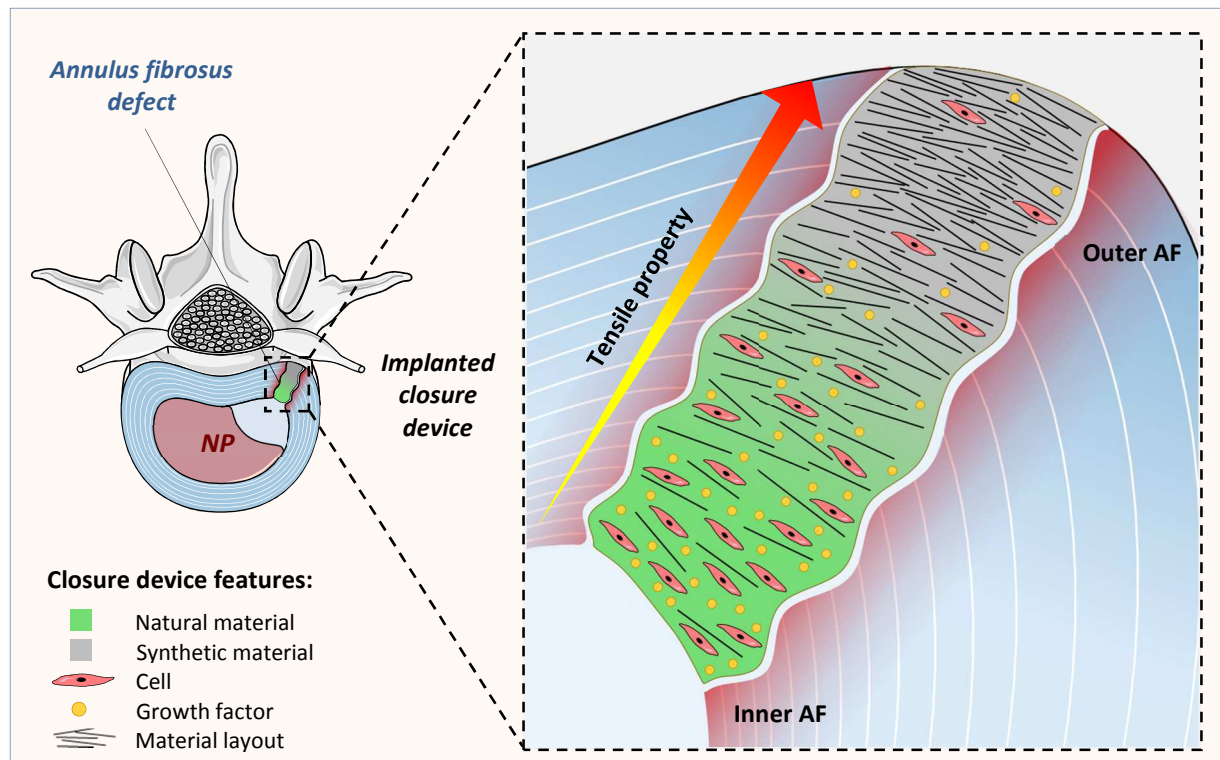


Figure 4. Ideal structure and composition of an AF closure device. Due to the complex intrinsic nature of the AF, an ideal AF closure device should present a continuous compositional gradient throughout its thickness. On one side, the outer part of the implant should have high tensile properties to resist the AF harsh mechanical environment. Such devices are usually obtained using highly organized synthetic-based scaffolds. On the other side, the inner part of the implant should present biological cues to promote AF repair, which is limited in this area. Such a device could be obtained using a naturally-based material possessing biological cues such as cells and/or growth factors. The use of technologies such as 3D printing and/or electrospinning could allow the design of this dual and gradual closure device.

The lack of tissue repair in the inner part of implants could also be attributed to the hypo-cellular nature of the AF tissue in combination with a relatively slow process of natural cell migration toward and throughout the biomaterials. This could suggest the need to adopt a transformative strategy where cells and/or biologically active molecules could be added to the inner part of scaffolds to accelerate uniform and continuous annular repair. Once again, the use of 3D printing seems ideal to create a gradient of concentration of cells and/or bioactive molecules within an organized scaffold. Different cell sources can be considered for AF repair strategy. Autologous AF cells would be an ideal candidate for AF tissue engineering, since they will elicit minimum to no immune response and are terminally differentiated, thus able to produce an appropriate ECM. However, there is a limited availability of these cells in the hypocellular degenerated IVD²⁸. Using these cells would require long *in vitro* expansion, which is not recommended considering that AF cells are known to rapidly lose their phenotype when cultured in 2D *in vitro* conditions^{188,189}. To prevent the differentiation during 2D expansion, few research teams have tried to develop *in vitro* 3D environments that would preserve AF phenotype^{8, 94, 189, 190}. However, to our knowledge, no appropriate culture microenvironment has yet been reported. Moreover, harvesting autologous cells from healthy IVDs is not advisable since it would damage the donor IVD, thus inducing a degeneration process in the harvested IVD, which would present a major limitation to the use of AF cells for annular TE therapy.

An alternative strategy to the autologous AF cells is the use of mesenchymal stem cells, either bone marrow stem cells (BMSCs) or adipose stem cells (ASCs)^{99, 140, 146, 191}. Stem cells are already used in a wide range of tissue engineering fields, due to their fast proliferation, their availability and ease of accessibility. It is important to note that ASCs have gaining more and more attention in the last decades since they are found in higher amount than MSCs in bone marrow (incidence of one ASCS per 10³ nucleated cells in adipose tissue vs one BMSC per 10⁵ nucleated cells in bone marrow) and the harvesting process is less invasive than for BMSCs collection¹⁹¹. MSCs can be use undifferentiated or in differentiated states. However, when undifferentiated cells are used, the *in vivo* differentiation of the delivered stem cells is not controlled and the uncertainty regarding the final phenotype of cells represents a high risk of repair failure. On the other hand, the differentiation of MSCs into AF cells is, to our knowledge, not yet well defined and the lack of conclusive phenotypic markers of AF cells makes it difficult to appropriately understand and control MSCs fate commitment into AF cells. However, it is worth mentioning, that more and more studies are focusing on the AF cells characterization that might enable in the future the use of such therapies. Yet, to this date, the uncertainty concerning the final cell phenotype, the time consuming *in vitro* culture needed to obtain sufficient amount of cells and the risks factors arising from multiples surgical interventions (harvesting and implantation), therefore the cost of stem cell-based tissue-engineering, render the use of cell delivery therapies to repopulate a defected site of an AF extremely complex.

Finally, the discovery of endogenous progenitor cells within the AF of rats, minipigs, rabbits and humans recently opened up new therapeutic approaches for AF repair. These slowly proliferative cells present stem cell surface markers and are observed in the AF region of both non-degenerative and degenerative specimens^{177, 192–194}. In addition, stem cells were also located near the perichondrium region and the AF ligament anchoring, suggesting the presence of a stem cell niche. Further investigations demonstrated a possible migration route of the stem cells from these regions into the IVD^{195–197}. Hence, recruiting these endogenous cells at the unrepaired defect site appears as an alternate and attractive new strategy for complete AF repair. It is suggested that the spontaneous recruitment of these cells is achieved when cells within a damaged tissue release attracting signals including growth factors, cytokines and chemokines¹⁹⁸. Studies are currently trying to elucidate which chemokines are involved in spontaneous AF tissue healing and stem cell migration, and it was recently shown that herniated IVD expressed chemokines including CXCL10 and CCL5^{199, 200}. Furthermore, *in vitro* studies have demonstrated that human AF cells are responsive to CXCL10 and CCL5^{201, 202}, thus these biological factors could also be used to induce migration among native cells toward the inner part of the AF to promote its regeneration. However, a recent 14 days bovine *ex vivo* organ culture and a 14 weeks pilot ovine *in vivo* study in which biopsy punch defects (2 mm diameter, 7 mm depth) were filled with fibrin gels containing CCL5 have shown no improvement of healing process within the defect nor AF cell migration toward the defect site. Further studies needs to verify these results using another delivery system more conductive

to cell motility. Importantly, these chemokines also target immune cells (monocytes, macrophages, T cells...), which have been shown to be recruited into the herniated and degenerated IVD and play a major role in the regenerative process²⁰³. Ultimately, attracting progenitor cells, stem cells, native AF cells as well as immune cells within the non-repaired IAF might be promising to promote tissue ingrowth in this region. However, there is a fine line between tissue repair and chronic inflammation activation. Indeed, macrophages were also correlated with IVD degeneration and discogenic pain²⁰⁴, which means that careful consideration needs to be taken when evaluating the use of chemokines for the IAF repair.

Other bioactive factors, involved in tissue homeostasis, could be considered for delivery within an inner AF defect such as N-terminal peptide of Link Protein (Link N) and growth factors (GF), including morphogenic and mitogenic GFs, which stimulate the production of proteoglycans and collagen and increase AF cell proliferation. The use of GF for AF repair is of growing interest and various reviews have reported a variety of molecules that can stimulate proliferation and ECM production of AF cells *in vitro*^{205,206} including mitogenic GFs such as insulin-like growth factor-1 (IGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF)^{207,208} and morphogenic GFs such as transforming growth factor-beta (TGF- β) and bone morphogenetic protein (BMP) (BMP-7/osteogenic protein-1 (OP-1), BMP13 and BMP 14/GDF-5)^{127, 161,207–221}. However, promising results of scarce *in vivo* injections in annular defect of molecules such as Link-N^{222–224} OP-1^{221,225}, BMP-13²¹⁰, GDF-5²²⁶ and Platelet-Rich Plasma (PRP)^{227–229}, render comparison between bioactive factors and confirmation of their efficiency and safety extremely difficult. . Finally, the half-time of a growth factor protein is known to be short, which means that multiple GF injections would be necessary for such a treatment, elevating the risk of damaging furthermore the AF and accelerating the degeneration process²³⁰. Sustained/controlled delivery systems and scaffolds appear as an attractive therapeutic approach to deliver GFs in a timely and spatially controlled manner and should be investigated for AF repair.

Gene therapy for AF repair has also been suggested as an attractive therapy. Different genes of interest were delivered *via* viral vectors system (lentivirus or adenovirus) and were either transfected into cells *in vitro* or injected in the IVD *in vivo*. Promising results on gene coding for BMPs⁷⁶, chondrocyte transcription factors Sox-9^{214,231}, LIM mineralization protein-1 (LMP-1) which regulates BMP-2 and OP-1²³², TGF- β , CTGF and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)²³³ have been obtained. However, despite the attractive long term and constant release of a targeted molecule with gene therapy, this strategy presents some concerns. Indeed, the use of viral vectors as a mean to deliver a gene of interest has a high risk of transfection in other tissues, especially when AF is ruptured and cannot prevent leakage. The combination of gene therapy with an implant could however be a promising strategy to ensure a sustained and controlled release into the IVD.

6 Conclusion

The *Annulus fibrosus* is a complex and fundamental structure of the IVD. Impairments of AF structure lead to IVD herniation and is believed to be involved in discogenic back pain and IVD degeneration. In the last decade, engineering of new biomaterials for annular closure and repair have gained interest since it is essential for successful discectomy procedures and could slow down the degeneration process. Multiple approaches, using natural or synthetic scaffold, have been developed to repair the AF region and enable the unveiling of crucial criteria required for the proper repair of this tissue. Hence, suitable closure devices were shown to require an anisotropic fibrous architecture mimicking as closely as possible the AF native structure to provide appropriate mechanical properties to resist deformation during lifetime and guide the neo-formation of a highly organized tissue matching native structure. The scarce *in vivo* studies evaluating these biomaterials often revealed a lack of integration with surrounding AF tissue which highlight the need of development of strategies that combined sealing and repairing approaches for AF treatment. Finally, approaches based on cell recruitment, similarly to what is being developed for other tissue repair, could open up a new area for AF repair strategy and allow complete repair of AF tissue.

7 Bibliography

1. Mariconda, M., Galasso, O. & Milano, C. Frequency and clinical meaning of long-term degenerative changes after lumbar discectomy visualized on imaging tests. *Eur Spine J* **19**, 136–143 (2010).
2. Schroeder, J. E., Dettori, J. R., Brodt, E. D. & Kaplan, L. Disc degeneration after disc herniation : are we accelerating the process ? *Evid Based Spine Care J* **3**, 33–40 (2012).
3. Carragee, E. J., Don, A. S., Hurwitz, E. L., Cuellar, J. M., Carrino, J. A. & Herzog, R. ISSLS Prize Winner: Does Discography Cause Accelerated Progression of Degeneration Changes in the Lumbar Disc A Ten-Year Matched Cohort Study. *Spine* **34**, 2338–2345 (2009).
4. Carragee, E. J., Spinnickie, A. O., Alamin, T. F. & Paragioudakis, S. A prospective controlled study of limited versus subtotal posterior discectomy: short-term outcomes in patients with herniated lumbar intervertebral discs and large posterior anular defect. *Spine* **31**, 653–657 (2006).
5. Yorimitsu, E., Chiba, K., Toyama, Y. & Hirabayashi, K. Long-term outcomes of standard discectomy for lumbar disc herniation: a follow-up study of more than 10 years. *Spine* **26**, 652–657 (2001).
6. Lebow, R. L., Adogwa, O., Parker, S. L., Sharma, A., Cheng, J. & McGirt, M. J. Asymptomatic same-site recurrent disc herniation after lumbar discectomy results of a prospective longitudinal study with 2-year serial imaging. *Spine* **36**, 2147–2151 (2011).
7. McGirt, M. J., Garcés Ambrossi, G. L., Datto, G., Sciubba, D. M., Witham, T. F., Wolinsky, J. P., Gokaslan, Z. L. & Bydon, A. Recurrent disc herniation and long-term back pain after primary lumbar discectomy: review of outcomes reported for limited versus aggressive disc removal. *Neurosurgery* **64**, 338–344 (2009).
8. Saad, L. & Spector, M. Effects of collagen type on the behavior of adult canine annulus fibrosus cells in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Biomed Mater Res* **71A**, 233–241 (2004).
9. Bogduk, N. The intervertebral joint and the intervertebral discs. in *Clinical Anatomy of the Lumbar Spine and Sacrum* (ed. Elsevier Health Sciences) 15–21 (2005).
10. Silva-Correia, J., Correia, S. I., Oliveira, J. M. & Reis, R. L. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotechnol Adv* **31**, 1514–1531 (2013).

11. Sharan, A. D., Tang, S. Y. & Vaccaro, A. R. Anatomy and physiology of the intervertebral disc. in *Basic Science of Spinal Diseases* (ed. Jaypee Brothers Medical Publishers) 3–61 (2013).
12. Moore, R. J. The vertebral endplate: Disc degeneration, disc regeneration. *Eur Spine J* **15**, 333–337 (2006).
13. Brodin, H. Paths of nutrition in articular cartilage and intervertebral discs. *Acta Orthop Scand* **24**, 177–183 (1955).
14. Choi, K. S., Cohn, M. J. & Harfe, B. D. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: Implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev Dyn* **237**, 3953–3958 (2008).
15. McCann, M. R. & Séguin, C. A. Notochord Cells in Intervertebral Disc Development and Degeneration. *J Dev Biol* **4**, 1–18 (2016).
16. Cassinelli, E. H. & Kang, J. D. Current Understanding of Lumbar Disc Degeneration. *Oper Tech Orthop* **10**, 254–262 (2000).
17. Tow, B. P. B., Hsu, W. K. & Wang, J. C. Disc regeneration: a glimpse of the future. *Clin Neurosurg* **54**, 122–8 (2007).
18. Roughley, P. J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine* **29**, 2691–2699 (2004).
19. Colombier, P., Camus, A., Lescaudron, L., Clouet, J. & Guicheux, J. Intervertebral disc regeneration: A great challenge for tissue engineers. *Trends Biotechnol* **32**, 433–435 (2014).
20. Postacchini, F. Anatomy and pathomorphology. in *Lumbar Disc Herniation* (ed. Springer Science & Business Media) 17–131 (2012).
21. Humzah, M. D. & Soames, R. W. Human intervertebral disc: structure and function. *Structure* **356**, 337–356 (1988).
22. Johnson, E. F., Chetty, K., Moore, I. M., Stewart, a & Jones, W. The distribution and arrangement of elastic fibres in the intervertebral disc of the adult human. *J Anat* **135**, 301–9 (1982).
23. Inoue, H. & Takeda, T. Three-dimensional observation of collagen framework of lumbar intervertebral discs. *Acta Orthop Scand* **46**, 949–956 (1975).
24. Whatley, B. R. & Wen, X. Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration. *Mater Sci Eng C* **32**, 61–77 (2012).
25. Clarke, I. C. Articular cartilage: a review and scanning electron microscope study. 1. The interterritorial fibrillar architecture. *J Bone Joint Surg Br* **53**, 732–750 (1971).
26. Yu, J., Fairbank, J. C. T., Roberts, S. & Urban, J. P. G. The elastic fiber network of the anulus fibrosus of the normal and scoliotic human intervertebral disc. *Spine* **30**, 1815–1820 (2005).
27. Zhao, C. Q., Wang, L. M., Jiang, L. S. & Dai, L. Y. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev* **6**, 247–261 (2007).
28. Maroudas, A., Stockwell, R. A., Nachemson, A. & Urban, J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J Anat* **120**, 113–130 (1975).
29. Errington, R. J., Puustjarvi, K., White, I. R., Roberts, S. & Urban, J. P. Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc. *J Anat* **192**, 369–378 (1998).
30. Bruehlmann, S. B., Rattner, J. B., Matyas, J. R. & Duncan, N. A. Regional variations in the cellular matrix of the Annulus fibrosus of the intervertebral disc. *J Anat* **201**, 159–171 (2002).
31. Hastreiter, D., Ozuna, R. M. & Spector, M. Regional variations in certain cellular characteristics in human lumbar intervertebral discs , including the presence of a-smooth muscle actin. *J Orthop Res* **19**, 597–604 (2001).
32. Holzapfel, G. A., Schulze-Bauer, C. A. J., Feigl, G. & Regitnig, P. Single lamellar mechanics of the human lumbar anulus fibrosus. *Biomech Model Mechanobiol* **3**, 125–140 (2005).

33. Long, R., Torre, O., Hom, W., Assael, D. & Iatridis, J. Design requirements for annulus fibrosus repair: review of forces, displacements and material properties of the intervertebral disc and a summary of candidate hydrogels for repair. *J Biomech Eng* **138**, 1–14 (2016).
34. Clouet, J., Vinatier, C., Merceron, C., Pot-Vaucel, M., Hamel, O., Weiss, P., Grimandi, G. & Guicheux, J. The intervertebral disc: From pathophysiology to tissue engineering. *Jt Bone Spine* **76**, 614–618 (2009).
35. Bron, J. L., Helder, M. N., Meisel, H. J., Van Royen, B. J. & Smit, T. H. Repair, regenerative and supportive therapies of the annulus fibrosus: Achievements and challenges. *Eur Spine J* **18**, 301–313 (2009).
36. Sztrolovics, R., Grover, J., Cs-Szabo, G., Shi, S. L., Zhang, Y., Mort, J. S. & Roughley, P. J. The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J Orthop Res* **20**, 257–266 (2002).
37. Johnstone, B., Markopoulos, M., Neame, P. & Caterson, B. Identification and characterization of glycanated and non-glycanated forms of biglycan and decorin in the human intervertebral disc. *Biochem J* **292**, 661–6 (1993).
38. Roughley, P. J., White, R. J., Magny, M. C., Liu, J., Pearce, R. H. & Mort, J. S. Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. *Biochem J* **295**, 421–6 (1993).
39. Adams, P., Eyre, D. & Muir, H. Biochemical aspects of development and ageing of human lumbar intervertebral discs. *Rheumatol Rehabil* **16**, 22–29 (1977).
40. Adams, P. & Muir, H. Qualitative changes with age of proteoglycans of human lumbar discs. *Ann Rheum Dis* **35**, 289–96 (1976).
41. Singh, K., Masuda, K., Thonar, E. J.-M. A., An, H. S. & Cs-Szabo, G. Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and anulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine* **34**, 10–16 (2009).
42. Sztrolovics, R., Alini, M., Mort, J. S. & Roughley, P. J. Age-related changes in fibromodulin and lumican in human intervertebral discs. *Spine* **24**, 1765–71 (1999).
43. Jin, L., Shimmer, A. L. & Li, X. The challenge and advancement of annulus fibrosus tissue engineering. *Eur Spine J* **22**, 1090–1100 (2013).
44. Mikawa, Y., Hamagami, H., Shikata, J. & Yamamuro, T. Elastin in the human intervertebral disk. A histological and biochemical study comparing it with elastin in the human yellow ligament. *Arch Orthop Trauma Surg* **105**, 343–349 (1986).
45. Yu, J., Tirlapur, U., Fairbank, J., Handford, P., Roberts, S., Winlove, P. C., Cui, Z. & Urban, J. Microfibrils, elastin fibres and collagen fibres in the human intervertebral disc and bovine tail disc. *J Anat* **210**, 460–471 (2007).
46. Shankar, H., Scarlett, J. A. & Abram, S. E. Anatomy and pathophysiology of intervertebral disc disease. *Tech Reg Anesth Pain Manag* **13**, 67–75 (2009).
47. Brown, M. F., Hukkanen, M. V., McCarthy, I. D., Redfern, D. R., Batten, J. J., Crock, H. V., Hughes, S. P. & Polak, J. M. Sensory and sympathetic innervation of the vertebral endplate in patients with degenerative disc disease. *J Bone Jt Surgery, Br Vol* **79**, 147–153 (1997).
48. Nachemson, A., Lewin, T., Maroudas, A. & Freeman, M. A. R. In Vitro Diffusion of DYE Through the End-Plates and the Annulus Fibrosus of Human Lumbar Inter-Vertebral Discs. *Acta Orthop Scand* **41**, 589–607 (1970).
49. Roberts, S., Urban, J. P., Evans, H. & Eisenstein, S. M. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. *Spine* **21**, 415–420 (1996).
50. Urban, J. P., Holm, S., Maroudas, A. & Nachemson, A. Nutrition of the intervertebral disk. An in vivo study of solute transport. *Clin Orthop Relat Res* 101–114 (1977).
51. Ishihara, H., McNally, D. S., Urban, J. P. & Hall, A. C. Effects of hydrostatic pressure on matrix in different regions of the intervertebral synthesis disk. *J Appl Physiol* **80**, 839–46 (1996).
52. Kurtz, S. M. & Edidin, A. A. Structure and properties of soft tissues in the spine. in *Spine Technology*

Handbook (ed. Elsevier) 35–60 (2006).

53. Shapiro, I. M. & Risbud, M. V. Introduction to the Structure, Function, and Comparative Anatomy of the Vertebrae and the Intervertebral Disc. in *The Intervertebral Disc: Molecular and Structural Studies of the Disc in Health and Disease* (ed. Springer science & business media) 3–15 (2013).
54. Adams, M. A. & Green, T. P. Tensile properties of the annulus fibrosus. I. The contribution of fibre-matrix interactions to tensile stiffness and strength. *Eur Spine J* **2**, 203–208 (1993).
55. O’Connell, G. D., Guerin, H. L. & Elliott, D. M. Theoretical and Uniaxial Experimental Evaluation of Human Annulus Fibrosus Degeneration. *J Biomech Eng* **131**, 1–19 (2009).
56. O’Connell, G. D., Sen, S. & Elliott, D. M. Human annulus fibrosus material properties from biaxial testing and constitutive modeling are altered with degeneration. *Biomech Model Mechanobiol* **11**, 493–503 (2012).
57. Ebara, S., Iatridis, J. C., Setton, L. a, Foster, R. J., Mow, V. C. & Weidenbaum, M. Tensile properties of nondegenerate human lumbar anulus fibrosus. *Spine* **21**, 452–461 (1996).
58. Acaroglu, E. R., Iatridis, J. C., Setton, L. a, Foster, R. J., Mow, V. C. & Weidenbaum, M. Degeneration and aging affect the tensile behavior of human lumbar anulus fibrosus. *Spine* **20**, 2690–2701 (1995).
59. Shan, Z., Li, S., Liu, J., Mamuti, M., Wang, C. & Zhao, F. Correlation between biomechanical properties of the annulus fibrosus and magnetic resonance imaging (MRI) findings. *Eur Spine J* **24**, 1909–1916 (2015).
60. Choi, Y.-S. Pathophysiology of degenerative disc disease. *Asian Spine J* **3**, 39–44 (2009).
61. Ramani, P. Section 2: Basic knowledge in lumbar disc herniation. in *Textbook of Surgical Management of Lumbar Disc Herniation* (ed. JP Medical Ltd) 11–50 (2013).
62. Chiang, C.-J., Cheng, C.-K., Sun, J.-S., Liao, C.-J., Wang, Y.-H. & Tsuang, Y.-H. The effect of a new anular repair after discectomy in intervertebral disc degeneration: an experimental study using a porcine spine model. *Spine* **36**, 761–769 (2011).
63. Key, J. A. & Ford, L. T. Experimental intervertebral-disc lesions. *J Bone Joint Surg Am* **30A**, 621–630 (1948).
64. Adams, M. A. & Hutton, W. C. The mechanics of prolapsed intervertebral disc. *Int Orthop* **6**, 249–253 (1982).
65. Adams, M. A., Freeman, B. J., Morrison, H. P., Nelson, I. W. & Dolan, P. Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration. *Spine* **25**, 1625–1636 (2000).
66. Yu, C. Y., Tsai, K. H., Hu, W. P., Lin, R. M., Song, H. W. & Chang, G. L. Geometric and morphological changes of the intervertebral disc under fatigue testing. *Clin Biomech* **18**, 3–9 (2003).
67. Iatridis, J. C., MacLean, J. J. & Ryan, D. A. Mechanical damage to the intervertebral disc annulus fibrosus subjected to tensile loading. *J Biomech* **38**, 557–565 (2005).
68. Callaghan, J. P. & McGill, S. M. Intervertebral disc herniation: Studies on a porcine model exposed to highly repetitive flexion/extension motion with compressive force. *Clin Biomech* **16**, 28–37 (2001).
69. Guterl, C. C., See, E. Y., Blanquer, S. B. G., Pandit, A., Ferguson, S. J., Benneker, L. M., Grijpma, D. W., Sakai, D., Eglin, D., Alini, M., Iatridis, J. C. & Grad, S. Challenges and strategies in the repair of ruptured Annulus fibrosus. *Eur Cell Mater* **25**, 1–21 (2013).
70. Dittmar, R., van Rijsbergen, M. M. & Ito, K. Moderately Degenerated Human Intervertebral Disks Exhibit a Less Geometrically Specific Collagen Fiber Orientation Distribution. *Glob spine J* **6**, 439–446 (2016).
71. Marchand, F. & Ahmed, A. M. Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus. *Spine* **15**, 402–410 (1990).
72. Simunic, D. I., Broom, N. D. & Robertson, P. a. Biomechanical factors influencing nuclear disruption of the intervertebral disc. *Spine* **26**, 1223–1230 (2001).
73. Simunic, D. I., Robertson, P. A. & Broom, N. D. Mechanically induced disruption of the healthy bovine intervertebral disc. *Spine* **29**, 972–978 (2004).

74. Fusellier, M., Clouet, J., Gauthier, O., Le Visage, C. & Guicheux, J. Animal models and imaging of intervertebral disc degeneration. in *Gene and Cell Delivery for Intervertebral Disc Degeneration* (ed. CRC Press) (2017).
75. Martin, J. T., Gorth, D. J., Beattie, E. E., Harfe, B. D., Smith, L. J. & Elliott, D. M. Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res* **31**, 1276–1282 (2013).
76. Liang, H., Ma, S. Y., Feng, G., Shen, F. H. & Joshua Li, X. Therapeutic effects of adenovirus-mediated growth and differentiation factor-5 in a mice disc degeneration model induced by annulus needle puncture. *Spine J* **10**, 32–41 (2010).
77. Keorochana, G., Johnson, J. S., Taghavi, C. E., Liao, J. C., Lee, K. B., Yoo, J. H., Ngo, S. S. & Wang, J. C. The effect of needle size inducing degeneration in the rat caudal disc: Evaluation using radiograph, magnetic resonance imaging, histology, and immunohistochemistry. *Spine J* **10**, 1014–1023 (2010).
78. Grunert, P., Borde, B. H., Towne, S. B., Moriguchi, Y., Hudson, K. D., Bonassar, L. J. & Härtl, R. Riboflavin crosslinked high-density collagen gel for the repair of annular defects in intervertebral discs: An in vivo study. *Acta Biomater* **26**, 215–224 (2015).
79. Masuda, K., Aota, Y., Muehleman, C., Imai, Y., Okuma, M., Thonar, E. J., Andersson, G. B. & An, H. S. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine* **30**, 5–14 (2005).
80. Yang, C. H., Chiang, Y. F., Chen, C. H., Wu, L. C., Liao, C. J. & Chiang, C. J. The effect of annular repair on the failure strength of the porcine lumbar disc after needle puncture and punch injury. *Eur Spine J* **25**, 906–912 (2016).
81. Bailey, A., Araghi, A., Blumenthal, S. & Huffmon, G. V. Prospective, multicenter, randomized, controlled study of annular repair in lumbar discectomy: two-year follow-up. *Spine* **38**, 1161–9 (2013).
82. Parker, S. L., Grahovac, G., Vukas, D., Vilendecic, M., Ledic, D., McGirt, M. J. & Carragee, E. J. Effect of an Annular closure device (Barricaid) on same-level recurrent disk herniation and disk height loss after primary lumbar discectomy: two-year results of a multicenter prospective cohort study. *Clin Spine Surg* **29**, 454–460 (2016).
83. Choy, W. J., Phan, K., Diwan, A. D., Ong, C. S. & Mobbs, R. J. Annular closure device for disc herniation : meta-analysis of clinical outcome and complications. *BMC Musculoskelet Disord* **19**, 1–9 (2018).
84. Ahlgren, B. D., Lui, W., Herkowitz, H. N., Panjabi, M. M. & Guiboux, J. P. Effect of annular repair on the healing strength of the intervertebral disc: a sheep model. *Spine* **25**, 2165–2170 (2000).
85. Bateman, A. H., Balkovec, C., Akens, M. K., Chan, A. H. W., Harrison, R. D., Oakden, W., Yee, A. J. M. & McGill, S. M. Closure of the Annulus fibrosus of the intervertebral disc using a novel suture application device – in vivo porcine and ex-vivo biomechanical evaluation. *Spine J* **16**, 889–895 (2016).
86. Likhitanichkul, M., Dreischarf, M., Illien-Junger, S., Walter, B. a., Nukaga, T., Long, R. G., Sakai, D., Hecht, A. C. & Iatridis, J. C. Fibrin-genipin adhesive hydrogel for annulus fibrosus repair: Performance evaluation with large animal organ culture, in situ biomechanics, and in vivo degradation tests. *Eur Cells Mater* **28**, 25–38 (2014).
87. Long, R. G., Bürki, A., Zysset, P., Eglin, D., Grijpma, D. W., Blanquer, S. B. G., Hecht, A. C. & Iatridis, J. C. Mechanical restoration and failure analyses of a hydrogel and scaffold composite strategy for annulus fibrosus repair. *Acta Biomater* **30**, 116–125 (2016).
88. Vergroesen, P.-P. a, Bochynska, A. I., Emanuel, K. S., Sharifi, S., Kingma, I., Grijpma, D. W. & Smit, T. H. A biodegradable glue for annulus closure: evaluation of strength and endurance. *Spine* **40**, 622–8 (2015).
89. Borde, B., Grunert, P., Härtl, R. & Bonassar, L. J. Injectable, high-density collagen gels for annulus fibrosus repair: An in vitro rat tail model. *J Biomed Mater Res - Part A* **103**, 2571–2581 (2015).
90. Grunert, P., Borde, B. H., Hudson, K. D., Macielak, M. R., Bonassar, L. J. & Härtl, R. Annular repair using high-density collagen gel: a rat-tail in vivo model. *Spine* **39**, 198–206 (2014).

91. Pennicooke, B., Hussain, I., Berlin, C., Sloan, S. R., Borde, B., Moriguchi, Y., Lang, G., Navarro-Ramirez, R., Cheetham, J., Bonassar, L. J. & Härtl, R. Annulus fibrosus repair using high-density collagen gel. *Spine* **43**, 208–215 (2018).
92. Heuer, F., Ulrich, S., Claes, L. & Wilke, H.-J. Biomechanical evaluation of conventional anulus fibrosus closure methods required for nucleus replacement. *J Neurosurg Spine* **9**, 307–313 (2008).
93. Bron, J. L., Mulder, H. W., Vonk, L. a., Doulabi, B. Z., Oudhoff, M. J. & Smit, T. H. Migration of intervertebral disc cells into dense collagen scaffolds intended for functional replacement. *J Mater Sci Mater Med* **23**, 813–821 (2012).
94. Bowles, R. D., Williams, R. M., Zipfel, W. R. & Bonassar, L. J. Self-assembly of aligned tissue-engineered annulus fibrosus and intervertebral disc composite via collagen gel contraction. *Tissue Eng Part A* **16**, 1339–1348 (2010).
95. Gruber, H. E., Leslie, K., Ingram, J., Norton, H. J. & Hanley, E. N. Cell-based tissue engineering for the intervertebral disc: In vitro studies of human disc cell gene expression and matrix production within selected cell carriers. *Spine J* **4**, 44–55 (2004).
96. Sato, M., Asazuma, T., Ishihara, M., Ishihara, M., Kikuchi, T., Kikuchi, M. & Fujikawa, K. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method. *Spine* **28**, 548–553 (2003).
97. Sato, M., Kikuchi, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Kikuchi, T., Masuoka, K., Hattori, H. & Fujikawa, K. Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured annulus fibrosus cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold). *Med Biol Eng Comput* **41**, 365–371 (2003).
98. Sakai, D., Mochida, J., Yamamoto, Y., Nomura, T., Okuma, M., Nishimura, K., Nakai, T., Ando, K. & Hotta, T. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen® gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* **24**, 3531–3541 (2003).
99. Sakai, D., Mochida, J., Iwashina, T., Hiyama, A., Omi, H., Imai, M., Nakai, T., Ando, K. & Hotta, T. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* **27**, 335–345 (2006).
100. Attia, M., Santerre, J. P. & Kandel, R. a. The response of annulus fibrosus cell to fibronectin-coated nanofibrous polyurethane-anionic dihydroxyoligomer scaffolds. *Biomaterials* **32**, 450–60 (2011).
101. Pan, Y., Chu, T., Dong, S., Hao, Y., Ren, X., Wang, J., Wang, W., Li, C., Zhang, Z. & Zhou, Y. Cells scaffold complex for Intervertebral disc Anulus Fibrosus tissue engineering: In vitro culture and product analysis. *Mol Biol Rep* **39**, 8581–8594 (2012).
102. Madhavan, K., Belchenko, D., Motta, A. & Tan, W. Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomater* **6**, 1413–1422 (2010).
103. Rong, Y., Sugumaran, G., Silbert, J. E. & Spector, M. Proteoglycans synthesized by canine intervertebral disc cells grown in a type I collagen-glycosaminoglycan matrix. *Tissue Eng* **8**, 1037–47 (2002).
104. Guillaume, O., Daly, A., Lennon, K., Gansau, J., Buckley, S. F. & Buckley, C. T. Shape-memory porous alginate scaffolds for regeneration of the annulus fibrosus: Effect of TGF- β 3 supplementation and oxygen culture conditions. *Acta Biomater* **10**, 1985–1995 (2014).
105. Re'em, T., Tsur-Gang, O. & Cohen, S. The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGF β 1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **31**, 6746–6755 (2010).
106. Chiba, K., Andersson, G. B., Masuda, K. & Thonar, E. J. Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate. *Spine* **22**, 2885–93 (1997).
107. Bron, J. L., Vonk, L. a, Smit, T. H. & Koenderink, G. H. Engineering alginate for intervertebral disc repair. *J Mech Behav Biomed Mater* **4**, 1196–205 (2011).
108. Melrose, J., Ghosh, P. & Taylor, T. K. A comparative analysis of the differential spatial and temporal

- distributions of the large (aggrecan, versican) and small (decorin, biglycan, fibromodulin) proteoglycans of the intervertebral disc. *J Anat* **198**, 3–15 (2001).
109. Maldonado, B. A. & Oegema, T. R. Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. *J Orthop Res* **10**, 677–90 (1992).
 110. Roughley, P., Hoemann, C., DesRosiers, E., Mwale, F., Antoniou, J. & Alini, M. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation. *Biomaterials* **27**, 388–396 (2006).
 111. Gruber, H. E., Hoelscher, G. L., Leslie, K., Ingram, J. a & Hanley, E. N. Three-dimensional culture of human disc cells within agarose or a collagen sponge: assessment of proteoglycan production. *Biomaterials* **27**, 371–6 (2006).
 112. Chang, G., Kim, H. J., Kaplan, D., Vunjak-Novakovic, G. & Kandel, R. a. Porous silk scaffolds can be used for tissue engineering annulus fibrosus. *Eur Spine J* **16**, 1848–1857 (2007).
 113. Chang, G., Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. L. & Kandel, R. Enhancing annulus fibrosus tissue formation in porous silk scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part A* **92**, 43–51 (2010).
 114. Park, S.-H., Gil, E. S., Mandal, B. B., Cho, H., Kluge, J. A., Min, B.-H. & Kaplan, D. L. Annulus fibrosus tissue engineering using lamellar silk scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* **6 Suppl 3**, s24-33 (2012).
 115. Park, S.-H., Gil, E. S., Cho, H., Mandal, B. B., Tien, L. W., Min, B.-H. & Kaplan, D. L. Intervertebral disk tissue engineering using biphasic silk composite scaffolds. *Tissue Eng Part A* **18**, 447–58 (2012).
 116. See, E. Y.-S., Toh, S. L. & Goh, J. C.-H. Effects of Radial Compression on a Novel Simulated Intervertebral Disc-Like Assembly Using Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Cell-Sheets for Annulus Fibrosus Regeneration. *Spine* **36**, 1744–1751 (2011).
 117. See, E. Y.-S., Toh, S. L. & Goh, J. C. H. Simulated intervertebral disc-like assembly using bone marrow-derived mesenchymal stem cell sheets and silk scaffolds for annulus fibrosus regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* **6**, 528–535 (2012).
 118. Hegewald, A. a, Knecht, S., Baumgartner, D., Gerber, H., Endres, M., Kaps, C., Stüssi, E. & Thomé, C. Biomechanical testing of a polymer-based biomaterial for the restoration of spinal stability after nucleotomy. *J Orthop Surg Res* **4**, 25 (2009).
 119. Abbushi, A., Endres, M., Cabraja, M., Kroppenstedt, S. N., Thomale, U. W., Sittlinger, M., Hegewald, A. A., Morawietz, L., Lemke, A.-J., Bansemer, V.-G., Kaps, C. & Woiciechowsky, C. Regeneration of intervertebral disc tissue by resorbable cell-free polyglycolic acid-based implants in a rabbit model of disc degeneration. *Spine* **33**, 1527–32 (2008).
 120. Cabraja, M., Endres, M., Hegewald, A. a., Vetterlein, S., Thomé, C., Woiciechowsky, C. & Kaps, C. A 3D environment for anulus fibrosus regeneration. *J Neurosurg Spine* **17**, 177–183 (2012).
 121. Jeong, C. G., Francisco, A. T., Niu, Z., Mancino, R. L., Craig, S. L. & Setton, L. a. Screening of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) composite hydrogels to support intervertebral disc cell biosynthesis using artificial neural network analysis. *Acta Biomater* **10**, 3421–30 (2014).
 122. Schek, R. M., Michalek, a. J. & Iatridis, J. C. Genipin-crosslinked fibrin hydrogels as a potential adhesive to augment intervertebral disc annulus repair. *Eur Cells Mater* **21**, 373–383 (2011).
 123. Buser, Z., Liu, J., Thorne, K. J., Coughlin, D. & Lotz, J. C. Inflammatory response of intervertebral disc cells is reduced by fibrin sealant scaffold in vitro. *J Tissue Eng Regen Med* **8**, 77–84 (2014).
 124. Sha'ban, M., Yoon, S. J., Ko, Y. K., Ha, H. J., Kim, S. H., So, J. W., Idrus, R. B. H. & Khang, G. Fibrin promotes proliferation and matrix production of intervertebral disc cells cultured in three-dimensional poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed* **19**, 1219–1237 (2008).
 125. Le Visage, C., Yang, S.-H., Kadakia, L., Sieber, A. N., Kostuik, J. P. & Leong, K. W. Small intestinal submucosa as a potential bioscaffold for intervertebral disc regeneration. *Spine* **31**, 2423–2430 (2006).
 126. Ledet, E. H., Jeshuran, W., Glennon, J. C., Shaffrey, C., De Deyne, P., Belden, C., Kallakury, B. & Carl, A. L. Small intestinal submucosa for anular defect closure: long-term response in an in vivo sheep model. *Spine*

- 34**, 1457–1463 (2009).
127. Alini, M., Li, W., Markovic, P., Aebi, M., Spiro, R. C. & Roughley, P. J. The potential and limitations of a cell-seeded collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix. *Spine* **28**, 446–454; discussion 453 (2003).
 128. Calderon, L., Collin, E., Velasco-Bayon, D., Murphy, M., O'Halloran, D. & Pandit, A. Type II Collagen-Hyaluronan Hydrogel - A Step Towards A Scaffold For Intervertebral Disc Tissue Engineering. *Eur Cells Mater* **20**, 134–148 (2010).
 129. Guillaume, O., Naqvi, S. M., Lennon, K. & Buckley, C. T. Enhancing cell migration in shape-memory alginate-collagen composite scaffolds: In vitro and ex vivo assessment for intervertebral disc repair. *J Biomater Appl* **29**, 1230–46 (2015).
 130. Shao, X. & Hunter, C. J. Developing an alginate/chitosan hybrid fiber scaffold for annulus fibrosus cells. *J Biomed Mater Res A* **82**, 701–10 (2007).
 131. Semler, T. Feasibility of a Genipin-Crosslinked Fibrin Gel as a Patch for Annulus Fibrosus Repair in the Intervertebral Disc. *J Chem Inf Model* **53**, 160 (2013).
 132. Bhunia, B. K., Kaplan, D. L. & Mandal, B. B. Silk-based multilayered angle-ply annulus fibrosus construct to recapitulate form and function of the intervertebral disc. *Proc Natl Acad Sci* **115**, 447–482 (2018).
 133. Moriguchi, Y. Total disc replacement using tissue-engineered intervertebral discs in the canine cervical spine. 1–11 (2017).
 134. Zitnay, J. L., Reese, S. P., Tran, G., Farhang, N., Bowles, R. D. & Weiss, J. A. Fabrication of dense anisotropic collagen scaffolds using biaxial compression. *Acta Biomater* **65**, 76–87 (2017).
 135. Xu, B., Du, L., Zhang, J., Zhu, M., Ji, S., Zhang, Y., Kong, D., Ma, X., Yang, Q. & Wang, L. Circumferentially oriented microfiber scaffold prepared by wet-spinning for tissue engineering of annulus fibrosus. *RSC Adv* **5**, 42705–42713 (2015).
 136. Lazebnik, M., Singh, M., Glatt, P., Friis, L. a., Berkland, C. J. & Detamore, M. S. Biomimetic method for combining the nucleus pulposus and annulus fibrosus for intervertebral disc tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* **5**, 179–187 (2011).
 137. Wismer, N., Grad, S., Fortunato, G., Ferguson, S. J., Alini, M. & Eglin, D. Biodegradable electrospun scaffolds for Annulus fibrosus tissue engineering: effect of scaffold structure and composition on Annulus fibrosus cells in vitro. *Tissue Eng Part A* **20**, 672–682 (2014).
 138. Nerurkar, N. L., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Mechanics of oriented electrospun nanofibrous scaffolds for Annulus fibrosus tissue engineering. *Anticancer Res* **11**, 1609–1612 (2007).
 139. Nerurkar, N. L., Mauck, R. L. & Elliott, D. M. ISSLS prize winner: integrating theoretical and experimental methods for functional tissue engineering of the annulus fibrosus. *Spine* **33**, 2691–2701 (2008).
 140. Nerurkar, N. L., Baker, B. M., Sen, S., Wible, E. E., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Nanofibrous biologic laminates replicate the form and function of the annulus fibrosus. *Nat Mater* **8**, 986–92 (2009).
 141. Nerurkar, N. L., Sen, S., Huang, A. H., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Engineered disc-like angle-ply structures for intervertebral disc replacement. *Spine* **35**, 867–73 (2010).
 142. Baker, B. M. & Mauck, R. L. The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs. *Biomaterials* **28**, 1967–1977 (2007).
 143. Baker, B. M., Gee, A. O., Metter, R. B., Nathan, A. S., Marklein, R. A., Burdick, J. A. & Mauck, R. L. The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. *Biomaterials* **29**, 2348–58 (2008).
 144. Koepsell, L., Remund, T., Bao, J., Neufeld, D., Fong, H. & Deng, Y. Tissue engineering of Annulus fibrosus using electrospun fibrous scaffolds with aligned polycaprolactone fibers. *J Biomed Mater Res Part A* **99A**, 564–575 (2011).
 145. Koepsell, L., Zhang, L., Neufeld, D., Fong, H. & Deng, Y. Electrospun nanofibrous polycaprolactone

- scaffolds for tissue engineering of Annulus fibrosus. *Macromol Biosci* **11**, 391–399 (2011).
146. Driscoll, T. P., Nakasone, R. H., Szczesny, S. E., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Biaxial mechanics and inter-lamellar shearing of stem-cell seeded electrospun angle-ply laminates for annulus fibrosus tissue engineering. *J Orthop Res* **31**, 864–870 (2013).
 147. Martin, J. T., Milby, A. H., Chiaro, J. A., Kim, D. H., Hebela, N. M., Smith, L. J., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Translation of an engineered nanofibrous disc-like angle-ply structure for intervertebral disc replacement in a small animal model. *Acta Biomater* **10**, 2473–2481 (2014).
 148. Nerurkar, N. L., Mauck, R. L. & Elliott, D. M. Modeling interlamellar interactions in angle-ply biologic laminates for annulus fibrosus tissue engineering. *Biomech Model Mechanobiol* **10**, 973–984 (2011).
 149. Wan, Y., Feng, G., Shen, F. H., Laurencin, C. T. & Li, X. Biphasic scaffold for annulus fibrosus tissue regeneration. *Biomaterials* **29**, 643–52 (2008).
 150. Yang, L., Kandel, R. A., Chang, G. & Santerre, J. P. Polar surface chemistry of nanofibrous polyurethane scaffold affects annulus fibrosus cell attachment and early matrix accumulation. *J Biomed Mater Res Part A* **91A**, 1089–1099 (2009).
 151. Turner, K. G., Ahmed, N., Santerre, J. P. & Kandel, R. a. Modulation of annulus fibrosus cell alignment and function on oriented nanofibrous polyurethane scaffolds under tension. *Spine J* **14**, 424–434 (2014).
 152. Yeganegi, M., Kandel, R. A. & Santerre, J. P. Characterization of a biodegradable electrospun polyurethane nanofiber scaffold: Mechanical properties and cytotoxicity. *Acta Biomater* **6**, 3847–3855 (2010).
 153. Iu, J., Santerre, J. P. & Kandel, R. a. Inner and outer annulus fibrosus cells exhibit differentiated phenotypes and yield changes in extracellular matrix protein composition in vitro on a polycarbonate urethane scaffold. *Tissue Eng Part A* **20**, 3261–9 (2014).
 154. Liu, C., Zhu, C., Li, J., Zhou, P., Chen, M., Yang, H. & Li, B. The effect of the fibre orientation of electrospun scaffolds on the matrix production of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells. *Bone Res* **3**, 15012 (2015).
 155. Guo, Q., Liu, C., Li, J., Zhu, C., Yang, H. & Li, B. Gene expression modulation in TGF- β 3-mediated rabbit bone marrow stem cells using electrospun scaffolds of various stiffness. *J Cell Mol Med* **19**, 1582–1592 (2015).
 156. Zhu, C., Li, J., Liu, C., Zhou, P., Yang, H. & Li, B. Modulation of the gene expression of annulus fibrosus-derived stem cells using poly(ether carbonate urethane)urea scaffolds of tunable elasticity. *Acta Biomater* **29**, (2015).
 157. Nesti, L. J., Li, W.-J., Shanti, R. M., Jiang, Y. J., Jackson, W., Freedman, B. a., Kuklo, T. R., Giuliani, J. R. & Tuan, R. S. Intervertebral Disc Tissue Engineering Using a Novel Hyaluronic Acid–Nanofibrous Scaffold (HANFS) Amalgam. *Tissue Eng Part A* **14**, 1527–1537 (2008).
 158. Wilda, H. & Gough, J. E. In vitro studies of annulus fibrosus disc cell attachment, differentiation and matrix production on PDLLA/45S5 Bioglass?? composite films. *Biomaterials* **27**, 5220–5229 (2006).
 159. Helen, W., Merry, C. L. R., Blaker, J. J. & Gough, J. E. Three-dimensional culture of annulus fibrosus cells within PDLLA/Bioglass® composite foam scaffolds: Assessment of cell attachment, proliferation and extracellular matrix production. *Biomaterials* **28**, 2010–2020 (2007).
 160. Helen, W. & Gough, J. E. Cell viability, proliferation and extracellular matrix production of human annulus fibrosus cells cultured within PDLLA/Bioglass® composite foam scaffolds in vitro. *Acta Biomater* **4**, 230–243 (2008).
 161. Vadalà, G., Mozetic, P., Rainer, A., Centola, M., Loppini, M., Trombetta, M. & Denaro, V. Bioactive electrospun scaffold for annulus fibrosus repair and regeneration. *Eur Spine J* **21**, 20–26 (2012).
 162. Mizuno, H., Roy, A. K., Vacanti, C. a, Kojima, K., Ueda, M. & Bonassar, L. J. Tissue-engineered composites of anulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement. *Spine* **29**, 1290-1297-1298 (2004).

163. Chou, A. I., Reza, A. T. & Nicoll, S. B. Distinct intervertebral disc cell populations adopt similar phenotypes in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A* **14**, 2079–87 (2008).
164. Reza, A. T. & Nicoll, S. B. Hydrostatic pressure differentially regulates outer and inner annulus fibrosus cell matrix production in 3D scaffolds. *Ann Biomed Eng* **36**, 204–13 (2008).
165. Hegewald, A. A., Medved, F., Feng, D., Tsagogiorgas, C., Beierfuß, A., Schindler, G. A. K., Trunk, M., Kaps, C., Mern, D. S. & Thomé, C. Enhancing tissue repair in Annulus fibrosus defects of the intervertebral disc: analysis of a bio-integrative annulus implant in an in-vivo ovine model. *J Tissue Eng Regen Med* **9**, 405–414 (2015).
166. Endres, M., Abbushi, A., Thomale, U. W., Cabraja, M., Kroppenstedt, S. N., Morawietz, L., Casalis, P. A., Zenclussen, M. L., Lemke, A. J., Horn, P., Kaps, C. & Woiciechowsky, C. Intervertebral disc regeneration after implantation of a cell-free bioresorbable implant in a rabbit disc degeneration model. *Biomaterials* **31**, 5836–5841 (2010).
167. Mizuno, H., Roy, A. K., Zaporozhan, V., Vacanti, C. a, Ueda, M. & Bonassar, L. J. Biomechanical and biochemical characterization of composite tissue-engineered intervertebral discs. *Biomaterials* **27**, 362–70 (2006).
168. Xin, L., Zhang, C., Zhong, F., Fan, S., Wang, W. & Wang, Z. Minimal invasive annulotomy for induction of disc degeneration and implantation of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) plugs for annular repair in a rabbit model. *Eur J Med Res* **21**, 7 (2016).
169. Sharifi, S., van Kooten, T. G., Kranenburg, H. J. C., Meij, B. P., Behl, M., Lendlein, A. & Grijpma, D. W. An annulus fibrosus closure device based on a biodegradable shape-memory polymer network. *Biomaterials* **34**, 8105–8113 (2013).
170. Sharifi, S., Kranenburg, H. J. C., Meij, B. P. & Grijpma, D. W. Photo-crosslinkable poly(trimethylene carbonate)-based macromers for closure of ruptured intervertebral discs. *Macromol Symp* **309–310**, 100–110 (2011).
171. Pirvu, T., Blanquer, S. B. G., Benneker, L. M., Grijpma, D. W., Richards, R. G., Alini, M., Eglin, D., Grad, S. & Li, Z. A combined biomaterial and cellular approach for annulus fibrosus rupture repair. *Biomaterials* **42**, 11–19 (2015).
172. Blanquer, S. B. G., Haimi, S. P., Poot, A. A. & Grijpma, D. W. Effect of pore characteristics on mechanical properties and annulus fibrosus cell seeding and proliferation in designed PTMC tissue engineering scaffolds. *Macromol Symp* **334**, 75–81 (2013).
173. Wan, Y., Feng, G., Shen, F. H., Balian, G., Laurencin, C. T. & Li, X. Novel biodegradable poly(1,8-octanediol malate) for annulus fibrosus regeneration. *Macromol Biosci* **7**, 1217–1224 (2007).
174. Li, X., Dou, Q. & Kong, Q. Repair and Regenerative Therapies of the Annulus Fibrosus of the Intervertebral Disc. *J Coll Physicians Surg Pak* **26**, 138–44 (2016).
175. Hudson, K. D., Alimi, M., Grunert, P., Härtl, R. & Bonassar, L. J. Recent advances in biological therapies for disc degeneration: tissue engineering of the annulus fibrosus, nucleus pulposus and whole intervertebral discs. *Curr Opin Biotechnol* **24**, 872–879 (2013).
176. Gilbert, H. T. J., Hoyland, J. A. & Millward-Sadler, S. J. The response of human anulus fibrosus cells to cyclic tensile strain is frequency-dependent and altered with disc degeneration. *Arthritis Rheum* **62**, 3385–3394 (2010).
177. Liu, C., Guo, Q., Li, J., Wang, S., Wang, Y., Li, B. & Yang, H. Identification of Rabbit Annulus Fibrosus-Derived Stem Cells. *PLoS One* **9**, e108239 (2014).
178. Miyamoto, K., An, H. S., Sah, R. L., Akeda, K., Okuma, M., Otten, L., Thonar, E. J. M. a & Masuda, K. Exposure to pulsed low intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads. *Spine* **30**, 2398–405 (2005).
179. Wenger, K. H., Woods, J. A., Holecek, A., Eckstein, E. C., Robertson, J. T. & Hasty, K. a. Matrix remodeling expression in anulus cells subjected to increased compressive load. *Spine* **30**, 1122–1126 (2005).

180. Hee, H. T., Zhang, J. & Wong, H. K. An in vitro study of dynamic cyclic compressive stress on human inner Annulus fibrosus and Nucleus pulposus cells. *Spine J* **10**, 795–801 (2010).
181. Paul, C. P. L., Zuiderbaan, H. A., Zandieh Doulabi, B., van der Veen, A. J., van de Ven, P. M., Smit, T. H., Helder, M. N., van Royen, B. J. & Mullender, M. G. Simulated-physiological loading conditions preserve biological and mechanical properties of caprine lumbar intervertebral discs in EX vivo culture. *PLoS One* **7**, 29–34 (2012).
182. Li, P., Gan, Y., Wang, H., Xu, Y., Song, L., Zhang, C., Li, S. & Zhou, Q. Biological Responses of the Immature Annulus Fibrosus to Dynamic Compression in a Disc Perfusion Culture. *Cells Tissues Organs* **400038**, (2016).
183. Bron, J. L., Van Der Veen, A. J., Helder, M. N., Van Royen, B. J. & Smit, T. H. Biomechanical and in vivo evaluation of experimental closure devices of the Annulus fibrosus designed for a goat nucleus replacement model. *Eur Spine J* **19**, 1347–1355 (2010).
184. Johnson, W., Wootton, A. & Haj, A. El. Topographical guidance of intervertebral disc cell growth in vitro: towards the development of tissue repair strategies for the anulus fibrosus. *Eur Spine J* **15**, S389–S396 (2006).
185. Frauchiger, D. A., May, R. D., Bakirci, E., Tekari, A., Chan, S. C. W., Wöltje, M., Benneker, L. M. & Gantenbein, B. Genipin-enhanced fibrin hydrogel and novel silk for intervertebral disc repair in a loaded bovine organ culture model. *J Funct Biomater* **9**, (2018).
186. Kang, R., Li, H., Lysdahl, H., Quang Svend Le, D., Chen, M., Xie, L. & Büniger, C. Cyanoacrylate medical glue application in intervertebral disc annulus defect repair: Mechanical and biocompatible evaluation. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* **105**, 14–20 (2017).
187. Kang, R., Li, H., Xi, Z., Ringgard, S., Baatrup, A., Rickers, K., Sun, M., Le, D. Q. S., Wang, M., Xie, L., Xie, Y., Chen, M. & Büniger, C. Surgical repair of annulus defect with biomimetic multilamellar nano/microfibrous scaffold in a porcine model. *J Tissue Eng Regen Med* **12**, 164–174 (2018).
188. Chou, A. I., Bansal, A., Miller, G. J. & Nicoll, S. B. The effect of serial monolayer passaging on the collagen expression profile of outer and inner anulus fibrosus cells. *Spine* **31**, 1875–81 (2006).
189. Kluba, T., Niemeyer, T., Gaissmaier, C. & Gründer, T. Human Anulus Fibrosis and Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc: Effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine* **30**, 2743–2748 (2005).
190. Gruber, H. E., Fisher, E. C., Desai, B., Stasky, a a, Hoelscher, G. & Hanley, E. N. Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-beta1. *Exp Cell Res* **235**, 13–21 (1997).
191. Hoogendoorn, R. J. W., Lu, Z. F., Kroeze, R. J., Bank, R. A., Wuisman, P. I. & Helder, M. N. Adipose stem cells for intervertebral disc regeneration: current status and concepts for the future. *J Cell Mol Med* **12**, 2205–16 (2008).
192. Gruber, H. E., Riley, F. E., Hoelscher, G. L., Ingram, J. A., Bullock, L. & Hanley, E. N. Human annulus progenitor cells: Analyses of this viable endogenous cell population. *J Orthop Res* **2016**, 1–10 (2016).
193. Feng, G., Yang, X., Shang, H., Marks, I. W., Shen, F. H., Katz, A., Arlet, V., Laurencin, C. T. & Li, X. Multipotential differentiation of human anulus fibrosus cells: An in vitro study. *J Bone Jt Surg - Ser A* **92**, 675–685 (2010).
194. Risbud, M. V., Guttapalli, A., Tsai, T. T., Lee, J. Y., Danielson, K. G., Vaccaro, A. R., Albert, T. J. & Shapiro, I. M. Evidence for stem cells in the degenerate human intervertebral disc. *Trans ORS* **31**, 967 (2006).
195. Henriksson, H. B., Svala, E., Skioldebrand, E., Lindahl, A. & Brisby, H. Support of concept that migrating progenitor cells from stem cell niches contribute to normal regeneration of the adult mammal intervertebral disc: a descriptive study in the New Zealand white rabbit. *Spine* **37**, 722–32 (2012).
196. Henriksson, H. B., Lindahl, A., Skioldebrand, E., Junevik, K., Tängemo, C., Mattsson, J. & Brisby, H. Similar cellular migration patterns from niches in intervertebral disc and in knee-joint regions detected by in situ labeling: an experimental study in the New Zealand white rabbit. *Stem Cell Res Ther* **4**, 104 (2013).

197. Henriksson, H., Thornemo, M., Karlsson, C., Hägg, O., Junevik, K., Lindahl, A. & Brisby, H. Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and a potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species. *Spine* **34**, 2278–2287 (2009).
198. Sakai, D. & Grad, S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease. *Adv Drug Deliv Rev* **84**, 159–171 (2015).
199. Kawaguchi, S., Yamashita, T., Katahira, G. I., Yokozawa, H., Torigoe, T. & Sato, N. Chemokine profile of herniated intervertebral discs infiltrated with monocytes and macrophages. *Spine* **27**, 1511–1516 (2002).
200. Liu, W., Liu, D., Zheng, J., Shi, P., Chou, P. H., Oh, C., Chen, D., An, H. S. & Chee, A. Annulus fibrosus cells express and utilize C-C chemokine receptor 5 (CCR5) for migration. *Spine J* **17**, 720–726 (2017).
201. Hegewald, A. A., Neumann, K., Kalwitz, G., Freymann, U., Endres, M., Schmieder, K., Kaps, C. & Thomé, C. The chemokines CXCL10 and XCL1 recruit human Annulus fibrosus cells. *Spine* **37**, 101–7 (2012).
202. Zhou, Z., Zeiter, S., Schmid, T., Sakai, D., Iatridis, J. C., Zhou, G., Richards, R. G., Alini, M., Grad, S. & Li, Z. Effect of the CCL5-Releasing Fibrin Gel for Intervertebral Disc Regeneration. *Cartilage* (2018). doi:10.1177/1947603518764263
203. Molinos, M., Almeida, C. R., Caldeira, J., Cunha, C., Goncalves, R. M. & Barbosa, M. A. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration. *J R Soc Interface* **12**, 20141191 (2015).
204. Nakazawa, K. R., Walter, B. A., Laudier, D. M., Krishnamoorthy, D., Mosley, G. E., Spiller, K. L. & Iatridis, J. C. Accumulation and localization of macrophage phenotypes with human intervertebral disc degeneration. *Spine J* **18**, 343–356 (2018).
205. Masuda, K. & An, H. S. Prevention of disc degeneration with growth factors. *Eur Spine J* **15**, 422–432 (2006).
206. Vasiliadis, E. S., Pneumaticos, S. G., Evangelopoulos, D. S. & Papavassiliou, A. G. Biologic treatment of mild and moderate intervertebral disc degeneration. *Mol Med* **20**, 400–9 (2014).
207. Thompson, J. P., Oegema, T. R. & Bradford, D. S. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine* **16**, 253–60 (1991).
208. Masuda, K., Oegema, T. R. & An, H. S. Growth factors and treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine* **29**, 2757–69 (2004).
209. Masuda, K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors. *Eur Spine J* **17**, (2008).
210. Wei, A., Williams, L. A., Bhargav, D., Shen, B., Kishen, T., Duffy, N. & Diwan, A. D. BMP13 prevents the effects of annular injury in an ovine model. *Int J Biol Sci* **5**, 388–396 (2009).
211. Walsh, A. J. L., Bradford, D. S. & Lotz, J. C. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine* **29**, 156–163 (2004).
212. Imai, Y., Okuma, M., An, H. S., Nakagawa, K., Yamada, M., Muehleman, C., Thonar, E. & Masuda, K. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine* **32**, 1197–205 (2007).
213. Takegami, K., An, H. S., Kumano, F., Chiba, K., Thonar, E. J., Singh, K. & Masuda, K. Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced in vitro chemonucleolysis. *Spine J* **5**, 231–238 (2005).
214. Zhang, Y., Anderson, D. G., Phillips, F. M., Thonar, E. J.-M., He, T.-C., Pietryla, D. & An, H. S. Comparative effects of bone morphogenetic proteins and Sox9 overexpression on matrix accumulation by bovine annulus fibrosus cells: implications for annular repair. *Spine* **32**, 2515–2520 (2007).
215. Hayes, A. J., Benjamin, M. & Ralphs, J. R. Extracellular matrix in development of the intervertebral disc. *Matrix Biol* **20**, 107–121 (2001).
216. Gruber, H. E., Norton, H. J. & Hanley, E. N. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human

- intervertebral disc cells in vitro. *Spine* **25**, 2153–2157 (2000).
217. Gruber, H. E., Hoelscher, G., Loeffler, B., Chow, Y., Ingram, J. a., Halligan, W. & Hanley, E. N. Prostaglandin E1 and misoprostol increase epidermal growth factor production in 3D-cultured human annulus cells. *Spine J* **9**, 760–766 (2009).
 218. Tim Yoon, S. Molecular therapy of intervertebral disc. *Eur Cells Mater* **10**, 40 (2005).
 219. Tim Yoon, S., Su Kim, K., Li, J., Soo Park, J., Akamaru, T., Elmer, W. a & Hutton, W. C. The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells in vitro. *Spine* **28**, 1773–1780 (2003).
 220. Imai, Y., An, H., Thonar, E., Andersson, G. & Masuda, K. Recombinant human osteogenic protein-1 (RHOP-1) upregulates extracellular matrix metabolism by human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells. *Spine J* **2**, 101–102 (2002).
 221. Miyamoto, K., Masuda, K., Kim, J. G., Inoue, N., Akeda, K., Andersson, G. B. J. & An, H. S. Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs. *Spine J* **6**, 692–703 (2006).
 222. Mwale, F., Demers, C. N., Petit, A., Roughley, P., Poole, A. R., Steffen, T., Aebi, M. & Antoniou, J. A synthetic peptide of link protein stimulates the biosynthesis of collagens II, IX and proteoglycan by cells of the intervertebral disc. *J Cell Biochem* **88**, 1202–1213 (2003).
 223. Mwale, F., Masuda, K., Pichika, R., Epure, L. M., Yoshikawa, T., Hemmad, A., Roughley, P. J. & Antoniou, J. The efficacy of Link N as a mediator of repair in a rabbit model of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* **13**, R120 (2011).
 224. Gawri, R., Antoniou, J., Ouellet, J., Awwad, W., Steffen, T., Roughley, P., Haglund, L. & Mwale, F. Best paper NASS 2013: Link-N can stimulate proteoglycan synthesis in the degenerated human intervertebral discs. *Eur Cells Mater* **26**, 107–119 (2013).
 225. Masuda, K., Imai, Y., Okuma, M., Muehleman, C., Nakagawa, K., Akeda, K., Thonar, E., Andersson, G. & An, H. S. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model. *Spine* **31**, 742–54 (2006).
 226. Chujo, T., An, H. S., Akeda, K., Miyamoto, K., Muehleman, C., Attawia, M., Andersson, G. & Masuda, K. Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc-in vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study. *Spine* **31**, 2909–2917 (2006).
 227. Pirvu, T. N., Schroeder, J. E., Peroglio, M., Verrier, S., Kaplan, L., Richards, R. G., Alini, M. & Grad, S. Platelet-rich plasma induces annulus fibrosus cell proliferation and matrix production. *Eur Spine J* **23**, 745–753 (2014).
 228. Sawamura, K., Ikeda, T., Nagae, M., Okamoto, S., Mikami, Y., Hase, H., Ikoma, K., Yamada, T., Sakamoto, H., Matsuda, K., Tabata, Y., Kawata, M. & Kubo, T. Characterization of in vivo effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres on degenerated intervertebral discs. *Tissue Eng Part A* **15**, 3719–27 (2009).
 229. Obata, S., Akeda, K., Imanishi, T., Masuda, K., Bae, W., Morimoto, R., Asanuma, Y., Kasai, Y., Uchida, A. & Sudo, A. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study. *Arthritis Res Ther* **14**, R241 (2012).
 230. Lee, S. J. Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Medical Journal* **41**, 704–719 (2000).
 231. Gilbertson, L., Ahn, S.-H., Teng, P.-N., Studer, R. K., Niyibizi, C. & Kang, J. D. The effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2, recombinant human bone morphogenetic protein-12, and adenoviral bone morphogenetic protein-12 on matrix synthesis in human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells. *Spine J* **8**, 449–56 (2008).
 232. Yoon, S. T., Park, J. S., Kim, K. S., Li, J., Attallah-Wasif, E. S., Hutton, W. C. & Boden, S. D. ISSLS prize winner: LMP-1 upregulates intervertebral disc cell production of proteoglycans and BMPs in vitro and in vivo. *Spine* **29**, 2603–2611 (2004).
 233. Liu, Y., Yu, T., Ma, X. X., Xiang, H. F., Hu, Y. G. & Chen, B. H. Lentivirus-mediated TGF- β 3, CTGF and TIMP1

gene transduction as a gene therapy for intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model. *Exp Ther Med* **11**, 1399–1404 (2016).

4. Objectifs de la thèse

Le DIV joue un rôle central dans la cinématique de la colonne vertébrale. La fonction du DIV est le résultat d'une action coopérative du NP et de l'AF pour répondre correctement à une vaste gamme de contraintes mécaniques. Toute perturbation de l'une des régions du DIV aura un effet considérable sur la fonction globale de celui-ci, donc sur la stabilité de la colonne vertébrale. Les lésions de l'AF sont connues pour entraîner une dégénérescence discale et sont largement utilisées dans les modèles animaux pour l'induction de cette maladie. Les lésions de l'AF persistent dans le temps lorsqu'elles ne sont pas réparées et pourraient favoriser une hernie du tissu nucléaire vers le canal rachidien pouvant engendrer des douleurs radiculaires, une inflammation locale et un envahissement du défaut par des terminaisons nerveuses et vasculaires.

A notre connaissance, un seul type d'implant est disponible sur le marché pour la réparation de l'AF (BarricaidTM). Il est actuellement en cours d'évaluation dans deux registres de surveillance post-commercialisation (voir paragraphe 2.4.1.3). De plus, les techniques simples et directes de traitement de lésions de l'AF comme les sutures ou les adhésifs ont montré de nombreuses complications qui restreignent leur application. Il existe donc un besoin médical non couvert à l'origine de l'émergence de nouvelles études visant à développer des biomatériaux pour la réparation de l'AF. De nos jours, les matériaux utilisés en ingénierie tissulaire sont des dispositifs de comblement conçus de manière à interagir localement avec le tissu et les cellules. L'ingénierie tissulaire est donc une approche active qui exploite et oriente les processus de réparation endogènes.

De multiples approches, utilisant des matériaux naturels ou synthétiques, ont été développées pour réparer l'AF et ont permis de mettre en exergue les critères essentiels requis pour une réparation adéquate de ce tissu. Ces résultats poussent la communauté scientifique à estimer qu'un implant adapté pour la réparation de l'AF devrait présenter une architecture fibreuse

anisotrope imitant le plus fidèlement possible la structure native du tissu afin de non seulement fournir les propriétés mécaniques appropriées pour résister à la déformation durant la vie mais également guider la néoformation d'un tissu hautement organisé proche du tissu natif. Un large éventail de techniques a été utilisé pour la synthèse d'implants naturels ou synthétiques (lyophilisation, « salt-leaching », congélation unidirectionnelle, électrospinning, impression 3D). Cela a permis de mettre en évidence la supériorité des techniques d'électrospinning et d'impression 3D pour le design d'implants présentant une architecture proche de l'AF natif. La technique d'électrospinning permet notamment de produire des fibres de diamètre nanométrique à micrométrique mimant la nano- et microtopographie de la MEC. L'électrospinning seul ou en association avec l'impression 3D a permis de développer différents types d'implants dont certains, composés de polycaprolactone (PCL), possèdent des propriétés mécaniques s'approchant de celles de l'AF natif.

Enfin, comme expliqué au sein de notre revue (voir paragraphe Partie I.3), peu d'études *in vivo* visant à l'évaluation d'implants pour la régénération de l'AF ont été publiées. Les résultats obtenus ont notamment mis en évidence une limitation des modèles utilisés. En effet les équipes de recherche ont été confrontées à de nombreuses dislocations des implants sous l'effet de la pression exercée par le NP et des contraintes mécaniques exercées sur le DIV lors des mouvements du tronc. Ceci a rendu impossible l'étude de l'induction potentielle de la régénération par ces implants. Dans ce contexte, il apparaît nécessaire d'effectuer une évaluation de tout implant pour la réparation de l'AF en deux temps : (i) une première évaluation *in vivo* dans un défaut superficiel de l'AF, non soumis à la pression du NP, permettant de tester la biocompatibilité de l'implant et l'induction potentielle d'une réparation endogène dirigée, puis (ii) une deuxième évaluation dans un modèle *in vivo* de hernie discale afin d'évaluer le maintien de cet implant au sein du défaut et une éventuelle régénération intégrale de l'AF.

Dans ce contexte, au cours de cette thèse, nous avons décidé d'utiliser la technique d'électrospinning afin de synthétiser un biomatériau composé de fibres de polycaprolactone (PCL) orientées. Dans un premier temps, nous avons évalué la reproductibilité de la synthèse de ces fibres ainsi que leurs propriétés mécaniques. Puis, nous avons développé un modèle de culture d'explants d'AF afin de mimer *ex vivo* la capacité des cellules d'AF à migrer, coloniser et proliférer sur cet implant. Enfin, nous avons évalué l'induction d'une réparation endogène dirigée par ce biomatériau dans un modèle ovin de défaut induit au sein de l'AF superficiel. Les résultats obtenus seront développés dans la seconde partie de ce manuscrit après une brève introduction de la technique d'électrospinning et du polycaprolactone.

PARTIE II – DEVELOPPEMENT D’UN BIOMATERIAU POUR LA REGENERATION DE L’AF

1. Rationnel de l'étude

Comme exposé dans la partie I de ce mémoire, un large éventail de méthodes de fabrication a été utilisé pour synthétiser des matériaux de composition et d'architecture diverses pour la réparation de l'AF. L'ensemble de ces études a permis de mettre l'accent sur l'importance du biomatériau à participer activement au processus de régénération du tissu, en agissant non seulement comme un support physique des cellules, mais aussi en favorisant la prolifération cellulaire, la production et le dépôt organisé de MEC grâce à leur architecture. De plus, ce biomatériau doit être dégradable afin que le tissu néoformé puisse progressivement le remplacer et doit être biocompatible pour ne pas provoquer de réactions à corps étranger.

Au cours de la dernière décennie, la technique d'électrospinning a été de plus en plus utilisée pour reproduire la structure lamellaire de l'AF. En effet, grâce à cette technique, des micro- ou nano-fibres alignées sont déposées de manière à produire des structures membranaires présentant une architecture similaire à celles formées par les fibres de collagène au sein de l'AF, créant ainsi un microenvironnement proche de celui du tissu naturel. L'utilisation d'un biomatériau composé de fibres orientées favorise le maintien du phénotype des cellules de l'AF en contribuant à leur orientation et au dépôt d'une MEC hautement organisée^{96, 160,286-290}. Cependant, les propriétés mécaniques de la plupart des matériaux synthétisés de nos jours sont inférieures à celles de l'AF natif ou ne permettent pas l'infiltration cellulaire. Comme expliqué au sein de notre revue, seules 4 études ont retenu notre attention : les 2 premières reportent la fabrication de matériaux électrospinnés avec des propriétés mécaniques de résistance aux tensions similaires à celles rapportées dans la littérature pour une lamelle d'AF humaine^{291,292}, les 2 autres développent des matériaux bi-lamellaires dont les propriétés mécaniques correspondent au module de traction circonférentielle de l'AF humain multi-lamellaire^{293,294}. L'ensemble de ces études utilise des matériaux électrospinnés et illustre donc l'intérêt majeur de cette technique pour reproduire l'architecture spécifique de ce tissu principalement

collagénique. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser et de développer cette technique au sein de notre laboratoire.

Dans ce chapitre, après une brève description de la technique d'électrospinning et du matériau utilisé : le polycaprolactone, les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse, sous la forme d'un article seront exposés.

1.1. Electrospinning

L'électrospinning est une technique ancienne, brevetée par Formhals en 1934, qui a été perfectionnée au cours du temps et a fait l'objet d'une cinquantaine de brevets supplémentaires²⁹⁵. Cette technologie utilise des forces électrostatiques pour produire, à partir de solutions de polymères, des membranes non-tissées constituées de fibres (synthétiques ou naturelles) dont le diamètre varie de quelques nanomètres à quelques microns. Depuis le début des années 1990, l'électrospinning attire l'attention de la communauté scientifique, de l'industrie et le nombre de publications sur l'électrospinning augmente chaque année de façon exponentielle (Figure 23). Avec l'expansion de cette technologie, plusieurs groupes de recherche ont mis au point des systèmes de plus en plus sophistiqués qui peuvent fabriquer des structures plus complexes de manière contrôlée et reproductible²⁹⁵.

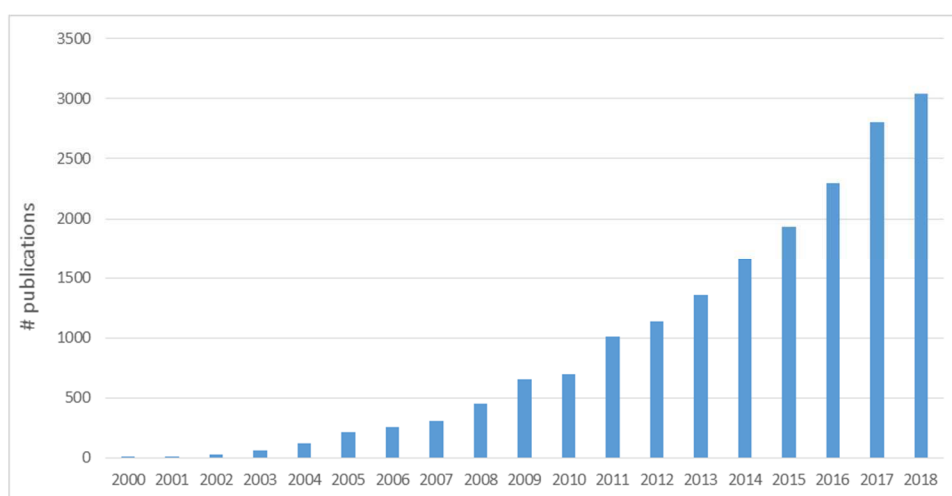


Figure 23. Nombre de publications par année (2000-2018) en utilisant l'électrospinning comme mot clé pour la recherche documentaire (Source des données : Science Direct).

Le principe de l'électrospinning est simple mais il est nécessaire d'en contrôler le processus car de nombreuses variables ont une influence sur les propriétés du produit final. Une installation typique comporte quatre parties (Figure 24): un pousse seringue avec une seringue contenant la solution de polymère, une unité collectrice (fixe ou rotative) et une ou deux alimentations haute tension. L'aiguille de la seringue joue le rôle d'électrode afin de charger positivement la solution de polymère tandis qu'un collecteur conducteur joue le rôle de contre électrode. Le collecteur (habituellement un écran métallique, une plaque ou une roue) peut être relié à la terre ou à un générateur de courant négatif selon le type d'appareillage. Au cours du processus d'électrospinning, une différence de potentiel électrique est appliquée entre la gouttelette de solution polymérique à l'extrémité de l'aiguille et le collecteur. Une fois qu'une gouttelette de solution de polymère est formée, la force électrostatique créée s'oppose à la tension de surface de la solution et la goutte de polymère est déformée. La gouttelette prend alors progressivement une forme conique appelée cône de Taylor. Un jet est alors émis et s'étire à l'extrémité de cette goutte. Quand le jet s'éloigne de l'aiguille, le solvant au sein de la solution de polymère va s'évaporer au cours du procédé et une instabilité va se créer entre la tension de surface et les charges de répulsion électrostatiques. Cette instabilité induit un mouvement « en serpent » du jet à très grande vitesse qui étire la fibre. Une fibre continue de polymère se dépose alors sur le collecteur²⁹⁵⁻²⁹⁷.

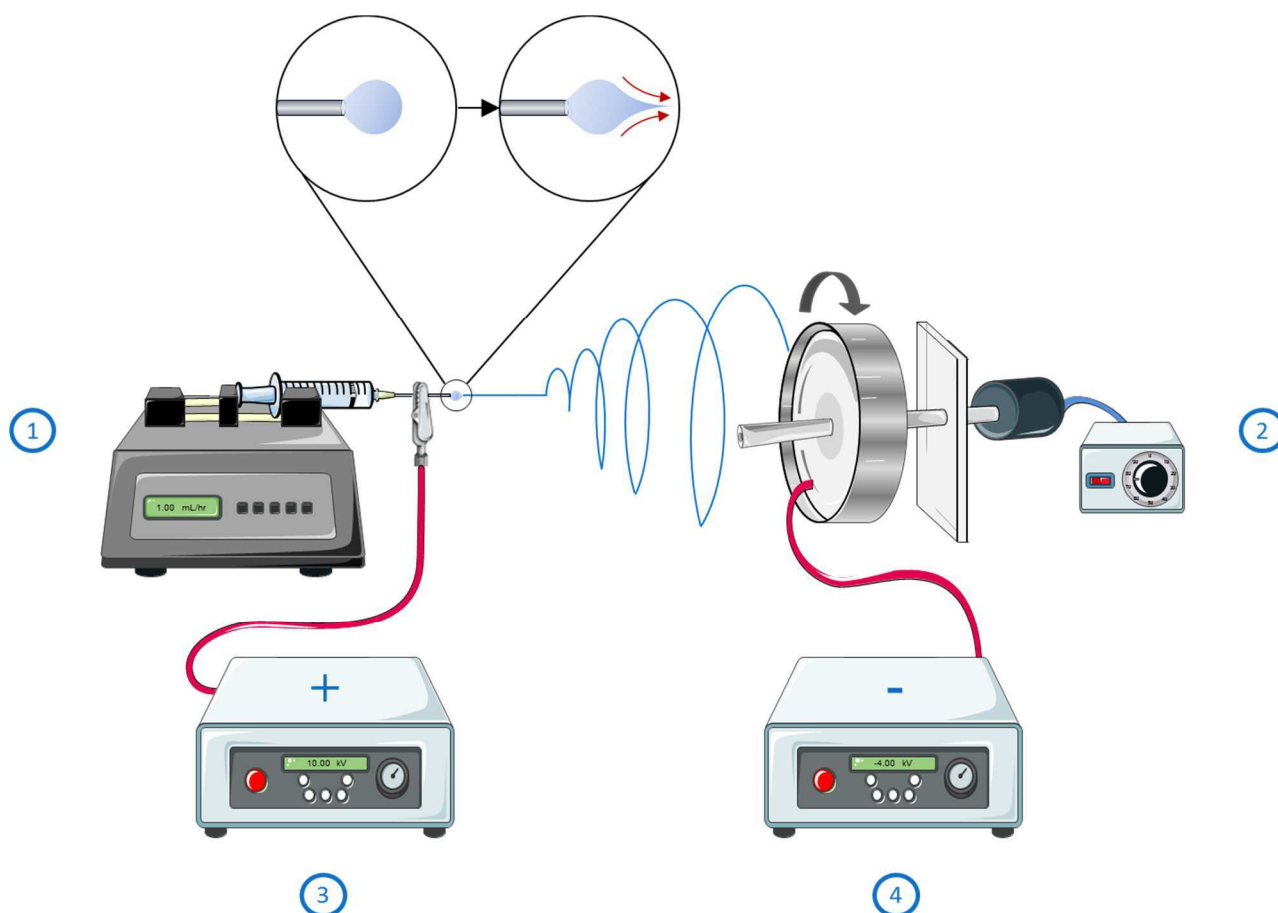


Figure 24 : Principe d'électrospinning. L'appareil utilisé au sein du laboratoire RMeS est constitué d'une pompe seringue (1), d'une roue collectrice reliée à un moteur (2), d'un générateur de haute tension positive (3) et négative (4). Au cours de l'électrospinning, la solution de polymère est extrudée à un débit constant à l'extrémité de l'aiguille chargée positivement. La goutte s'étire et forme un jet qui s'allonge linéairement dans un premier temps, puis rentre dans une zone d'instabilité. Le jet subit alors un mouvement d'accélération sous forme de torsade et s'étire jusqu'à être déposé sur la roue collectrice chargée négativement.

L'électrospinning est dépendant de nombreux paramètres qui peuvent être classés en différentes catégories : les paramètres environnementaux (température, hygrométrie), les paramètres de procédé et les propriétés intrinsèques à la solution de polymère. Les paramètres de la solution comprennent la viscosité, la conductivité, le poids moléculaire et la tension superficielle. Les paramètres du procédé comprennent le champ électrique appliqué, la distance entre la pointe et le collecteur et le débit d'extrusion. Chacun des paramètres est étroitement lié et affecte de façon significative la morphologie des fibres obtenues. En jouant sur l'ensemble de ces paramètres, différentes géométries de membranes peuvent être obtenues pour des applications très variées : textile, énergie, biomédicales, cosmétiques ou encore agroalimentaires²⁹⁵⁻²⁹⁷.

Actuellement, de nombreuses industries à travers le monde ont adopté cette technique dans le développement de nombreux produits tels que ProTura[®], Exceed[™], Mimetix[®], NanoAligned[™], NanoECM[™], NanoCare[™], Absorv[®], Tegaderm[™] et Rivelin[®] Patch, etc....

Dans le domaine biomédical, il est maintenant établi qu'un grand nombre de tissus musculo-squelettiques tels que les os, le cartilage, le tendon, le muscle, le ligament, la zone d'insertion du tendon à l'os, le ménisque et le DIV peuvent être assimilés à des structures fibreuses hautement organisées (Figure 25)²⁹⁸. L'électrospinning est un procédé particulièrement adapté pour générer des assemblages de fibres reproduisant les structures anisotropes fibrillaires de ces tissus musculo-squelettiques. De plus, il a été démontré que les structures obtenues par électrospinning permettent de façonner la morphologie cellulaire, de guider la migration cellulaire et d'affecter la différenciation cellulaire²⁹⁹⁻³⁰¹. Il a également été suggéré que l'alignement de fibres peut accélérer la vitesse de fermeture d'une plaie. En effet, l'alignement limite la voie de migration des cellules à une certaine direction et ainsi réduit le temps nécessaire aux cellules colonisant les fibres alignées pour réparer une zone donnée, comparé à celles sur des fibres non alignées³⁰².

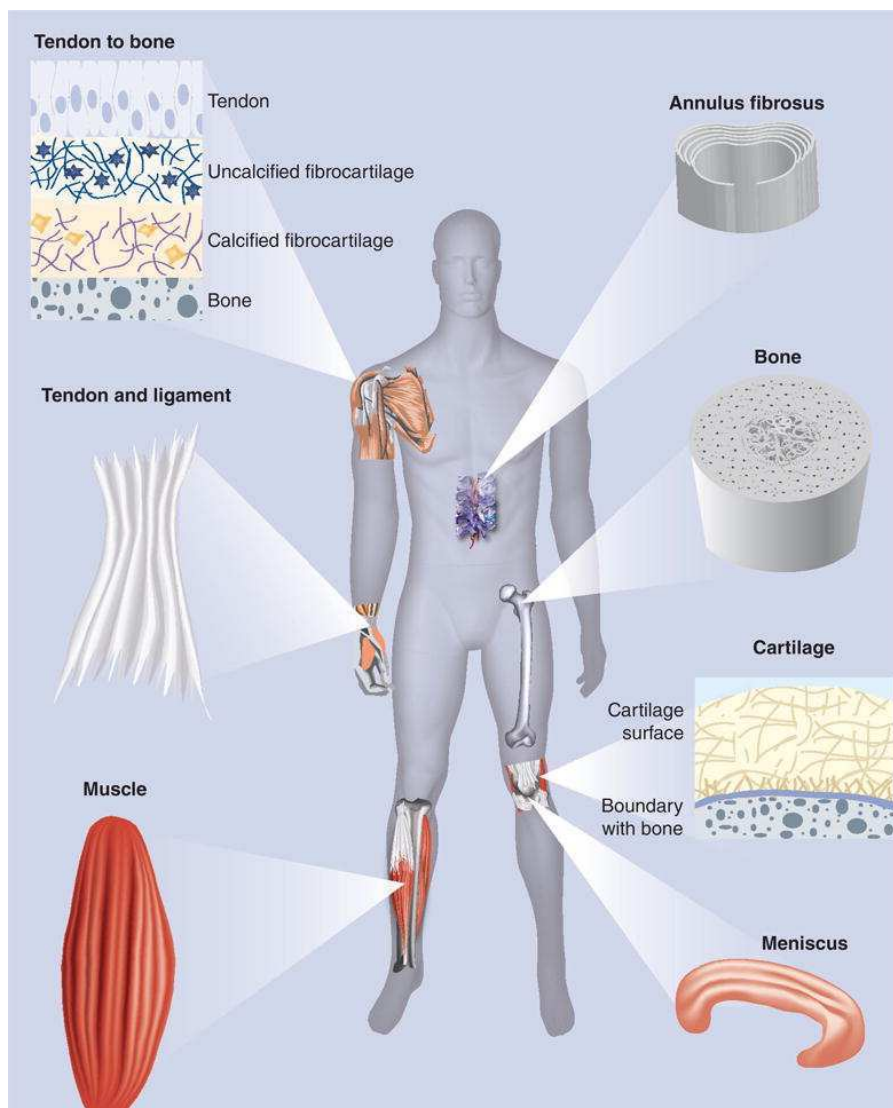


Figure 25 : Organisation en fibres de collagène de différents tissus musculo-squelettiques. Les fibres de collagène sont alignées dans les tissus tendineux et ligamentaires, le ménisque et l'anneau fibreux. Le cartilage et l'os contiennent de fines fibres de collagène disposées en couches (d'après Ma et al. 2013³⁰³).

L'électrospinning a déjà été appliqué avec succès pour générer des fibres à partir d'une centaine de types de polymères différents. Les protéines matricielles naturelles tels que le collagène, l'élastine, la fibrine et les polymères synthétiques comme le poly(ϵ -caprolactone) (PCL), l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), le poly(oxyde d'éthylène) (PEO) et l'acide poly(L-lactique) (PLA) peuvent toutes être préparées sous forme de fibres grâce à l'électrospinning. Les polymères naturels présentent une meilleure biocompatibilité et une faible immunogénicité, comparés aux polymères synthétiques. Toutefois, une dénaturation partielle des polymères naturels et une résistance mécanique généralement très faible ont été démontrées ce qui limite

leur utilisation dans des applications biomédicales³⁰⁴. Les polymères synthétiques sont relativement moins chers et plus pratiques à utiliser que les polymères naturels. Les polymères synthétiques offrent souvent de nombreux avantages par rapport aux polymères naturels comme leur facilité de polymérisation et de fabrication. De plus, ils peuvent donner un large éventail de propriétés mécaniques et possèdent des vitesses de dégradation variables²⁹⁵. Parmi les polymères synthétiques, le PCL est l'un des plus faciles à manipuler et peut être façonné en une large gamme de formes et de tailles grâce à sa basse température de fusion et à ses propriétés viscoélastiques. Le PCL est non toxique, peu coûteux et a de bonnes propriétés mécaniques et une lente dégradation^{305,306}.

Au regard de toutes ces données, l'utilisation de PCL pour la fabrication d'un implant dans le cadre de la réparation de l'AF a été choisi.

1.2. Polycaprolactone

Le PCL est un polyester aliphatique linéaire étudié depuis les années 1930. Le PCL, dont la masse molaire varie généralement entre 3 000 et 100 000 g.mol⁻¹, peut être synthétisé par deux voies de production : la polycondensation d'un acide hydroxycarboxylique : l'acide 6-hydroxyhexanoïque et la polymérisation par ouverture de cycle (Ring-Opening Polymerization en anglais, ROP) d'une lactone : l' ϵ -caprolactone³⁰⁷.

Le PCL est biocompatible, biorésorbable et est un polymère synthétique peu coûteux. En raison de sa nature semi-cristalline et hydrophobe, il présente un taux de dégradation très lent (2 à 3 ans selon le poids moléculaire de départ et la forme) et des propriétés mécaniques adaptées à diverses applications^{305,306}. L'utilisation de PCL dans le domaine de l'ingénierie tissulaire est de plus en plus répandue et il constitue l'un des polymères les plus électrospinnés de la dernière décennie. Le nombre de publications sur le PCL électrospinné augmente chaque année de façon exponentielle (Figure 26).

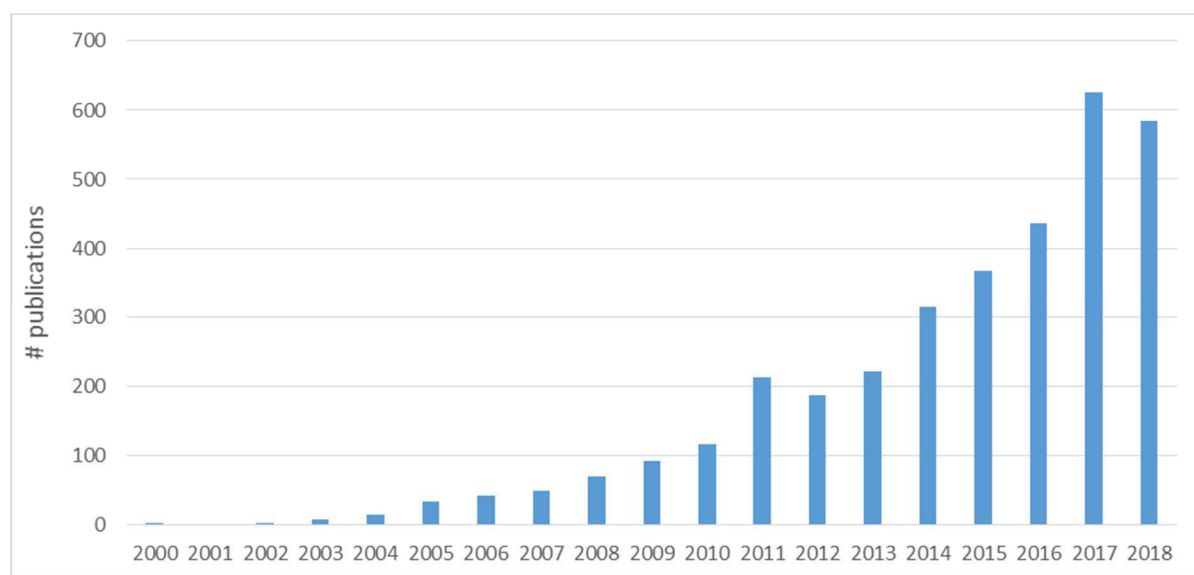


Figure 26. Nombre de publications par année (2000-2018) utilisant le PCL et l'électrospinning comme mots clés pour la recherche documentaire (Source des données : Science Direct).

Grâce au nombre croissant d'études, il existe de nombreuses informations sur la dissolution du PCL dans divers solvants, seul ou en association avec d'autres polymères naturels ou synthétiques. Lorsqu'elles sont obtenues par électrospinning, les fibres de PCL sont constituées à la fois de régions cristallines et de régions amorphes. Les régions cristallines apparaissent lors de l'évaporation du solvant et les chaînes moléculaires forment des cristallites orientées dans l'axe des fibres. Entre les cristallites se trouvent des zones amorphes avec des chaînes de polymère reliant ces cristallites. Plus les fibres de PCL seront fines, plus les chaînes de polymère seront orientées au sein des cristallites, elles-mêmes orientées le long de l'axe principal des fibres, plus la résistance à la tension sera forte et la dégradabilité sera lente. Ainsi, il est possible d'ajuster la dégradabilité et les propriétés mécaniques du produit électrospinné en jouant sur le diamètre des fibres synthétisées. En raison de cette adaptabilité, le PCL peut être utilisé dans l'ingénierie d'une large variété de tissus, allant des tissus durs comme l'os à des tissus mous comme les tendons et l'AF.

Comme expliqué précédemment, le PCL se dégrade lentement. En effet, ce polymère synthétique n'est pas dégradé enzymatiquement chez les mammifères en raison de l'absence

d'enzymes appropriées. La dégradation de ce polyester semi-cristallin en milieu aqueux dépend de sa masse molaire, de sa forme, de son autocatalyse et se produit en deux étapes^{306,308-311}:

- la première étape s'effectue par la diffusion de l'eau dans les régions amorphes, suivie par la scission hydrolytique des liaisons esters dans ces régions amorphes, entraînant une perte de masse et une augmentation de la cristallinité. Le produit de dégradation de cette étape est l'acide 6-hydroxycaproïque qui est libéré dans le milieu (Figure 27). Cette molécule peut être absorbée par les cellules et est ensuite métabolisée dans le cycle de Krebs pour être éliminée dans l'urine. La dégradation est autocatalysée par les acides carboxyliques formés lors de l'hydrolyse.
- la deuxième étape, plus lente, concerne la dégradation des domaines cristallins. En effet, lorsque le PCL devient plus cristallin et voit sa masse molaire diminuer (moins de 3 000 g.mol⁻¹), une dégradation intracellulaire commence par absorption de fragments de PCL dans des phagosomes de macrophages, de cellules géantes et de fibroblastes.

Le PCL est donc particulièrement intéressant pour la préparation de dispositifs implantables à faible vitesse de dégradation nécessaire pour la régénération de tissus ayant un remodelage lent comme l'AF.

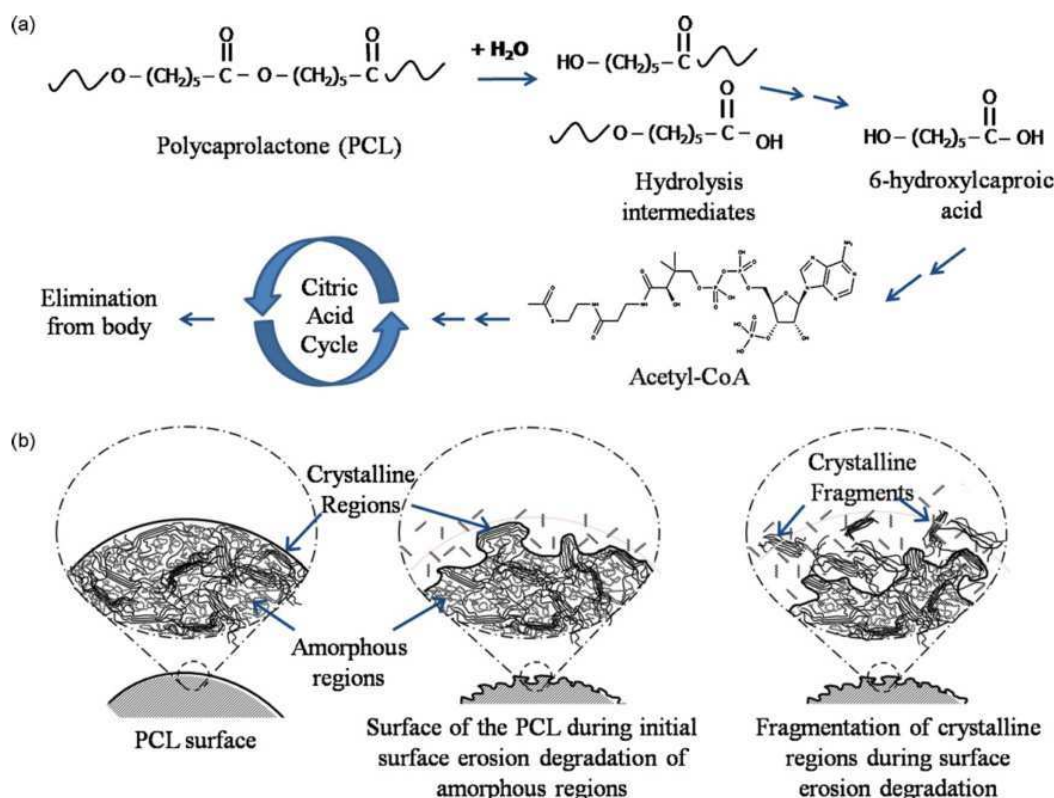


Figure 27. Dégradation du PCL : (a) hydrolyse des zones amorphes du PCL, avec production du produit intermédiaire : acide 6-hydroxyl caproïque qui est ensuite éliminé du corps via le cycle de Krebs. (b) Illustration d'une dégradation de surface du PCL avec une hydrolyse des zones amorphes suivie par une fragmentation des zones cristallines (d'après Woodruff et al. 2010³¹⁰).

Enfin, le PCL est un matériau approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) et est utilisé dans divers dispositifs médicaux (Figure 28):

- Un matériau d'obturation des canaux dentaires (ResilonTM, Pentron Clinical Technologies) composé de PCL et contenant également du verre bioactif, de l'oxychlorure de bismuth et du sulfate de baryum³¹².
- Du fil de suture monofilament résorbable (Monocryl[®], Ethicon Inc.). Le PCL se trouve sous forme de copolymère avec un glycolide^{309,313,314}.
- Un tube de diamètre variable (4 à 10 mm) pour la régénération nerveuse (Neurolac[®] Nerve Guide, Polyganics), le PCL est en association avec de l'acide poly-(L)-lactique (PLLA)^{310,315}.

- Dans le domaine orthopédique (Artlelon®, Artimplant) en association avec du polyuréthane. Artelon® peut être utilisé sous forme de patch fibrillaire ou de film et est employé dans un grand nombre d'applications orthopédiques (réparation des os, des tendons)^{310,316,317}.

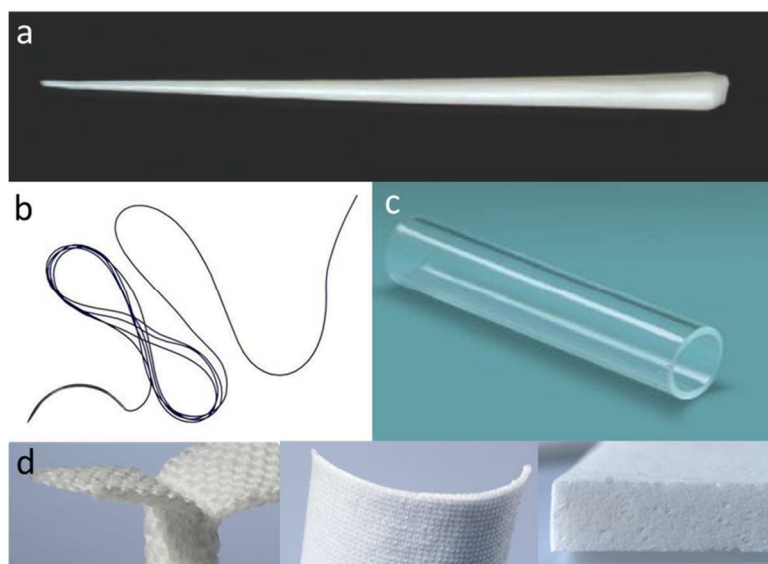


Figure 28. Dispositifs médicaux à base de PCL. a. Resilon™ matériau d'obturation dentaire, b. Monocryl® fil de suture résorbable, c. Neurolac® tube pour la régénération nerveuse, d. Différentes formes du dispositif Artlelon® pour des applications orthopédiques (Source iconographique : fabricants)

L'un des inconvénients du PCL, cependant, est sa nature hydrophobe, ce qui limite l'adhésion cellulaire. Pour remédier à ce problème, les techniques de modification de surface peuvent modifier les propriétés chimiques et/ou physiques de la surface. Différentes approches de modification de surface du PCL peuvent être utilisées tels que des traitements chimiques (plasma...) ou des traitements de revêtement de surface (« coating » de surface).

Les traitements chimiques, tel que le traitement au plasma ou à l'hydroxyde de sodium (NaOH), modifient la charge de surface afin d'augmenter l'hydrophilicité du polymère, en introduisant des groupes hydroxyle (-OH), carbonyle (-C=O) ou encore des groupes carboxylate (-COOH), en surface^{305,318}.

Les procédés de revêtement de surface peuvent être réalisés par liaison covalente de certaines protéines comme la laminine, la gélatine, le collagène et la fibronectine ou encore greffage de

séquence Arg-Gly-Asp (RGD). Ces protéines et sites de fixation rentrent en jeu dans l'interaction avec les cellules et fournissent des signaux de reconnaissance majeure pour l'adhésion cellulaire^{305,318}.

La stérilisation du PCL ne peut pas se faire par autoclave car dans le cas de polyester aliphatique l'utilisation de températures/pressions élevées (115 à 121°C pendant 20 à 30 minutes), conduit à la déformation de la matrice et à un changement de phase en raison de sa température de fusion basse (entre 54 et 64°C). La stérilisation à l'aide d'un gaz tel que l'oxyde d'éthylène peut être envisagée, cependant, les vapeurs de gaz résiduels laissées dans ces appareils se sont avérées mutagènes, cancérigènes et allergisantes^{319,320}. La stérilisation par rayon gamma a, quant à elle, été montrée comme induisant une scission des chaînes au sein du polymère et une altération des propriétés mécaniques du PCL. Une alternative à ses méthodes de stérilisation est l'utilisation de rayonnement ultraviolet (UV) et/ou de bain d'éthanol 70%, considérés comme deux méthodes de décontamination. Aucune altération macroscopique des fibres ainsi que des propriétés physico-chimiques du PCL après exposition aux UV ou immersion dans l'EtOH n'a été observée. Il s'agit des techniques les plus couramment utilisées pour la décontamination de PCL dans le cadre d'étude d'ingénierie tissulaire au sein d'un laboratoire de recherche^{305, 318,321}.

Le traitement aseptique (salle blanche...) est cependant la technique la plus adaptée pour obtenir un matériau stérile composé de PCL. C'est une technique efficace, mais quelque peu coûteuse, pour de telles formulations. En raison de l'excellente solubilité de ce polymère dans un certain nombre de solvants organiques (dichlorométhane (DCM), diméthylformamide (DMF), chloroforme (CF), acétone, trifluoroéthanol (TFE)...), il peut être stérilisé par filtration. Ce type de polymère peut donc être formulé dans un environnement stérile selon les bonnes pratiques de fabrication (BPF). Cette technique a permis la mise sur le marché des différents dispositifs médicaux cités précédemment.

1.3. Projet de thèse

Le PCL est donc un polymère synthétique peu coûteux, biocompatible, dégradable et approuvé par la FDA. Il est utilisé dans divers dispositifs médicaux et dans de très nombreuses études scientifiques d'ingénierie tissulaire (os, cartilage, tendon/ligaments, cœur, vaisseaux, nerf, derme, DIV...) en raison de sa facilité de manipulation. Toutes ces raisons nous ont conduits à utiliser ce matériau dans notre étude en combinaison avec la technique d'électrospinning afin d'obtenir un implant présentant une architecture lamellaire 3D constituée de fibres micrométriques de PCL alignées mimant l'organisation de l'AF natif. Dans un premier temps, ce matériau a été caractérisé morphologiquement et mécaniquement puis a été testé, d'une part, dans un modèle *ex vivo* de culture d'explant d'AF et, d'autre part, dans un modèle *in vivo* de défaut induit dans l'AF de brebis.

2. Résultats expérimentaux

Ma première année de thèse a été consacrée à la mise au point et au développement de la technique d'électrospinning au sein du laboratoire. L'appareil, originellement au sein d'une cage de Faraday, a été déplacé sous une hotte à flux laminaire afin de permettre d'intervenir sur les divers équipements lors de l'expérience et de limiter l'exposition aux vapeurs de solvant lors de l'ouverture de la cage. La hotte étant reliée à la terre, un générateur de haute tension négative a été acheté afin de diriger les fibres électrospinnées spécifiquement vers le collecteur. Une formation à l'utilisation de la technique d'électrospinning a été réalisée au sein du laboratoire du professeur Sing Yian CHEW, à l'université de technologie de Nanyang à Singapour, spécialisé dans l'utilisation de la technique d'électrospinning et le maniement du PCL. Dans le cadre de cette collaboration (Programme MERLION #6.01.14), une roue collectrice a été conçue par le laboratoire du Pr. Chew et incorporée dans l'appareil d'électrospinning de notre laboratoire afin d'obtenir un matériau composé de fibres alignées. Deux types de membranes ont pu alors être obtenues avec cet appareillage : des membranes

constituées de fibres de polymère non orientées lorsque la roue collectrice tourne à faible vitesse (320 rpm) et des membranes constituées de fibres de polymère alignées à l'axe de rotation de la roue lorsque celle-ci tourne à grande vitesse (2400 rpm).

Au cours de la première année de thèse, divers solvants (dichlorométhane (DCM), diméthylformamide (DMF), trifluoroéthanol (TFE)) et mélanges de solvants (DCM:DMF, DCM:EtOH, DCM:EtOH:H₂O, TFE:H₂O) ont été testés pour dissoudre le PCL. L'ensemble de ces tests a permis de sélectionner les conditions idéales (concentration du polymère, solvant, voltages (générateur positif et négatif), débit d'injection du polymère, distance entre l'aiguille et le collecteur) afin d'obtenir des fibres de manière stable dans notre système. La reproductibilité de la production des membranes de PCL a été démontrée en utilisant des tests de traction, optimisés pour nos matériaux, durant lesquels une tension uniaxiale est appliquée.

Des tests *in vitro* préliminaires ont alors été effectués afin de vérifier la possibilité d'attachement et de prolifération de cellules d'AF à la surface de nos matériaux. Comme expliqué précédemment, le PCL ne peut pas être stérilisé par autoclave et est très hydrophobe. Ainsi, dans le but d'utiliser ce matériau dans notre étude, un protocole mis en place au sein du laboratoire du Prof. Chew a été utilisé pour pallier ces deux problèmes. Ce protocole consiste à décontaminer les surfaces des membranes de PCL par exposition aux UV, puis à les immerger dans du sérum de veau fœtal (SVF) stérile pendant une nuit. La culture de ces membranes électrospinnées sur milieu Luria-Bertani (LB) sans antibiotique et en milieu de culture (DMEM, 10% SVF) sans antibiotique pendant une semaine n'a montré aucune contamination bactérienne de nos matériaux. En association avec le Centre de Recherche et d'Investigations Précliniques (CRIP) de l'Ecole Nationale Vétérinaire-ONIRIS de Nantes, des cellules d'AF de brebis ont été obtenues par digestion d'explants avec un cocktail d'enzymes (trypsine, hyaluronidase, collagénase³²²) puis ont étéensemencées et cultivées sur ces membranes de PCL jusqu'à 28 jours. Un recouvrement de l'intégralité de la surface des membranes par les cellules a été

observé à J28. Ces expérimentations ont permis de valider qu'il était possible de cultiver des cellules d'AF de brebis à la surface de membranes de PCL électrospinnées. Par la suite, afin d'évaluer la faisabilité de l'utilisation de notre implant non cellularisé pour la réparation de l'AF, nous avons développé un modèle de culture d'explant d'AF en présence d'une membrane de PCL électrospinnée. Ce modèle nous a permis de mimer *ex vivo* la capacité des cellules d'AF présentes dans les tissus environnants *in vivo* à migrer, coloniser et proliférer à la surface de notre implant.

En parallèle, un nouveau modèle animal a été développé, en collaboration avec les Drs. C. Decante et C. Moraru du CHU de Nantes ainsi que Dr. Marion Fusellier, Pr. Olivier Gauthier, Dr. G. Vaillant, P. Roy, D. Rouleau, C. Raphael, S. Madec, I. Leborgne, and Dr. G. Touzot-Jourd du CRIP. Ce modèle permettra d'évaluer notre implant (empilement d'une dizaine de membranes de PCL) pour la régénération de l'AF. Pour cela, des tests d'implantation *ex vivo* et *post mortem* sur des rachis lombaires de brebis ont été réalisés afin de comparer différentes méthodes d'induction de défaut (biopsie, emporte-pièce, scalpel) ainsi que différentes techniques de fixation de l'implant au sein du défaut. La technique d'induction d'un défaut de 2 x 3 mm à l'aide d'un scalpel, ainsi que l'utilisation d'un patch externe fixé aux vertèbres adjacentes avec de la colle, ont été jugées optimales pour notre étude. Le patch externe a été sélectionné de manière à avoir un matériau n'induisant pas de réponse biologique et sera utilisé dans toutes les conditions, y compris les contrôles (défaut vide et AF sain). Le matériau choisi est un feutre de polytétrafluoroéthylène (PTFE, Bard®) communément utilisé en chirurgie générale, vasculaire et cardiaque. Il est employé sous forme patch, comme « appui » pour les sutures lorsqu'il existe un risque de déchirure des tissus suturés, et comme matériel de remplacement de segments du myocarde ventriculaire après résection³²³. Le PTFE est un polymère hydrophobe, biologiquement inerte et non biodégradable, il devrait donc correctement remplir son rôle de structure de maintien externe sans induire une réponse de

l'organisme. Une colle de cyanoacrylate (Leukosan® Adhesive, BSN Medical) a été sélectionnée afin de fixer les patches de PTFE aux vertèbres, tout en évitant le contact de la colle avec les DIV abordés. Cette colle biocompatible est couramment utilisée pour la fermeture cutanée de plaies ou d'incisions chirurgicales.

Les tests d'implantation *post mortem* nous ont également permis de valider la voie d'abord latérale gauche (c.à.d. lombotomie gauche) pour atteindre 5 disques lombaires de l'animal. Nous avons alors rédigé une saisine (APAFIS 10248) dans le cadre de ce projet de thèse, qui a été validée par le comité d'éthique du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

Suite à la mise en place de l'ensemble des techniques décrites ci-dessus, nous avons pu réaliser notre étude de caractérisation morphologique et mécanique de nos membranes électrospinnées orientées et non-orientées, puis nous les avons évaluées dans un modèle *ex vivo* de colonisation spontanée. Enfin, des implants constitués d'un empilement de membranes de PCL électrospinnées (2 mm d'épaisseur, ~ 8 to 10 membranes) ont été implantés dans des défauts au sein l'AF externe de brebis afin de déterminer si ces implants pouvaient être tolérés et induire la formation de tissu de réparation anisotrope sans provoquer de réaction à corps étranger.

3. Article expérimentale

L'ensemble des résultats obtenus est décrit dans l'article II : « ***In vitro and in vivo evaluation of an electrospun-aligned micro fibrous implant for Annulus fibrosus repair*** ». M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, C. Decante, C. Moraru, M. Dutilleul, J. Veziers, J. Lesoeur, D. Dumas, J. Abadie, A. Hamel, E. Bord, S.Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage - En cours de révision dans le journal Biomaterials.

ARTICLE II

In vitro and in vivo evaluation of an electrospun-aligned micro fibrous implant for

Annulus fibrosus repair

M. Gluais, J. Clouet, M. Fusellier, C. Decante, C. Moraru, M. Dutilleul, J. Veziers, J. Lesoeur,
D. Dumas, J. Abadie, A. Hamel, E. Bord, S.Y. Chew, J. Guicheux, C. Le Visage

(En cours de révision - Biomaterials)

Résumé

Suite au traitement d'une hernie discale par discectomie partielle, les lésions non réparées au sein de l'*Annulus fibrosus* (AF) ont été montrées comme étant associées à un risque de réapparition de la hernie, à des douleurs discogéniques et à une dégénérescence discale. En raison d'une capacité de guérison intrinsèque très limitée, les défauts au sein de l'AF vont persister dans le temps, il est donc nécessaire d'adopter une stratégie appropriée pour fermer et réparer les AF endommagés. Dans notre étude, une membrane biodégradable acellulaire constituée de microfibres alignées de polycaprolactone (PCL) électrospinnées a été évaluée dans un modèle de culture d'explants et a montré une induction de l'infiltration cellulaire, de l'alignement et du dépôt de matrice extracellulaire proche de l'AF natif. Des implants multi-membranaires ont ensuite été évalués dans un modèle de défaut d'AF ovin. Après 4 semaines, aucune dislocation des implants, ni réaction aiguë à un corps étranger n'a été détectée. Des analyses histologiques et immuno-histochimiques ont prouvé d'une part, l'intégration des implants avec le tissu environnant, d'autre part, le dépôt homogène de fibres de collagène alignées au sein de chaque lamelle. En conclusion, cet implant biomimétique électrospinné a fourni des résultats prometteurs en ce qui concerne la fermeture des défauts de l'AF avec une néoformation d'un tissu semblable à l'AF natif et entièrement intégré dans le tissu ovin environnant.

***In vitro* and *in vivo* evaluation of an electrospun-aligned micro fibrous implant for *Annulus fibrosus* repair**

Maude Gluais^{1,2}, Johann Clouet^{1,2,3,4}, Marion Fusellier^{1,5}, Cyrille Decante^{1,6}, Constantin Moraru^{1,7}, Maeva Dutilleul^{1,2,8}, Joëlle Veziers^{1,2,8,9}, Julie Lesoeur^{1,2,8}, Dominique Dumas^{10,11}, Jérôme Abadie¹², Antoine Hamel⁶, Eric Bord⁷, Sing Yian Chew^{13,14}, Jérôme Guicheux^{1,2,9}, Catherine Le Visage^{1,2}.

¹Inserm, UMR 1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton, Université de Nantes, ONIRIS, Nantes, F-44042, France

²Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France

³CHU Nantes, Pharmacie Centrale, PHU 11, Nantes, F-44093, France

⁴Université de Nantes, UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Nantes, F-44035, France

⁵Department of Diagnostic Imaging, CRIP, ONIRIS, College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes F-44307, France

⁶CHU Nantes, service de chirurgie infantile, PHU5, Nantes, F-44093, France

⁷CHU Nantes, service de neurotraumatologie, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France

⁸INSERM, UMS 016, CNRS 3556, Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, SC3M facility, CHU Nantes, Université de Nantes, Nantes, F-44042 France

⁹CHU Nantes, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France

¹⁰Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS - Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, F54505, France

¹¹UMS2008 IBSLor - CNRS-UL-INSERM. Plateforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire PTIBC-IBISA, Vandœuvre-lès-Nancy, F54505, France.

¹²Animal cancers as Models for Research in comparative Oncology (AMaROC), ONIRIS, College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes F-44307, France

¹³School of Chemical and Biomedical Engineering, Nanyang Technological University, Singapore 637459

¹⁴Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore 308232

Abstract

Annulus fibrosus (AF) impairment is associated with reherniation, discogenic pain and disc degeneration after surgical discectomy. Due to a limited intrinsic healing capacity, defects in the AF will persist in time, hence it is necessary to adopt an appropriate strategy to close and repair the damaged AF. In this study, a cell-free biodegradable scaffold made of polycaprolactone (PCL) electrospun aligned microfibers was first evaluated in an explant culture model and demonstrated successful promotion of cell infiltration, alignment and AF-like extracellular matrix deposition. The biomimetic multi-layer fibrous scaffold was then assessed in an ovine AF defect model. After 4 weeks, no dislocation of implants nor acute foreign body reaction was detected. Histological and immuno-histochemical analyses showed integration of the implant with the surrounding tissue and homogeneous aligned collagen fibers organized within each lamella compared to a disorganized and scarcer fibrous tissue in a randomly organized control fibrous scaffold. In conclusion, this biomimetic electrospun implant showed promising results regarding AF defect closure with an AF-like neo-tissue formation fully integrated within the surrounding ovine tissue.

Keywords

Intervertebral disc, herniation, electrospinning, polycaprolactone, multi-layer scaffold.

1. Introduction

Low back pain (LBP) is a major health issue causing disability and enormous socioeconomic burden (reaching \$253 billion dollars annually in the United States)^{1,2}. Impairment of the *Annulus fibrosus* (AF) structural integrity, arising from either biological remodeling or repetitive/traumatic events, is believed to be one major source of LBP³⁻⁷. Indeed, neo-vascularization and neo-innervation, infiltrating the intervertebral disc (IVD) through peripheral AF lesions, can give rise to discogenic pain^{8,9}, while extensive AF radial tears may lead to IVD herniation and subsequently radicular pain¹⁰. The most common surgical procedure to treat IVD herniation is called partial discectomy or herniectomy and consists of the removal of the herniated tissue to relieve radicular pain. However, despite successful pain relief and improved function, 25% of patients experience long-term unsatisfactory outcomes^{11,12}. Indeed, untreated defects in the AF have been shown to persist in time due to the limited intrinsic healing capacity of the AF. Such defects are associated with up to 20% of postoperative reherniation and increase by 20% the prevalence of IVD degeneration compared to the general population¹¹⁻²⁰.

Few procedures have been attempted for AF closure, including suturing and gluing techniques, which appear as straightforward methods. However, neither simple suturing²¹ nor more complex suture systems, such as Dines knot²² or Modified purse-string sutures^{23,24}, significantly prevented reherniation rate or degenerative processes in *ex* and *in vivo* ovine and porcine models. In addition, a 2 years follow-up multicenter randomized controlled clinical study (NCT00760799) investigating the effect of a FDA approved commercial suture technique, the XcloseTM tissue repair system (Annulex Technologies, Minnetonka, Minnesota, USA), showed no statistical reduction of post-operative pain or reherniation rate in the treated group²⁵. It is also important to point out that suturing techniques exhibit some major limitations, such as the creation of puncture holes and the permanent stretching of the AF margins, which could induce additional tears and accelerate the degeneration process^{26,27}. Likewise, few studies have investigated gluing techniques using either genipin-crosslinked fibrin gel²⁸⁻³⁰, riboflavin crosslinked high-density collagen gel^{31,32} or isocyanate-terminated polyethylene glycol-trimethylene carbonate (PEG-TMC) gel³³ in *ex vivo* and *in vivo* models. A strong adhesion to the surrounding tissue, with a possible prevention of *Nucleus pulposus* (NP) herniation, was reported. However, only a partial biomechanical restoration was achieved, with a disorganized fibrous tissue repair and no prevention of IVD degeneration. A combination of suturing and gluing techniques improved closure efficiency in a calf *ex vivo* model compared to adhesive or

suture alone. Nonetheless, this combined fixation technique was shown to fail after 100 000 cycles of load, demonstrating its inefficacy for long-term AF sealing³⁴.

In this context, implant devices appear as a promising alternative strategy since they could fill an AF defect without damaging the surrounding tissue and could induce a tissue repair. Commercial implant Barricaid™ (Intrinsic Therapeutics, Woburn, Massachusetts, USA) showed promising short term outcomes (2 years) in clinical evaluation with improved leg and back pain, preserved disc height and reduced the risk of symptomatic reherniation (NCT01283438)^{35,36}. This device is currently evaluated in two post-market surveillance registries (NCT03366779 and NCT03180749). However, its invasive implantation method using anchorage to the adjacent vertebrae with a titanium insert raises concern on possible endplate lesions³⁷ and osteophyte formation at the site of anchorage, already reported for other experimental vertebral-anchored annular devices³⁸. To overcome the lack of clinically effective therapies, a large number of natural and/or synthetic implants for AF closure were investigated *in vivo* such as a synthetic poly(lactic-co-glycolic acid) sponge³⁹, a small intestinal submucosa implant³⁸ and a textile polyglycolic acid/polyvinylidene fluoride implant⁴⁰ and demonstrated cell recruitment and collagen deposition within these implants. In addition, numerous *in vitro* studies have acknowledged the guidance of scaffold topography on the induction of hierarchical organization of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), AF cells and extracellular matrix (ECM) deposition^{41–43}.

Taken together, these results highlight the need for an implant which functions as a 3D scaffold that mimics the complex native AF structure and guides cell migration, proliferation and production of an AF-like tissue which in turn fully integrates with the surrounding tissue. However, due to the inherent complexity of the AF tissue, design of such implant remains challenging. Specifically, the AF is an anisotropic structure which is arranged in concentric lamellae, of 200 to 400 µm thickness in humans, and is mainly composed of aligned and parallel collagen fibers and proteoglycans such as aggrecan. The collagen fibers are oriented obliquely at a precise angle of 60° to the vertical axis of the spine and this inclination alternates from left to right with each lamella. Correspondingly, this confers a cross-ply structure that is essential for the biomechanical function of the AF^{44,45}. Native AF cells are mostly elongated fibroblast-like cells, which are aligned and parallel to each other and produce mainly collagen type I^{46,47}. Numerous *in vitro* studies on a variety of scaffolds have demonstrated that the use of 3D printing and electrospinning technologies are ideal for the design of a highly organized micro- or nano-fibrous AF implant^{48–50}. More precisely, polycaprolactone (PCL), a biodegradable and biocompatible material with high mechanical properties and is already used in numerous tissue

engineering strategies and clinical applications, has been widely recommended for AF repair^{41,42,51–58}. Noticeably, in a recent elegant paper, a PCL complex multi-layer scaffold, obtained by a combination of electrospinning and 3D printing technologies and sutures, was successfully used in a porcine AF defect repair⁵⁹. In this context, the present study aims at developing an electrospinning technology to design an aligned electrospun PCL scaffold that mimics the singular structure of the native AF tissue. The objective of this study was to determine whether this cell-free aligned electrospun PCL scaffold could induce spontaneous organized fibrous tissue formation *in vitro* and in a sheep study. The aligned scaffold was compared to randomly organized electrospun scaffold as a control for AF-like tissue formation.

2. Materials and Methods

2.1. Fibrous scaffold fabrication

Random and aligned non-woven fibrous scaffolds of poly(ϵ -caprolactone) (PCL, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) were produced *via* electrospinning. PCL was dissolved in 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE, Sigma-Aldrich) with concentrations of 14 and 18 wt% for random and aligned scaffolds, respectively. One mL of PCL solution was loaded in a syringe which was attached to a 22-gauge blunt-end stainless steel needle and dispensed at a flow rate of 1 mL/h using a syringe pump (BSP-99M, Linari Engineering, Pisa, Italy). To collect the PCL fibers, a 13 cm diameter rotating wheel (kindly provided by Prof. SY Chew, Nanyang Technological University, Singapore) attached to a DC motor (07SP-9032, Xajong Co., Ltd., Taichung, Taiwan) and regulated by a speed controller (XJC220-90C-B, Xajong Co.) was covered with aluminum foil and placed 10 cm from the tip of the needle. To obtain random fibers, which served as controls in this study, the needle was charged to +4.5kV using a high-voltage positive generator (HVG-P60-WEB, Linari Engineering, Pisa, Italy), while the wheel, rotating at ~320 rpm, was charged to -4kV using a high-voltage negative generator (ES30N-10W, Gamma High Voltage Research Inc., Ormond Beach, Florida, USA). To obtain aligned oriented fibers, the needle was charged to +5kV, while the wheel, rotating at ~2400 rpm, was charged to -4kV.

2.2. Fibrous scaffold characterization

2.1.1. Structural evaluation

Random and aligned scaffolds were gold-palladium-coated in a Desk III Sputter Coater (Denton Vacuum, Moorestown, New Jersey, USA) and the surface morphology was examined using backscattered electrons in a Scanning Electron Microscope (SEM, LEO 1450VP®, Carl Zeiss, Marly Le Roi, France) at an accelerating voltage of 5 kV and 25 mA. The directionality (relative

to main axis) and average diameters of random and aligned electrospun fibers (n=3) were determined using ImageJ® (1.51s, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

To evaluate their thickness with ImageJ®, PCL scaffolds (n=3) were snap frozen in liquid nitrogen and cryo-sectioned perpendicularly to the direction of the collective wheel rotation with a scalpel. The samples were prepared for SEM as described above.

Pore size distribution and porosity of scaffolds were measured by mercury porosimetry (Autopore IV 9500®, Micromeritics Instrument Corp., Norcross, Georgia, USA). Dry scaffolds (40 - 70 mg) were placed within the chamber and air was removed from the pores. Samples (n=3) were filled with mercury under reduced pressure (2 kPa) then the pressure was incrementally increased to a maximum pressure of 30 kPa. The mercury intrusion volume was measured as the pressure increased, which allowed the calculation of the pore size distribution within samples and their overall porosity.

2.1.2. Mechanical testing

Uniaxial tensile test was performed along the main fiber axis (direction of the rotation during electrospinning) using a texture analyzer (TA.HDplus, Stable Micro Systems®, Godalming, United Kingdom). Scaffold samples (n=3) were cut into 90 x 11 mm rectangles, which were clamped with serrated grips and subjected to the following testing protocol: (1) preload to 0.1 N for 5 min; (2) 10 pre-conditioning cycles to 0.1% strain applied at a rate of 2 mm/s; and (3) elongation at a rate of 1 mm/s until failure. Strain was computed as the displacement normalized to the initial gauge length and stress was calculated as the load normalized to the cross-sectional area. Young's Modulus was calculated as the slope of the linear portion of the stress-strain plot. Ultimate tensile strength and maximum elongation were determined from the stress and strain, respectively, before sample failure.

2.3. In vitro analysis

2.3.1. Sheep AF explant culture

PCL scaffolds were first cut into circular samples (1.5 cm diameter), decontaminated in 70% ethanol for 30 min, then both sides of the scaffolds were exposed to UV radiation for 30 min. Prior to culture, samples were coated with fetal bovine serum (FBS; Dominique Dutscher, Brumath, France) overnight in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂.

Six female sheep (1-year-old) with an average body weight of 35 kg were used for *in vitro* studies. Sheep were euthanized using an overdose of 140 mg/kg of pentobarbital (Dolethal®, Vetoquinol, France) and the IVDs were surgically isolated. AF tissues were carefully separated

from NP tissues using a blade, diced in pieces (~ 0.5 x 1 cm) and rinsed in three consecutive baths of phosphate-buffered saline (PBS, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) containing 2% of penicillin-streptomycin solution (P/S, Invitrogen, Paisley, UK). AF explants were subsequently placed on the FBS-coated PCL scaffolds and cultured in low attachment well-plates in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose, GlutaMAX™, pyruvate, Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 1% P/S and 0.17 mM of ascorbic acid (2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt, Sigma-Aldrich). The medium was refreshed twice a week and explants were cultured for 14 or 28 days.

2.3.2. Scaffold surface colonization

On day 14 and 28, AF explants were removed from culture plates and remaining scaffold were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Cells were permeabilized with 0.5 % Triton X-100, for 10 min at room temperature, then stained with Phalloïdin-Alexa Fluor® 568 (1:200 in PBS, Thermo Fisher Scientific) for 1h at room temperature to visualize the cytoskeleton F-actin protein using a fluorescent microscope (Axio Zoom.V16, Carl Zeiss). Cytoskeleton was used to approximate cell area and determine the surface of scaffolds covered by cells after 14 and 28 days of culture. Quantitative analyzes were performed using Image J software (n=6).

2.3.3. Cell proliferation

On day 14 and 28, AF explants were removed from culture plates and remaining scaffolds were incubated with 10µM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) solution for 24h then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. EdU and Hoechst labeling were performed using the manufacturer's specifications (ClickIT EdU®, Thermo Fisher Scientific). Visualization of cell nuclei and cells displaying EdU-incorporated DNA was performed using fluorescent microscope (Axio Zoom.V16) and quantitative analyzes were performed using a home-made image analysis software (n=6).

2.3.4. Cell morphology and phenotype

On day 14 and 28, AF explants were removed from culture plates and remaining scaffolds were processed for SEM microscopy. Scaffolds were fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 min at room temperature then dehydrated with ethanol gradient followed by two successive incubation in hexamethyldisilazane for 15 min (HMDS, Sigma-Aldrich). Dry scaffolds were gold-palladium-coated and observed using a SEM as previously described (n=3).

In a separate experiment, scaffolds were fixed with 4% paraformaldehyde at day 14 and 28. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100[®] and blocked in 3% Bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for 30 min. Cells were then stained with phalloidin-Alexa Fluor[®] 568 as previously described then incubated overnight at 4°C with primary anti-collagen type I antibody (1:250 in 1% BSA solution, Ab138492, rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, UK) or anti-aggrecan antibody (1:100 in 1% BSA, Ab1031, rabbit polyclonal, Merck Millipore, St Quentin en Yvelines, France) and subsequently with secondary antibody Alexa Fluor 488 (Goat anti-rabbit IgG (H+L), 1:1000 in 1% BSA, Thermo Fisher Scientific) for 1h at room temperature. Cell nuclei were stained with Hoechst and all samples were imaged using a confocal microscope (A1RS, Nikon, Champigny sur Marne, France). In addition, the reflection mode of the confocal microscope allowed visualization of the non-labelled underlying PCL scaffold. Quantitative analyzes of PCL fibers, F-actin and collagen type I fibers directionality were performed using the Image J software (n=3).

2.4. *In vivo* analysis

2.4.1. Ethical aspects and animals

Two sheep (1-year-old; 29 and 36 kg, Vendée breed, GAEC HEAS farm, Ligné F-44850, France) were operated in the accredited Centre of Research and Pre-clinical Investigations at the ONIRIS - National Veterinary School of Nantes with the approval of the French Ministry of Agriculture and by the ethics committee of the Région Pays de La Loire (Ethical number APAFIS 10248). Five lumbar IVDs (L1 - L2 to L5 - L6) per sheep were used for the experiments and conditions were as followed: healthy group (2 IVD), unrepaired group (2 IVD), repaired group including randomly organized scaffold (3 IVD) and aligned scaffold (3 IVD).

2.4.2. Multi-layer implant preparation

PCL scaffolds were first cut into rectangles samples (2 x 5 mm), with the aligned scaffolds sectioned in order to have the prevailing fiber direction oriented at 30° to the long axis of the rectangle. Samples were first incubated in 70% ethanol for 30 min and then both sides were decontaminated under UV light for 30 min.

The day before implantation, 50 mL of blood were drawn from the jugular vein, transferred into a sterile 50 ml polypropylene centrifuge tube and allowed to coagulate for 30 min at room temperature. Tubes were then centrifuged at 10,000 g for 15 minutes and the serum was recovered. PCL scaffolds were immediately incubated within the serum solution overnight in an incubator at 37°C and 5% CO₂.

Serum-coated PCL samples were then stacked into multi-layer constructs (2 mm height, ~ 8 to 10 layers) to mimic the multi-lamellar organization of the native AF tissue. For aligned fibers, successive layers were assembled running in alternate directions, mimicking the angle-ply structure of the AF.

2.4.3. Surgery and tissue harvesting

Sheep anesthesia was induced by intravenous injection of 2-5 mg/kg of ketamine (Imalgene 1000®, Merial, Lyon, France) and 0.2 mg/kg of diazepam (Valium®, Roche, Boulogne-Billancourt, France) and maintained by inhalation of 1-3% isoflurane (Vetflurane®, Virbac, Carros, France) and intravenous injection of 1-3 mg/kg of propofol (PropoVet®; Abbott Laboratories Ltd., Maidenhead, UK). Analgesia was obtained by intravenous injection of 5 µg/kg of fentanyl (Abbott Laboratories Ltd.), then continuously perfused at a rate of 5-20 µg/kg/h of fentanyl and 5-20 µg/kg/h of ketamine. Sheep were carefully bedded on the right side and lumbar discs were exposed using a left retroperitoneal, transpsoas approach. Once exposed, 5 lumbar IVDs were randomly assigned to one of the 4 conditions: either no defect induction (healthy control group), a box annulotomy without implant deposition (unrepaired control group), a box annulotomy with deposition of random multi-layer implant (random group) or a box annulotomy with deposition of aligned multi-layer implant (aligned group). For annulotomy groups, a ventro-lateral scalpel-induced box defect (2 x 5 mm and 2 mm depth) was created in the outer AF. All groups received an external polytetrafluoroethylene (PTFE) patch (1 x 1.25 cm, PTFE felt pledgets, 007976, Bard, Covington, Georgia, USA) glued with cyanoacrylate adhesive (Leukosan® adhesive, 72541-01, BSN Medical, Le Mans, France) onto the adjacent vertebral bodies. Both sheep received 7 mg/kg of amoxicillin and clavulanic acid during the surgery then 1.75 mg/kg/j for 5 days and 0.5 mg/kg/j of meloxicam during the first 3 days.

After 4 weeks, sheep were sacrificed under general anesthesia by intravenous injection of 140 mg/kg of pentobarbital. Lumbar spines were harvested and immediately fixed with 4% paraformaldehyde for 3 days at room temperature.

2.4.4. X-ray imaging and MRI

Pre-, post-operative as well as pre-euthanasia X-ray imaging was performed, as previously described⁶⁰, using a radiograph machine (Convix 80® generator and Universix 120 table) from Picker International (Uniontown, Ohio, USA). Coronal and sagittal plain radiographs of the sheep lumbar spines were taken with a collimator-to-film distance of 100 cm, exposure of 100 mAs, and penetration power of 48 kVp.

Pre-, post-operative as well as pre-euthanasia MRI of the entire lumbar sheep spines were also performed as previously described⁶¹ using a 1.5 Tesla MRI scanner (Magnetom Essenza[®], Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) with a standard spine coil to obtain T2-weighted images (TE: 86 ms, TR: 3000 ms; slice thickness: 3 mm) and T1-weighted images (TE: 12 ms, TR 322 ms; slice thickness: 3 mm).

Images were analyzed using Osirix software[®] (3.9, Osirix Foundation, Geneva, Switzerland). NP hydration was assessed by dividing the NP T2 signal in the middle axial position of the IVD by the T2 signal of the adjacent spinal cord in the same MRI slice. Disc height index (DHI) was measured as $DHI = \text{disc height} / \text{adjacent vertebral height}$ on both X-ray and MRI images.

2.4.5. Histological and immuno-histochemical staining

PFA-fixed lumbar discs were decalcified for 72h in a decalcifier (Shandon TBD-2TM Decalcifier, 6764004, Thermo Fisher Scientific), frozen for 3 min in isopentane/dry ice then embedded in Super Cryoembedding Medium (SCEM) (Section Lab, Hiroshima, Japan) and frozen again in isopentane/dry ice until SCEM sets. The frozen samples were sectioned at -30°C in the axial orientation, into 7 µm sections, using a cryostat (CryoStar NX70[®], Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Following standard protocol, sections were stained with Hematoxylin Eosin safran (HES), Masson's trichrome (MT) and Picrosirius red (PR).

Immunostaining for type I collagen were done using primary anti-collagen type I (1:250 in 0.1% Triton and 4% BSA, Ab138492, rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, UK) and biotinylated goat anti-rabbit secondary antibodies (1:300 dilution, E0432, Dako, Agilent technologies, Les Ulis, France). Briefly, sections were incubated with 0.1% trypsin (T9935, Sigma-Aldrich) solution for 30 min at 37°C then in freshly prepared 3% H₂O₂ solution to inactivate internal peroxidases. Sections were then blocked with 10% goat serum in 4% BSA for 30 min and incubated with the primary antibody overnight at 4°C. Incubation with biotin-labeled corresponding secondary antibody for 1h was followed by 45 min of incubation with horseradish peroxide-conjugated streptavidin (1:400, P0397, Agilent technologies). Antibody binding was visualized with diaminobenzidine (DAB, K3468, Agilent technologies), and sections were counterstained for 30 sec in hematoxylin. As a negative control, sections were processed with identical protocols, but omitting each primary antibody.

All stained sections were observed using a slide scanner (Nanozoomer[®], Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and all images were analyzed with NDP view 2 software[®] (Hamamatsu Photonics).

2.4.6. Second harmonic generation

Second harmonic generation signal measurements were performed using an APE picoEmerald laser which delivers synchronized 7 ps pulses at $\lambda = 800$ nm to a scanning microscope (SP8-CARS, Leica microsystems, Mannheim, Germany). In the SHG operation mode, the signal is filtered to detect collagen at 400 nm in the backward direction with a hybrid detector using large dynamic range combined with low dark noise. Quantitative analyzes of collagen fibers directionality were performed using the Image J software (n=3).

2.5. Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical analyzes were performed using Graph Pad Prism 5.0[®] (GraphPad, San Diego, California, USA). Statistical significance was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test for multiple group comparison with different variables (directionality), or *t*-test for two groups comparison (porosity, mechanical analysis, colonization, proliferation). Statistical significance was set at $p < 0.05$. Unless otherwise stated, experiments were repeated at least three times.

3. Results

3.1. Fibrous scaffold characterization

Aligned and randomly organized fibrous scaffolds were successfully obtained by collecting electrospun fibers on a wheel rotating at high and low speed, respectively. SEM allowed visualization of both surface and cross-section of scaffolds (Fig. 1). The cross-sectional observation of fibrous scaffolds showed a homogeneous distribution of non-hollow random and aligned fibers throughout each scaffold (Fig. 1 b-c, e-f), with an average thickness of 81 ± 7 μ m and 127 ± 8 μ m, respectively. The SEM images allowed the evaluation of both diameter and orientation of constitutive PCL fibers in both scaffolds. Random and aligned scaffolds displayed a similar fiber diameter distribution (Fig. 1g), with an average fiber diameter of 1.41 ± 0.36 μ m and 1.33 ± 0.40 μ m, respectively. Within the aligned scaffold, $88 \pm 3\%$ of fibers (sum of black boxes) were oriented at the same angle $\pm 20^\circ$, while fibers within the random scaffold did not appear to have a preferential orientation (only $33 \pm 2\%$, sum of white boxes) (Fig.1h). Random and aligned scaffold possessed similar porosity with $84 \pm 3\%$ and $81 \pm 1\%$, respectively, as determined using mercury porosimetry (data not shown).

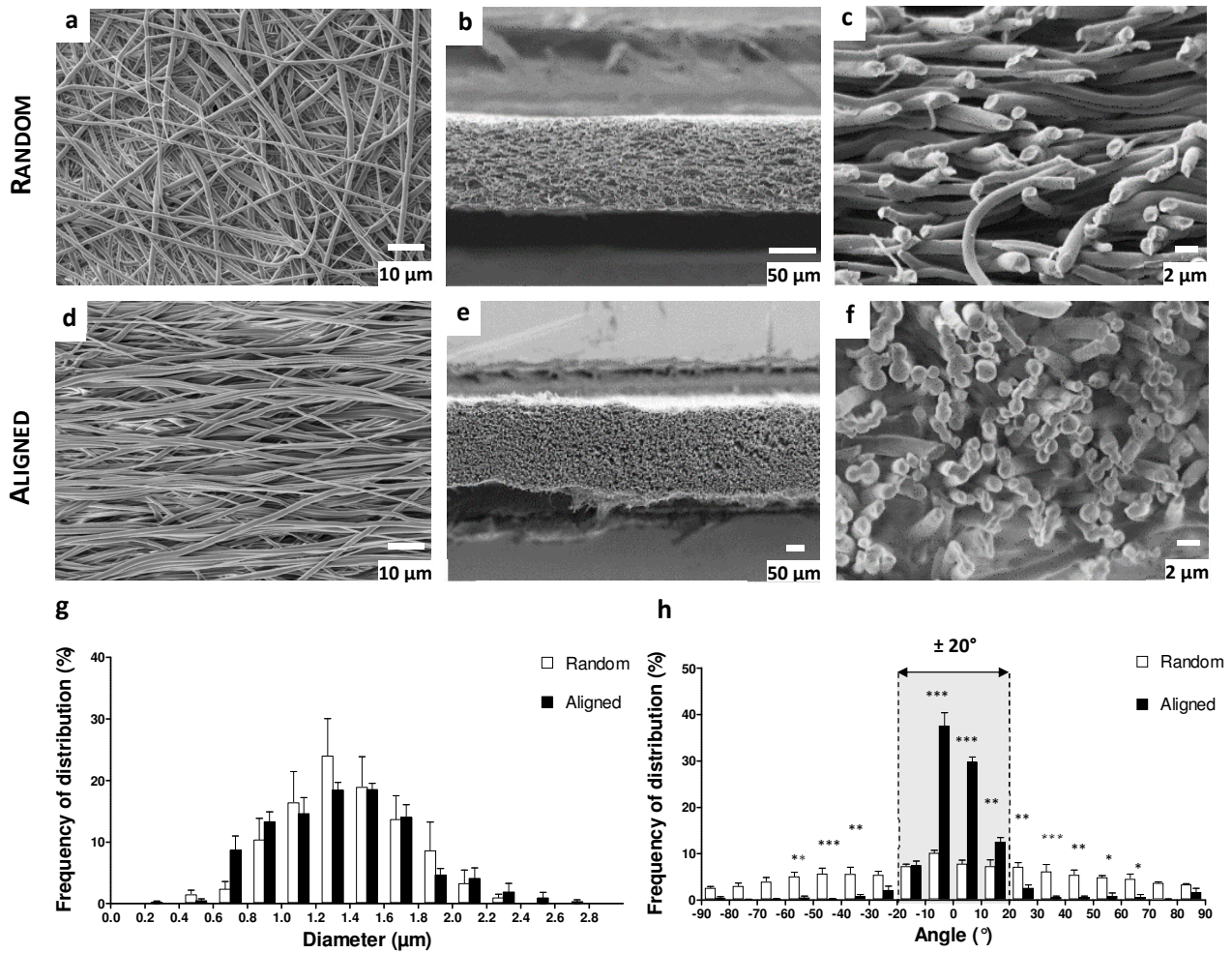


Figure 1. Characterization of electrospun polycaprolactone (PCL) scaffolds. (a-f) Scanning electron microscopy (SEM) observations of random and aligned scaffolds. Surfaces: (a, d) scale bar 10 μm. Cross-sections: (b, e) scale bar 50 μm, (c, f) scale bar 2 μm. (g) Diameter distribution and (h) angular distributions of fibers in both scaffolds. Results are expressed as mean ± SEM (N = 3, n = 1) (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, statistical difference between random and aligned scaffolds).

Using uniaxial tensile tests, typical stress-strain curves were obtained for fibrous scaffolds (data not shown) and the calculated mechanical properties were significantly different. The Young's moduli of random and aligned scaffold were calculated to be 16 ± 0.5 MPa vs 55 ± 0.6 MPa ($p < 0,0001$), which corresponds to a significant 3.5-fold increase. The ultimate tensile strengths were 19 ± 2.9 MPa vs 11 ± 0.6 MPa (no significant difference) and the failure strains were 545 ± 33 % vs 55 ± 6 % ($p < 0,0001$), respectively.

3.2. In vitro analysis

3.2.1. Scaffold surface colonization and cell proliferation

Sheep AF tissue explants were deposited onto random and aligned scaffolds for 14 and 28 days (Fig. 2a) and colonizing cells present on the scaffold surfaces were identified with F-actin staining and imaged using fluorescent microscopy (Fig. 2b). We then calculated the percentage

of the scaffold surface covered by AF cells/cluster (Fig. 2c). At day 14, AF cells covered $7.5 \pm 1.1 \%$ and $8.2 \pm 1.7 \%$ of the surface of random and aligned scaffolds, respectively (no statistical difference), while at day 28, an increase in the percentage of surface covered by cells was obtained on both surfaces, with no statistical difference between scaffolds ($50.0 \pm 3.8 \%$ vs $44.7 \pm 3.2 \%$, respectively).

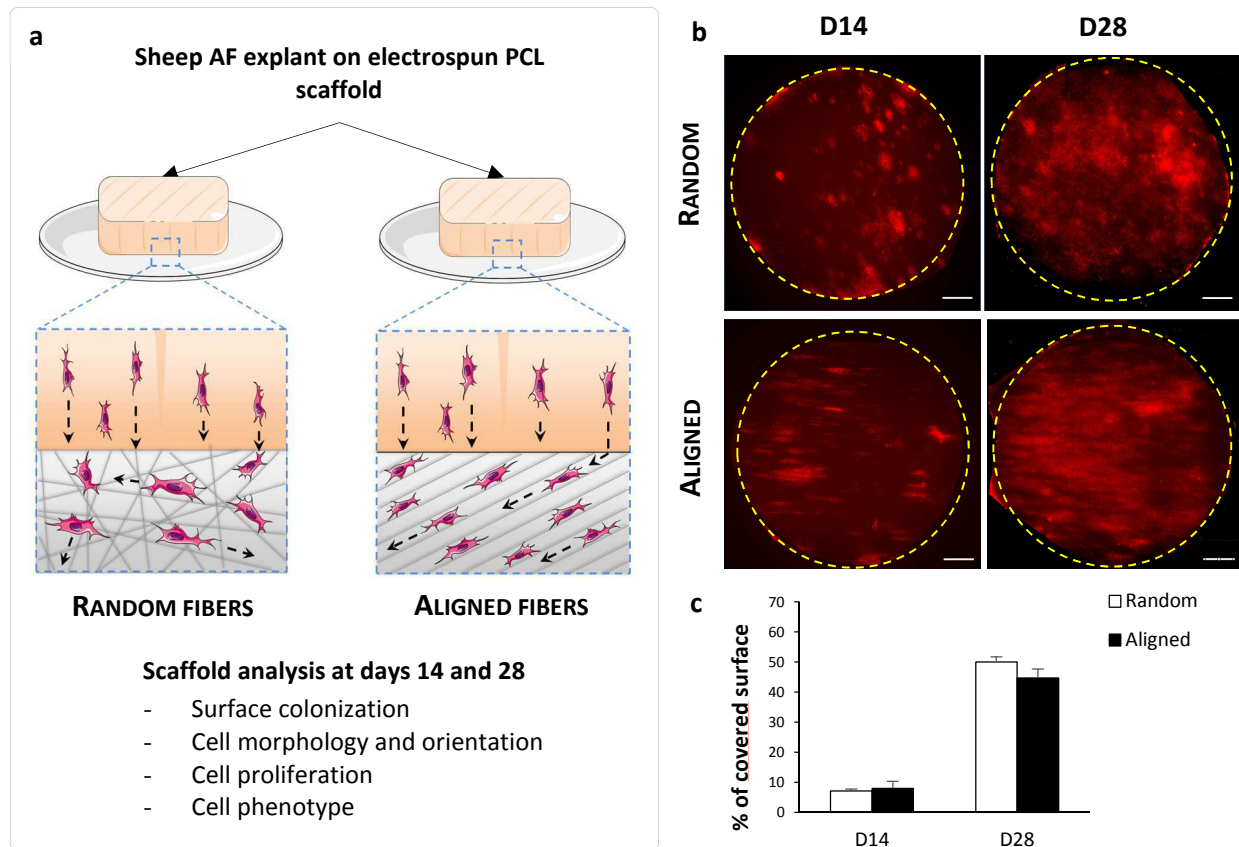


Figure 2. In vitro culture on electrospun PCL scaffolds. (a) Schematic representation of the sheep Annulus fibrosus (AF) explant culture. Apposition of an AF tissue sample onto a random or an aligned scaffold. Cells might spontaneously colonize the PCL surface and orient themselves according to the underlying scaffold architecture. (b) At day 14 and day 28, cells present on random and aligned mat surfaces (15 mm diameter, yellow dashed circles) were stained for F-actin (red) and imaged by fluorescent microscopy (scale bar 2 mm). (c) Percentage of PCL scaffold surface covered by cells after 14 and 28 days of culture. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($N = 6$, $n = 3$).

AF cell proliferation on both scaffolds was investigated with a Click EdU assay, where incorporation of the modified thymidine analogue EdU into newly synthesized DNA during 24h was evidenced by fluorescent staining (Fig. 3). The percentage of positively stained cells, displaying both Hoechst (nuclei) and EdU staining, was shown to be similar between scaffolds at both time (day 14: $56 \pm 6 \%$ and $44 \pm 8 \%$, day 28: $31 \pm 3 \%$ and $37 \pm 4 \%$ for aligned and random scaffold, respectively). Moreover, the total cell number counted on scaffold surfaces showed no statistical difference between random and aligned scaffold (data not shown), confirming the results obtained for the percentage of scaffold surface covered by cells.

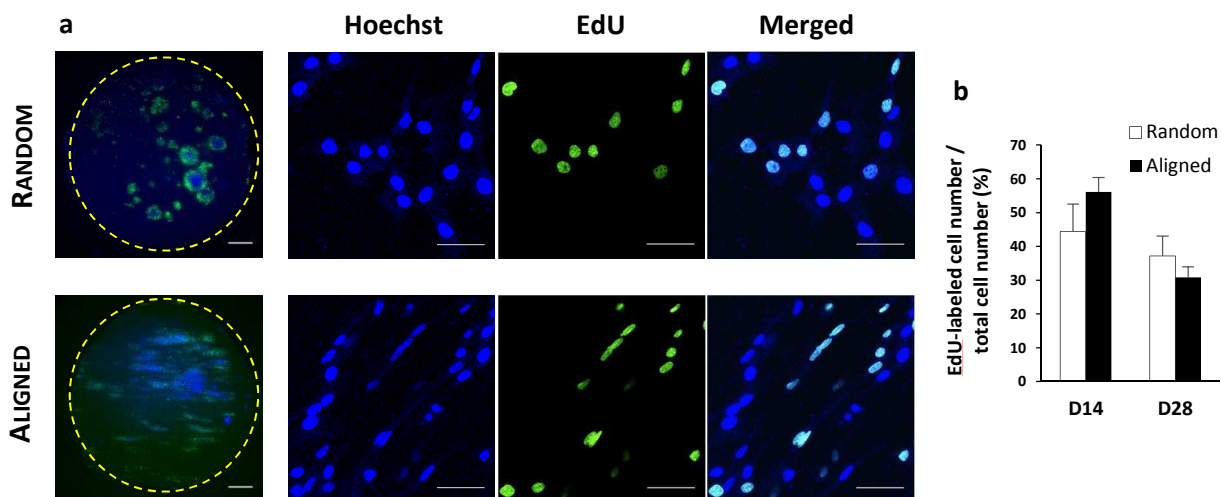


Figure 3. AF cell proliferation on electrospun PCL scaffolds. (a) At days 14 and 28, AF cells were incubated 24 hours with Click-IT[®] EdU solution. Cells nuclei were stained and random and aligned mats surface (15 mm diameter, yellow dashed circles) were observed by fluorescent microscopy (scale bar 2 mm). Positive cells were identified with both Hoechst nucleus stain (blue) and fluorescent EdU (green) (scale bar 50 μ m). (b) Percentage of positive EdU-labeled cells on both scaffolds at day 14 and 28. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($N = 6$, $n = 3$).

3.2.2. Cell morphology, phenotype and orientation

Cell morphology on random and aligned scaffold was investigated by SEM and fluorescent microscopy to analyze the influence of scaffold architecture (Fig.4a and 4b). AF cells showed a widely spread morphology on both types of scaffolds, with noticeable differences. On random scaffold, cells were spread in all directions in an irregular manner, while on aligned scaffold, cells were elongated with a spindle-shaped morphology, typical of fibroblastic cells, and seemed oriented along the direction of the underlying fibers. The orientation of colonizing cells on both patterns was assessed by measuring the direction of their actin filaments, while the reflection mode of the confocal microscope allowed visualization of the non-labelled PCL fibers. In the random group, similarly to the underlying PCL fibers, the angular distribution of F-actin presented no preferential fiber orientation (Fig 4c). In the aligned group, for convenience, the major axis of PCL fibers was chosen as a reference and attributed to a 0° angle. Similarly to the angular distribution measured on SEM images (Fig. 1g), the reflection mode showed that 87 ± 3 % of PCL fibers were oriented along the major axis $\pm 20^\circ$, while phalloidin staining showed that 77 ± 2 % of F-actin followed the same direction in colonizing cells. This strongly suggests that there is a close correlation between the angular distribution of the actin filaments and the underlying PCL fibers.

Aggrecan and type I collagen expression, typically synthesized by AF cells, were investigated by immunostaining. On both types of scaffolds, cell cytoplasm was positively stained for aggrecan and type I collagen after 14 and 28 days of culture (supplementary Fig. S1). Moreover,

fibrillar structures stained by anti-col I antibody were observed (Fig. 4a). Some stained fibers were found in areas devoid of F-actin, which strongly suggests that these fibers were extracellular (supplementary Fig. S1). While on random scaffolds, the angular distribution of these extracellular fibers showed no preferential fiber orientation (Fig. 4c), $66 \pm 5 \%$ of the positively stained extracellular fibers were oriented along the major axis of the underlying aligned scaffold $\pm 20^\circ$.

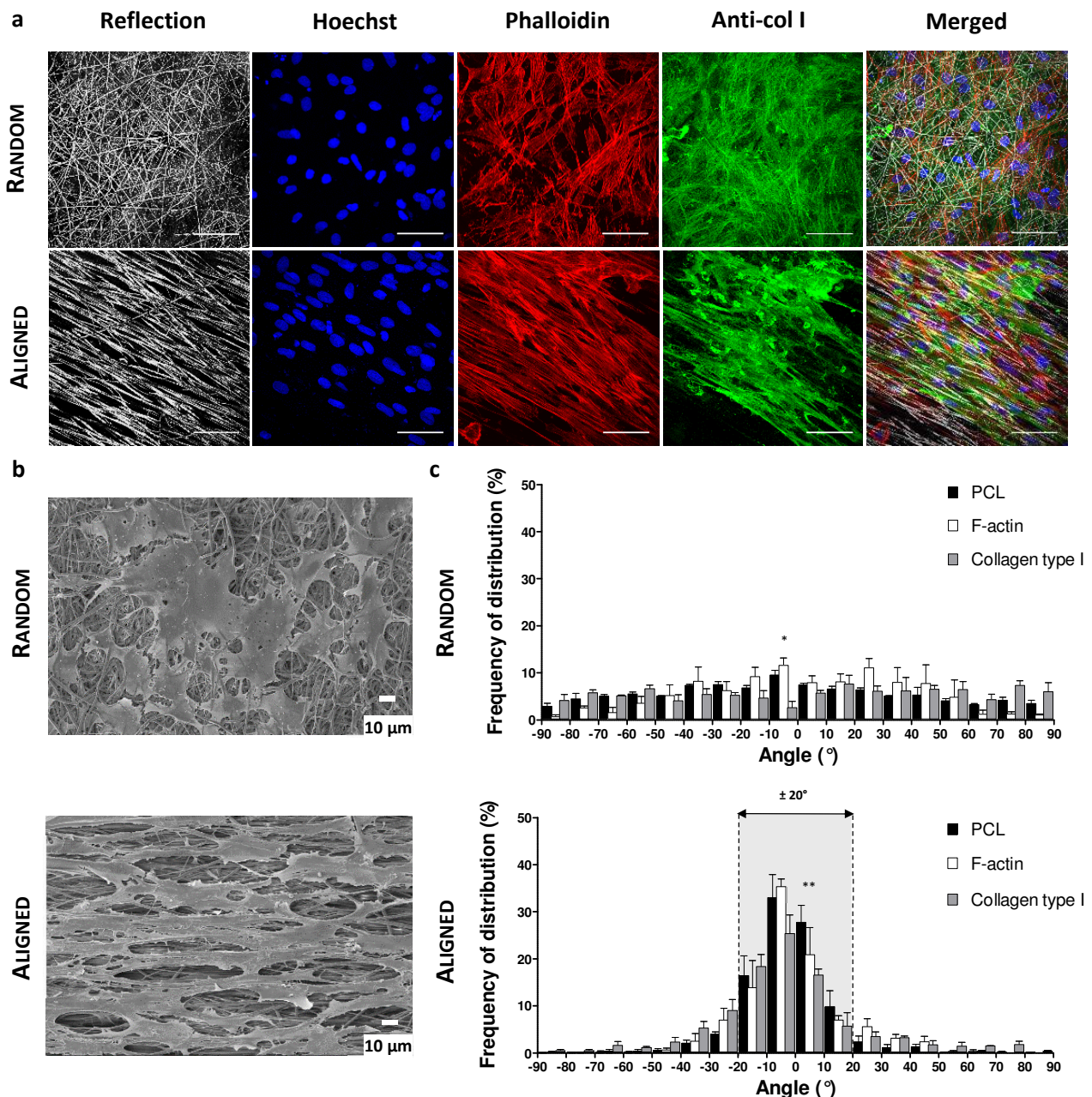


Figure 4. Sheep AF cell morphology, phenotype and orientation on electrospun PCL scaffolds. (a) Random and aligned mats were processed and stained for visualization of PCL fibers (gray), nuclei (blue), F-actin (red) and type-I collagen (green) using confocal microscopy (day 28, scale bar 50 μm). (b) Random and aligned scaffolds were processed and analyzed by SEM (scale bar 10 μm). (c) Angular distributions of PCL fibers, F-actin and type I collagen fibers at day 28 on random and aligned scaffolds. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($N = 3$, $n = 1$) (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, statistical difference between PCL and collagen type I, no difference between PCL and F-actin).

3.3. *In vivo* implantation

To assess the ability of our multi-layer PCL scaffold to promote AF regeneration, an *in vivo* study was conducted in 2 sheep for 4 weeks. In lumbar discs, a defect was successfully created in the outer AF followed by implantation of random or aligned multi-layer scaffolds with external PTFE patches to secure them (Fig. 5a).

3.3.1. *X-ray and MRI imaging*

Animals showed no surgery-related complications. X-rays and MRI imaging pre-operative, post-operative and at 1 month were used to monitor lumbar discs height and NP hydration. Quantitative analysis showed preservation of disc height at 4 weeks in both implanted groups as well as in control groups (empty defect and uninjured disc) (data not shown). NP hydration was assessed using T2-weight signal intensity measurements and showed no statistical difference between groups (data not shown). Moreover, 4 weeks after implantation, external PTFE patches were identified on MRI imaging and showed no displacement when compared to post-operative imaging.

3.3.2. *Histological and immuno-histochemical analyses*

Histological staining of decalcified cryosectioned IVDs with HES and TM demonstrated retention of NP, with regular and intact inner AF lamellae (Fig. 5b). The localization of the defect was confirmed to be in the outer AF. The empty defect showed irregular fibrous reparative tissue with numerous vascular ingrowths at 4 weeks. This tissue was highly cellularized with fibroblast-like cells displaying elongated nuclei. This collagen rich tissue was disorganized with no preferential orientation of the neo-synthesized collagen fibers. In both repaired group (random and aligned group), the multi-layer PCL scaffolds were well positioned within the outer AF defects without dislocation after 4 weeks of implantation. Only one randomly organized scaffold showed a delamination of superficial PCL layer. Both implants were well integrated into the surrounding AF, with continuous collagen fibers at the implant margins. No pronounced foreign body reaction was observed. Homogeneous cell infiltration throughout the implants was observed and cells presented elongated nuclei, suggesting a colonization by fibroblast-like cells. A regular fibrous tissue was observed inside the implants, between PCL layers and within each PCL layer, with scarce vascular ingrowth.

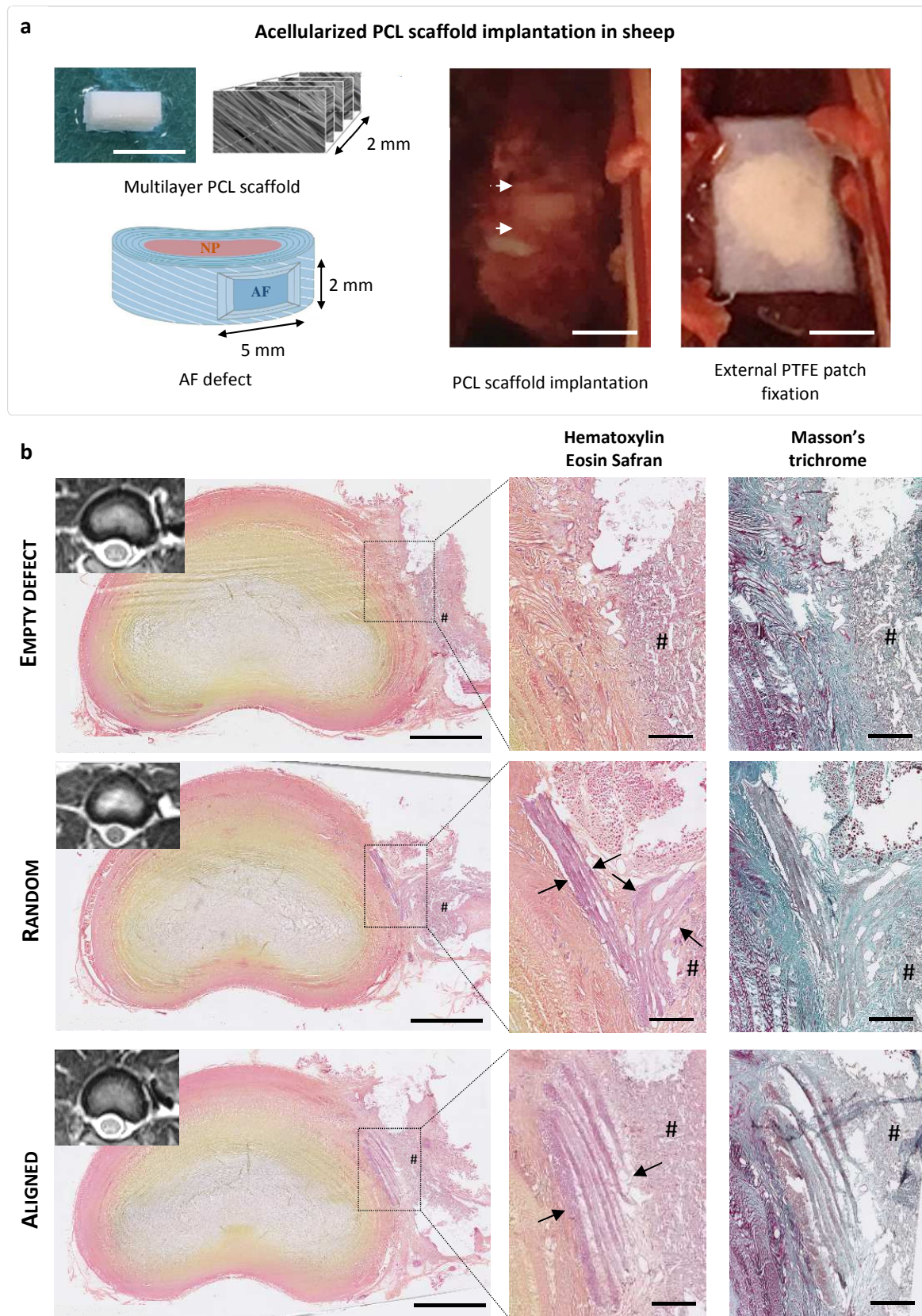


Figure 5. In vivo study in an ovine model. (a) Experimental procedure. Using a left retroperitoneal approach, a scalpel-induced box defect (2 x 5 mm and 2 mm depth) was created in the outer annulus of lumbar discs (between white arrow), and multi-layer PCL implants (random or aligned) were implanted and secured in the defect by gluing an external polytetrafluoroethylene (PTFE) patch to the adjacent vertebral bodies (scale bar 5 mm). (b) MRI imaging were performed 4 weeks after surgery and intervertebral disc were explanted, cryo-sectionned and histo-chemically stained with hematoxylin/eaosin/safran (HES) and Masson's Trichrome (MT) (scale bar 5 mm for full disc sections, 1 mm for high magnification sections, PTFE patch identified by #).

Masson's trichrome and immuno-histochemical staining of type I collagen showed positively stained fibrous tissue within both random and aligned scaffolds, with noticeable differences (Fig. 6a). Collagen fiber bundles within the aligned scaffolds appeared denser and more oriented compared to the ones within the random scaffolds. In addition, observation of picrosirius red staining under crossed polarizer showed a strong birefringent intensity in the aligned scaffolds. The birefringence confirmed the alignment of collagen fibers, which was not observed within the random scaffolds. Moreover, collagen fibers within adjacent layers of PCL aligned along two opposing directions (Fig. 6a, white arrows), which closely replicate the cross-ply structure of native AF tissue. Consistent with immuno-histochemical staining, second harmonic generation microscopy showed an alignment of collagen fibers within a single aligned PCL layer compared to a more disorganized and scarcer collagen network within the random group. Quantitative analysis of collagen orientation within a single PCL layer was realized on SHG images of both scaffold and was compared to native sheep AF tissue (Fig. 6b). For convenience, the major axis of collagen fibers was systematically chosen as a reference and attributed to a 90° angle. In native AF tissue, 92 ± 6 % of collagen fibers were oriented along the major axis $\pm 20^\circ$, while 87 ± 4 % and only 50 ± 3 % of collagen fibers followed the same direction within a single layer of aligned and random scaffold, respectively.

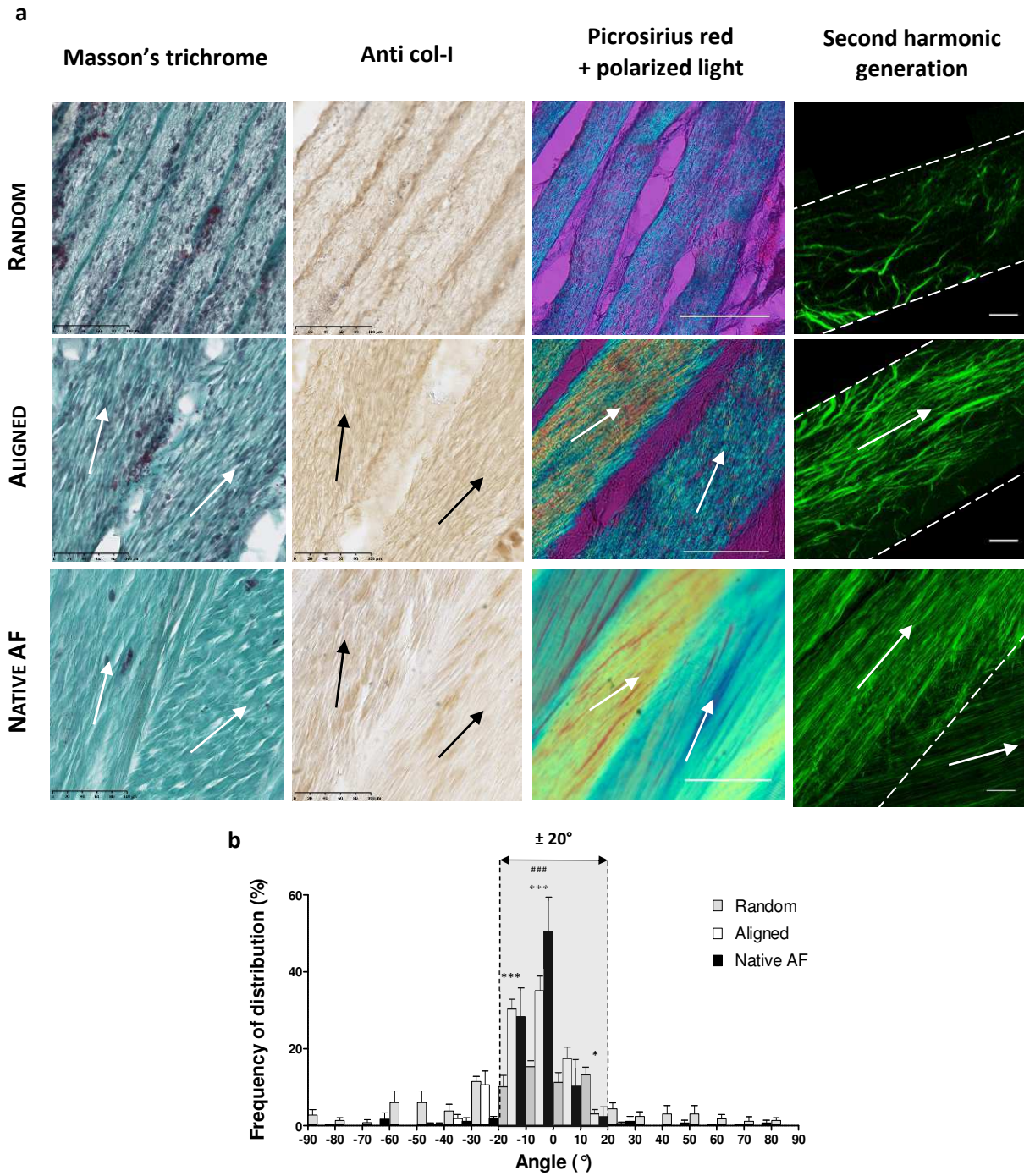


Figure 6. Identification of neo-collagen synthesis after 4 weeks of implantation. (a) Immuno-histological staining with Masson's trichrome and anti-type I collagen of random and aligned implanted scaffold (scale bar 100 μ m). The observation of picrosirius red staining in association with a polarized microscope allow visualization of collagen orientation (dashed arrow, scale bar 100 μ m). Second harmonic generation microscopy allow visualization of collagen deposition within a single membrane (dashed line) (scale bar 20 μ m). (b) Angular distributions of collagen fibers within a single membrane of random and aligned scaffolds. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($N = 1$, $n = 3$) (### $p < 0,001$, statistical difference between native AF and aligned scaffold, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ statistical difference between native AF and random scaffold).

4. Discussion

The IVD has a pivotal role in the spine kinematic. It provides stability during motion such as compression, distraction, sliding/twisting and bending. The IVD function results from a cooperative action of the NP and AF to appropriately respond to a wide range of load by contributing to the distribution and transmission of loads between the vertebral bodies. Any disruption in one of the IVD regions will have a tremendous effect on the overall function of the IVD, hence on the spine stability.

AF damages are known to induce IVD degeneration and are one of the most extensively used model for induction of IVD degeneration in animal models, including mice, rats, rabbits, dogs, pigs, and sheep⁶². These datas showed that structural alteration of the AF is likely to induce the leakage of NP outside the IVD and activates a cascade of cell-mediated response, leading to IVD degeneration^{24, 26, 31, 63–65}. The AF lesions persist in time when left unrepaired and might promote herniation of the NP tissue towards the spinal canal as well as a neural and vascular ingrowth within the defect^{3–7, 19}.

Effective AF closure and repair would present significant clinical benefits including the lessening of IVD degeneration, the prevention of IVD recurrent herniation associated with radicular pain and the prevention of neural and vascular ingrowth associated with discogenic pain. For these reasons, in the last decade, strategies for IVD regeneration have increasingly focused on AF closure and repair. In this context, the objective of this study was to design an electrospun PCL biomaterial that closely mimics the singular structure of the native AF tissue and to test its ability to appropriately repair AF defect in an ovine model.

The AF is arranged in concentric lamellae composed of aligned collagen fibers, which allow NP confinement by resisting tensile stretching⁶⁶. We hypothesized that an effective AF repair material should approximate the native tissue properties to withstand IVD mechanical environment and guide the neo-formation of an AF-like tissue. The use of electrospinning technology in association with a collector wheel allowed the production of aligned and randomly-organized fibrous scaffolds with similar micro-sized PCL fibers and porosity. The random scaffold was chosen as a control group, to monitor the *in vitro* and *in vivo* effect of micro-patterning orientation on AF cells. The aligned scaffold demonstrated tensile mechanical properties similar to that of a single AF lamellae Young's Modulus (ranging from 31 to 65 MPa)⁶⁷. To our knowledge, only two other studies have reported the development of material with similar tensile modulus, produced by electrospinning, alone or in association with 3D printing^{42, 68}. Thus, the use of electrospinning appears as an appropriate strategy to design a

scaffold with architecture and mechanical properties matching the native AF tissue which could sustain the complex IVD mechanical loads and provide stability at implantation.

In the current study, an AF explant culture onto electrospun scaffold was used to assess the feasibility of developing an acellular electrospun scaffold for AF repair. To our knowledge, it is the first time that an explant culture model is used to mimic *in vitro* the ability of AF cells present in the surrounding tissue to migrate, colonize and proliferate on an implant. We demonstrated that cells were able to colonize and proliferate on both scaffold surfaces, with increasing colonized surface over time. No difference was seen between random and aligned scaffolds. This seems to indicate that once in contact with PCL electrospun scaffold, cells present in AF tissue can spontaneously populate and proliferate onto the scaffold regardless of its architecture. Cell proliferation showed a tendency to decrease between day 14 and 28, which could be explained by the increased covered scaffold surface.

We next determined that scaffold architecture strongly influenced cell morphology and allow maintenance of the cellular phenotype. As specific phenotypic markers of AF cells are limited, we analyzed the production of fibroblastic proteins type I collagen and aggrecan core protein. Both were synthesized by cells on random and aligned scaffolds. Quantitative analysis showed a close match between PCL fibers orientation and cell cytoskeleton and subsequent extracellular type I collagen deposition. The cell morphology and extracellular matrix (ECM) deposition pattern are in accordance with previous findings where micro-patterned scaffolds were shown to exhibit contact guidance to induce cell and ECM alignment^{19, 55, 69–73}. These results highlight the importance of mimicking the native AF architecture to first induce alignment of cells then promote the deposition of an anisotropic ECM.

Random and aligned scaffolds were stacked into multi-layer scaffolds, to replicate the multi-lamellar structure of AF tissue. We then embarked on an ovine study to investigate if the multi-layer fibrous scaffolds could be tolerated by sheep and induce an anisotropic repair tissue formation without eliciting an inflammatory response. Sheep have been extensively used as an experimental model to investigate both IVD diseases and treatment strategies^{32, 38, 40, 62, 74}. Indeed, sheep IVDs have numerous similarities with human IVD including anatomy, size, cell population and interestingly, biomechanical properties which make this animal an ideal model to approximate human IVD pathophysiology⁷⁵. In our study, a box-shaped defect was induced in the outer AF and after 4 weeks of implantation all repaired groups (random and aligned groups) had no scaffold dislocation, as indicated by histological staining. While one of the major challenge of AF repair is the dislocation of implant^{76, 77}, here, scaffolds were successfully retained by using external PTFE patches, glued to the adjacent vertebrae. However, it was

noticeable that in one of the random group half of the PCL superficial layer seemed to be delaminated (Fig. 5b). MRI observation showed that the external patch was displaced in its ventral part. This was confirmed with histological staining where muscle tissue was seen adjacent to the implant instead of the PTFE patch. It seems that, upon implantation, the external patch was not properly fixed to the vertebral body, and its dislocation induced a delamination of the multi-layer scaffold underneath. This indicates the importance of a combined strategy to secure an AF repair implant within the defect.

This *in vivo* study demonstrated a successful biological integration of our implant with the host surrounding AF tissue with no granuloma formation around the implants. Numerous cells were seen within each PCL layer of random and aligned scaffold, suggesting that the implant porosities were sufficient to induce cell infiltration and tissue ingrowth throughout each layer's thickness. A newly formed collagen fibrous tissue was clearly observed within each implant, as evidenced by collagen type I staining. Observation of picrosirius red staining under polarized light and second harmonic generation allowed identification and quantification of regular and oriented collagen fibers within the aligned scaffold. Moreover, all histological analyses seemed to show thick and numerous collagen fibers within the aligned scaffold, while fewer collagen fibers were deposited within the random scaffold *in vivo*. A dense fibrous repair tissue was also found in the empty group, indicating a spontaneous healing of the superficial defect. However, histological observation shows a highly disorganized tissue due to the absence of a guiding implant. This is in accordance with previous studies in sheep and rabbits reporting superficial healing of AF defect with deposition of a disorganized collagen tissue with mechanical properties that cannot withstand physical loads during the lifetime^{6,78-80}. The present *in vivo* study confirms the results obtained *in vitro* and demonstrates, once again, the importance of a contact guidance of the scaffold architecture for the deposition of a highly organized repair tissue. Moreover, these results are in accordance with data recently reported in an *in vivo* porcine AF defect model using a PCL nano- and micro-sized multi-layer fibrous scaffold. Similar to our study, this complex implant induced the deposition of aligned and well integrated collagen fibers on the fibrous layers and a reduction of the degenerative process after 12 weeks of recovery⁵⁹. Despite the use of different *in vivo* models, both studies demonstrated the potential of PCL mimicking fibrous scaffolds for AF repair.

Further investigations should be made to compare the mechanical properties of this newly formed fibrous tissue with native AF tissue and to evaluate its long-term efficiency in maintaining IVD structural and mechanical integrity. Finally, implantation of the multi-layer

aligned scaffold in a herniated IVD model will be required to assess whether the scaffold can promote full thickness AF repair, prevent NP herniation and limit disc degeneration.

5. Conclusion

In this study we successfully developed a cell-free PCL fibrous scaffold with morphological and mechanical properties, mimicking the native AF lamellae, which was able to promote spontaneous *in vitro* cell colonization, proliferation and organization. An ovine model demonstrated that the aligned multi-layer scaffold provided an essential inductive microenvironment to produce collagen fibrous tissue mimicking the outer AF region. This implant could potentially act as a 3D scaffold that induce the production of an AF-like tissue and could prevent IVD recurrent herniation, neural and vascular ingrowth, and might slow down the IVD degeneration process.

6. Acknowledgments

This study was supported by Grants from INSERM and the Région des Pays de la Loire (#2014-04516/04518) and the MERLION Program #6.01.14. The authors are grateful to Y. Andres and E. Chevrel for their assistance with porosity analysis, D. Moulin for his help with SHG analyses. The authors gratefully acknowledge the assistance that they received from L. Terreaux and the personnel of the CRIP (O. Gauthier, G. Vaillant, P. Roy, D. Rouleau, C. Raphael, S. Madec, I. Leborgne, and G. Touzot-Jourde) and the MicroPICell platform (P. Hulin, S. Nedellec, P. Paul-Gilloteaux and M. Feyeux). The authors gratefully acknowledge Sophie Domingues for editing the manuscript. S.-Y. Chew would like to acknowledge partial funding from the MOE AcRF Tier 1 grant (RG148/14).

7. Bibliography

1. Hoy, D., March, L., Brooks, P., Blyth, F., Woolf, A., Bain, C., Williams, G., Smith, E., Vos, T., Barendregt, J., Murray, C., Burstein, R. & Buchbinder, R. The global burden of low back pain: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* **73**, 968–974 (2014).
2. Dowdell, J., Erwin, M., Choma, T., Vaccaro, A., Iatridis, J. & Cho, S. K. Intervertebral Disk Degeneration and Repair. *Neurosurgery* **80**, S46–S54 (2017).
3. Adams, M. A. & Hutton, W. C. The mechanics of prolapsed intervertebral disc. *Int Orthop* **6**, 249–253 (1982).
4. Adams, M. A., Freeman, B. J., Morrison, H. P., Nelson, I. W. & Dolan, P. Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration. *Spine* **25**, 1625–1636 (2000).
5. Yu, C. Y., Tsai, K. H., Hu, W. P., Lin, R. M., Song, H. W. & Chang, G. L. Geometric and morphological changes of the intervertebral disc under fatigue testing. *Clin Biomech* **18**, 3–9 (2003).
6. Iatridis, J. C., MacLean, J. J. & Ryan, D. A. Mechanical damage to the intervertebral disc annulus fibrosus subjected to tensile loading. *J Biomech* **38**, 557–565 (2005).

7. Callaghan, J. P. & McGill, S. M. Intervertebral disc herniation: Studies on a porcine model exposed to highly repetitive flexion/extension motion with compressive force. *Clin Biomech* **16**, 28–37 (2001).
8. Choi, Y.-S. Pathophysiology of degenerative disc disease. *Asian Spine J* **3**, 39–44 (2009).
9. Ramani, P. Section 2: Basic knowledge in lumbar disc herniation. in *Textbook of Surgical Management of Lumbar Disc Herniation* (ed. JP Medical Ltd) 11–50 (2013).
10. Chiang, C.-J., Cheng, C.-K., Sun, J.-S., Liao, C.-J., Wang, Y.-H. & Tsuang, Y.-H. The effect of a new anular repair after discectomy in intervertebral disc degeneration: an experimental study using a porcine spine model. *Spine* **36**, 761–769 (2011).
11. McGirt, M. J., Garcés Ambrossi, G. L., Dato, G., Sciubba, D. M., Witham, T. F., Wolinsky, J. P., Gokaslan, Z. L. & Bydon, A. Recurrent disc herniation and long-term back pain after primary lumbar discectomy: review of outcomes reported for limited versus aggressive disc removal. *Neurosurgery* **64**, 338–344 (2009).
12. Carragee, E. J., Spinnickie, A. O., Alamin, T. F. & Paragioudakis, S. A prospective controlled study of limited versus subtotal posterior discectomy: short-term outcomes in patients with herniated lumbar intervertebral discs and large posterior anular defect. *Spine* **31**, 653–657 (2006).
13. Mariconda, M., Galasso, O. & Milano, C. Frequency and clinical meaning of long-term degenerative changes after lumbar discectomy visualized on imaging tests. *Eur Spine J* **19**, 136–143 (2010).
14. Schroeder, J. E., Dettori, J. R., Brodt, E. D. & Kaplan, L. Disc degeneration after disc herniation : are we accelerating the process ? *Evid Based Spine Care J* **3**, 33–40 (2012).
15. Carragee, E. J., Don, A. S., Hurwitz, E. L., Cuellar, J. M., Carrino, J. A. & Herzog, R. ISSLS Prize Winner: Does Discography Cause Accelerated Progression of Degeneration Changes in the Lumbar Disc A Ten-Year Matched Cohort Study. *Spine* **34**, 2338–2345 (2009).
16. Yorimitsu, E., Chiba, K., Toyama, Y. & Hirabayashi, K. Long-term outcomes of standard discectomy for lumbar disc herniation: a follow-up study of more than 10 years. *Spine* **26**, 652–657 (2001).
17. Lebow, R. L., Adogwa, O., Parker, S. L., Sharma, A., Cheng, J. & McGirt, M. J. Asymptomatic same-site recurrent disc herniation after lumbar discectomy results of a prospective longitudinal study with 2-year serial imaging. *Spine* **36**, 2147–2151 (2011).
18. Key, J. A. & Ford, L. T. Experimental intervertebral-disc lesions. *J Bone Joint Surg Am* **30A**, 621–630 (1948).
19. Guterl, C. C., See, E. Y., Blanquer, S. B. G., Pandit, A., Ferguson, S. J., Benneker, L. M., Grijpma, D. W., Sakai, D., Eglin, D., Alini, M., Iatridis, J. C. & Grad, S. Challenges and strategies in the repair of ruptured Annulus fibrosus. *Eur Cell Mater* **25**, 1–21 (2013).
20. Vadalà, G., Sowa, G., Hubert, M., Gilbertson, L. G., Denaro, V. & Kang, J. D. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: Cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med* **6**, 348–355 (2012).
21. Ahlgren, B. D., Lui, W., Herkowitz, H. N., Panjabi, M. M. & Guiboux, J. P. Effect of anular repair on the healing strength of the intervertebral disc: a sheep model. *Spine* **25**, 2165–2170 (2000).
22. Bateman, A. H., Balkovec, C., Akens, M. K., Chan, A. H. W., Harrison, R. D., Oakden, W., Yee, A. J. M. & McGill, S. M. Closure of the Annulus fibrosus of the intervertebral disc using a novel suture application device – in vivo porcine and ex-vivo biomechanical evaluation. *Spine J* **16**, 889–895 (2016).
23. Chiang, Y. F., Chiang, C. J., Yang, C. H., Zhong, Z. C., Chen, C. S., Cheng, C. K. & Tsuang, Y.

- H. Retaining intradiscal pressure after annulotomy by different annular suture techniques, and their biomechanical evaluations. *Clin Biomech* **27**, 241–248 (2012).
24. Yang, C. H., Chiang, Y. F., Chen, C. H., Wu, L. C., Liao, C. J. & Chiang, C. J. The effect of annular repair on the failure strength of the porcine lumbar disc after needle puncture and punch injury. *Eur Spine J* **25**, 906–912 (2016).
 25. Bailey, A., Araghi, A., Blumenthal, S. & Huffmon, G. V. Prospective, multicenter, randomized, controlled study of anular repair in lumbar discectomy: two-year follow-up. *Spine* **38**, 1161–9 (2013).
 26. Masuda, K., Aota, Y., Muehleman, C., Imai, Y., Okuma, M., Thonar, E. J., Andersson, G. B. & An, H. S. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine* **30**, 5–14 (2005).
 27. Elliott, D. M., Yerramalli, C. S., Beckstein, J. C., Boxberger, J. I., Johannessen, W. & Vresilovic, E. J. The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine* **33**, 588–596 (2008).
 28. Likhitpanichkul, M., Dreischarf, M., Illien-Junger, S., Walter, B. a., Nukaga, T., Long, R. G., Sakai, D., Hecht, a. C. & Iatridis, J. C. Fibrin-genipin adhesive hydrogel for annulus fibrosus repair: Performance evaluation with large animal organ culture, in situ biomechanics, and in vivo degradation tests. *Eur Cells Mater* **28**, 25–38 (2014).
 29. Long, R. G., Bürki, A., Zysset, P., Eglin, D., Grijpma, D. W., Blanquer, S. B. G., Hecht, A. C. & Iatridis, J. C. Mechanical restoration and failure analyses of a hydrogel and scaffold composite strategy for annulus fibrosus repair. *Acta Biomater* **30**, 116–125 (2016).
 30. Frauchiger, D. A., May, R. D., Bakirci, E., Tekari, A., Chan, S. C. W., Wöltje, M., Benneker, L. M. & Gantenbein, B. Genipin-enhanced fibrin hydrogel and novel silk for intervertebral disc repair in a loaded bovine organ culture model. *J Funct Biomater* **9**, (2018).
 31. Grunert, P., Borde, B. H., Towne, S. B., Moriguchi, Y., Hudson, K. D., Bonassar, L. J. & Härtl, R. Riboflavin crosslinked high-density collagen gel for the repair of annular defects in intervertebral discs: An in vivo study. *Acta Biomater* **26**, 215–224 (2015).
 32. Pennicooke, B., Hussain, I., Berlin, C., Sloan, S. R., Borde, B., Moriguchi, Y., Lang, G., Navarro-Ramirez, R., Cheetham, J., Bonassar, L. J. & Härtl, R. Annulus fibrosus repair using high-density collagen gel. *Spine* **43**, 208–215 (2018).
 33. Vergroesen, P.-P. a, Bochyn Ska, A. I., Emanuel, K. S., Sharifi, S., Kingma, I., Grijpma, D. W. & Smit, T. H. A biodegradable glue for annulus closure: evaluation of strength and endurance. *Spine* **40**, 622–8 (2015).
 34. Heuer, F., Ulrich, S., Claes, L. & Wilke, H.-J. Biomechanical evaluation of conventional anulus fibrosus closure methods required for nucleus replacement. *J Neurosurg Spine* **9**, 307–313 (2008).
 35. Parker, S. L., Grahovac, G., Vukas, D., Vilendecic, M., Ledic, D., McGirt, M. J. & Carragee, E. J. Effect of an Annular closure device (Barricaid) on same-level recurrent disk herniation and disk height loss after primary lumbar discectomy: two-year results of a multicenter prospective cohort study. *Clin Spine Surg* **29**, 454–460 (2016).
 36. Choy, W. J., Phan, K., Diwan, A. D., Ong, C. S. & Mobbs, R. J. Annular closure device for disc herniation : meta-analysis of clinical outcome and complications. *BMC Musculoskelet Disord* **19**, 1–9 (2018).
 37. Barth, M., Weiß, C., Bouma, G. J., Bostelmann, R., Kursumovic, A., Fandino, J. & Thomé, C. Endplate changes after lumbar discectomy with and without implantation of an annular closure device. *Acta Neurochir (Wien)* **160**, 855–862 (2018).

38. Ledet, E. H., Jeshuran, W., Glennon, J. C., Shaffrey, C., De Deyne, P., Belden, C., Kallakury, B. & Carl, A. L. Small intestinal submucosa for annular defect closure: long-term response in an in vivo sheep model. *Spine* **34**, 1457–1463 (2009).
39. Xin, L., Zhang, C., Zhong, F., Fan, S., Wang, W. & Wang, Z. Minimal invasive annulotomy for induction of disc degeneration and implantation of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) plugs for annular repair in a rabbit model. *Eur J Med Res* **21**, 7 (2016).
40. Hegewald, A. A., Medved, F., Feng, D., Tsagogiorgas, C., Beierfuß, A., Schindler, G. A. K., Trunk, M., Kaps, C., Mern, D. S. & Thomé, C. Enhancing tissue repair in Annulus fibrosus defects of the intervertebral disc: analysis of a bio-integrative annulus implant in an in-vivo ovine model. *J Tissue Eng Regen Med* **9**, 405–414 (2015).
41. Koepsell, L., Remund, T., Bao, J., Neufeld, D., Fong, H. & Deng, Y. Tissue engineering of Annulus fibrosus using electrospun fibrous scaffolds with aligned polycaprolactone fibers. *J Biomed Mater Res Part A* **99A**, 564–575 (2011).
42. Wismer, N., Grad, S., Fortunato, G., Ferguson, S. J., Alini, M. & Eglin, D. Biodegradable electrospun scaffolds for Annulus fibrosus tissue engineering: effect of scaffold structure and composition on Annulus fibrosus cells in vitro. *Tissue Eng Part A* **20**, 672–682 (2014).
43. Johnson, W., Wootton, A. & Haj, A. El. Topographical guidance of intervertebral disc cell growth in vitro: towards the development of tissue repair strategies for the anulus fibrosus. *Eur Spine J* **15**, S389–S396 (2006).
44. Johnson, E. F., Chetty, K., Moore, I. M., Stewart, a & Jones, W. The distribution and arrangement of elastic fibres in the intervertebral disc of the adult human. *J Anat* **135**, 301–9 (1982).
45. Humzah, M. D. & Soames, R. W. Human intervertebral disc: structure and function. *Structure* **356**, 337–356 (1988).
46. Bruehlmann, S. B., Rattner, J. B., Matyas, J. R. & Duncan, N. A. Regional variations in the cellular matrix of the Annulus fibrosus of the intervertebral disc. *J Anat* **201**, 159–171 (2002).
47. Errington, R. J., Puustjarvi, K., White, I. R., Roberts, S. & Urban, J. P. Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc. *J Anat* **192**, 369–378 (1998).
48. Koepsell, L., Zhang, L., Neufeld, D., Fong, H. & Deng, Y. Electrospun nanofibrous polycaprolactone scaffolds for tissue engineering of Annulus fibrosus. *Macromol Biosci* **11**, 391–399 (2011).
49. Nerurkar, N. L., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering. *J Biomech* **43**, 1017–1030 (2010).
50. Chu, G., Shi, C., Wang, H., Zhang, W., Yang, H. & Li, B. Strategies for Annulus fibrosus regeneration: from biological therapies to tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol* **6**, 1–13 (2018).
51. Woodruff, M. A. & Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci* **35**, 1217–1256 (2010).
52. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D. S., Sahoo, S., Ang, L. T., Goh, J. C., Toh, S. L., Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T. R., Dalton, P. D. & Hutmacher, D. W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *J Mater Chem* **93**, 1539–1550 (2011).
53. Nerurkar, N. L., Sen, S., Huang, A. H., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Engineered disc-like angle-ply structures for intervertebral disc replacement. *Spine* **35**, 867–73 (2010).
54. Nerurkar, N. L., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Mechanics of oriented electrospun nanofibrous scaffolds for Annulus fibrosus tissue engineering. *Anticancer Res* **11**, 1609–1612 (2007).

55. Nerurkar, N. L., Baker, B. M., Sen, S., Wible, E. E., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Nanofibrous biologic laminates replicate the form and function of the annulus fibrosus. *Nat Mater* **8**, 986–92 (2009).
56. Martin, J. T., Milby, A. H., Chiaro, J. A., Kim, D. H., Hebela, N. M., Smith, L. J., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Translation of an engineered nanofibrous disc-like angle-ply structure for intervertebral disc replacement in a small animal model. *Acta Biomater* **10**, 2473–2481 (2014).
57. Fotticchia, A., Liu, Y., Demirci, E. & Lenardi, C. Electrospun polycaprolactone nano-fibers support growth of human mesenchymal stem cells. in *13th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO 2013)* 158–161 (2013).
58. Driscoll, T. P., Nakasone, R. H., Szczesny, S. E., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Biaxial mechanics and inter-lamellar shearing of stem-cell seeded electrospun angle-ply laminates for annulus fibrosus tissue engineering. *J Orthop Res* **31**, 864–870 (2013).
59. Kang, R., Li, H., Xi, Z., Ringgard, S., Baatrup, A., Rickers, K., Sun, M., Le, D. Q. S., Wang, M., Xie, L., Xie, Y., Chen, M. & Bünger, C. Surgical repair of annulus defect with biomimetic multilamellar nano/microfibrous scaffold in a porcine model. *J Tissue Eng Regen Med* **12**, 164–174 (2018).
60. Fusellier, M., Colombier, P., Lesoeur, J., Youl, S., Madec, S., Gauthier, O., Hamel, O., Guicheux, J. & Clouet, J. Longitudinal comparison of enzyme- and laser-treated intervertebral disc by MRI, X-ray, and histological analyses reveals discrepancies in the progression of disc degeneration: A rabbit study. *Biomed Res Int* **2016**, (2016).
61. Le Fournier, L., Fusellier, M., Halgand, B., Lesoeur, J., Gauthier, O., Menei, P., Montero-Menei, C., Guicheux, J. & Clouet, J. The transpedicular surgical approach for the development of intervertebral disc targeting regenerative strategies in an ovine model. *Eur Spine J* **26**, 2072–2083 (2017).
62. Fusellier, M., Clouet, J., Gauthier, O., Le Visage, C. & Guicheux, J. Animal models and imaging of intervertebral disc degeneration. in *Gene and Cell Delivery for Intervertebral Disc Degeneration* (ed. CRC Press) (2017).
63. Martin, J. T., Gorth, D. J., Beattie, E. E., Harfe, B. D., Smith, L. J. & Elliott, D. M. Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res* **31**, 1276–1282 (2013).
64. Liang, H., Ma, S. Y., Feng, G., Shen, F. H. & Joshua Li, X. Therapeutic effects of adenovirus-mediated growth and differentiation factor-5 in a mice disc degeneration model induced by annulus needle puncture. *Spine J* **10**, 32–41 (2010).
65. Keorochana, G., Johnson, J. S., Taghavi, C. E., Liao, J. C., Lee, K. B., Yoo, J. H., Ngo, S. S. & Wang, J. C. The effect of needle size inducing degeneration in the rat caudal disc: Evaluation using radiograph, magnetic resonance imaging, histology, and immunohistochemistry. *Spine J* **10**, 1014–1023 (2010).
66. Hudson, K. D., Alimi, M., Grunert, P., Härtl, R. & Bonassar, L. J. Recent advances in biological therapies for disc degeneration: tissue engineering of the annulus fibrosus, nucleus pulposus and whole intervertebral discs. *Curr Opin Biotechnol* **24**, 872–879 (2013).
67. Long, R., Torre, O., Hom, W., Assael, D. & Iatridis, J. Design requirements for annulus fibrosus repair: review of forces, displacements and material properties of the intervertebral disc and a summary of candidate hydrogels for repair. *J Biomech Eng* **138**, 1–14 (2016).
68. Yeganegi, M., Kandel, R. A. & Santerre, J. P. Characterization of a biodegradable electrospun polyurethane nanofiber scaffold: Mechanical properties and cytotoxicity. *Acta Biomater* **6**, 3847–3855 (2010).
69. Kang, R., Svend Le, D. Q., Li, H., Lysdahl, H., Chen, M., Besenbacher, F. & Bünger, C. Engineered three-dimensional nanofibrous multi-lamellar structure for annulus fibrosus repair. *J*

Mater Chem B **1**, 5462–5468 (2013).

70. Bhattacharjee, M., Miot, S., Gorecka, A., Singha, K., Loparic, M., Dickinson, S., Das, A., Bhavesh, N. S., Ray, A. R., Martin, I. & Ghosh, S. Oriented lamellar silk fibrous scaffolds to drive cartilage matrix orientation: towards Annulus fibrosus tissue engineering. *Acta Biomater* **8**, 3313–3325 (2012).
71. Barnes, C. P., Sell, S. a., Boland, E. D., Simpson, D. G. & Bowlin, G. L. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1413–1433 (2007).
72. Liu, Y., Ji, Y., Ghosh, K., Clark, R. A. F., Huang, L. & Rafailovich, M. H. Effects of fiber orientation and diameter on the behavior of human dermal fibroblasts on electrospun PMMA scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part A* **90**, 1092–1106 (2009).
73. Baker, B. M. & Mauck, R. L. The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs. *Biomaterials* **28**, 1967–1977 (2007).
74. Nisolle, J.-F., Bihin, B., Kirschvink, N., Neveu, F., Clegg, P., Dugdale, A., Wang, X. & Vandeweerdt, J.-M. Prevalence of Age-Related Changes in Ovine Lumbar Intervertebral Discs during Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Comp Med* **66**, 300–7 (2016).
75. Wilke, H.-J., Kettler, A. A. & Claes, L. E. Are sheep spines a valid biomechanical model for Human spines. *Spine* **22**, 2365–2374 (1997).
76. Bron, J. L., Van Der Veen, A. J., Helder, M. N., Van Royen, B. J. & Smit, T. H. Biomechanical and in vivo evaluation of experimental closure devices of the Annulus fibrosus designed for a goat nucleus replacement model. *Eur Spine J* **19**, 1347–1355 (2010).
77. Moriguchi, Y., Navarro, R., Grunert, P., Mojica, J., Hudson, K., Khair, T., Alimi, M., Bonassar, L. & Hartl, R. Total disc replacement using tissue- engineered intervertebral discs in the canine cervical spine. **1**, 1–18 (2016).
78. Hampton, D., Laros, G., McCarron, R. & Franks, D. Healing potential of the Annulus fibrosus. *Spine* **14**, 398–401 (1989).
79. Osti, O. L., Vernon-Roberts, B. & Fraser, R. D. 1990 volvo award in experimental studies. Annulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model. *Spine* **15**, 762–767 (1990).
80. Fazzalari, N. L., Costi, J. J., Hearn, T. C., Fraser, R. D., Vernon-Roberts, B., Hutchinson, J., Manthey, B. a, Parkinson, I. H. & Sinclair, C. Mechanical and pathologic consequences of induced concentric anular tears in an ovine model. *Spine* **26**, 2575–2581 (2001).

PARTIE III – CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La principale cause de lombalgie chronique est la dégénérescence des DIV qui survient soit à la suite d'un traumatisme, soit au cours d'un vieillissement accéléré du DIV. Le disque intervertébral (DIV) est un composant fondamental de la colonne vertébrale jouant un rôle essentiel dans la mobilité du rachis. Sa fonction principale est le résultat d'une action coopérative entre le NP et l'AF lui permettant de former une structure capable d'absorber et de transmettre les charges le long de la colonne, tout en étant assez souple pour permettre les mouvements du tronc. Il a été démontré que les atteintes structurales de l'AF jouent un rôle majeur dans les douleurs lombaires et sont intimement liées à une dégénérescence discale. Un AF lésé est susceptible d'induire une fuite d'une partie du NP à l'extérieur du DIV, entraînant une perte de la hauteur discale, accompagnée d'une modification de la dynamique de l'articulation touchée. La compression d'une racine nerveuse qui résulte de cette hernie discale, ainsi que l'innervation de la lésion sont à l'origine de vives douleurs. La hernie discale va également activer une cascade de réponses à médiation cellulaire entraînant la dégénérescence du DIV.

Les traitements actuels de la lombalgie d'origine discale sont principalement focalisés sur le NP. Les chirurgies les plus courantes sont basées soit sur une discectomie partielle visant à réduire la compression des nerfs et à implanter des prothèses partielles de remplacement du NP (arthroplastie) soit sur une discectomie totale avec arthrodèse en cas de récurrence d'une hernie discale ou de dégénérescence discale avancée. Bien que ces procédures soient généralement efficaces, l'absence d'une technique ou d'une stratégie de fermeture adéquate de l'AF lors des discectomies partielles peut réduire le taux de réussite de ces thérapies à long terme, particulièrement chez les patients présentant des protrusions du NP importantes et une dégénérescence discale minime. De plus, ces options thérapeutiques cherchent à soulager les symptômes, alors que la cause de la dégénérescence discale sous-jacente demeure. Pour pallier ce manque, le développement de nouvelles thérapies basées sur la médecine régénératrice et

l'ingénierie tissulaire est envisagé. Ces thérapies visent à restaurer la fonction discale en ralentissant voir inversant le processus de dégénérescence tout en créant un nouveau tissu sain. Une fois encore, la régénération des NP seule est sujet à controverse car les effets bénéfiques à long terme peuvent être limités si le tissu n'est pas correctement contenu par un AF sain et résistant. A notre connaissance, un seul type d'implant pour l'AF est actuellement disponible sur le marché : Barricaid™. Il y a donc un réel besoin médical non couvert, à l'origine de l'émergence de nouvelles approches thérapeutiques d'ingénierie tissulaire qui s'orientent vers la réparation et la régénération de l'AF.

Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse qu'un matériau de réparation efficace pour l'AF devrait posséder des propriétés structurales se rapprochant de celles du tissu natif afin de résister à l'environnement mécanique multidirectionnel de l'AF et guider la néoformation d'un tissu hautement organisé similaire à l'AF. L'utilisation de la technologie d'électrospinning en association avec une roue collectrice a permis la production de deux types de membranes : non alignée et alignée, présentant des fibres de PCL de diamètre similaire et une porosité identique. Les fibres au sein des membranes alignées, d'un diamètre de $1.33 \pm 0.40 \mu\text{m}$ confèrent à la membrane des propriétés mécaniques de résistance à la tension (module de Young : 55 MPa) similaires à celles d'une lamelle d'AF (module de Young d'une lamelle d'AF humain compris entre 31 et 65 MPa). Ainsi l'utilisation de ce type de stratégie nous permet de concevoir un implant dont l'architecture et les propriétés mécaniques s'approchent de celles du tissu natif. Ce type d'implant pourrait supporter *in vivo* les charges mécaniques complexes subies par le DIV au cours des mouvements du tronc et donc assurer son maintien au sein du défaut ainsi que son intégrité.

Le modèle de culture d'explant développé dans notre étude a permis de démontrer que les cellules présentes initialement au sein d'un explant d'AF de brebis étaient capables de coloniser spontanément nos deux types de matériaux électrospinnés et de proliférer à leur surface. Ces

résultats obtenus *ex vivo* ont donc démontré que nos matériaux, après incubation sur la nuit dans du sérum de brebis, sont capables d'interagir avec les cellules présentes au sein d'un explant. Ceci nous a confortés dans l'idée qu'il est possible d'utiliser notre matériau non cellularisé, « coaté » au sérum, dans le cadre d'une réparation de l'AF. De plus, l'analyse quantitative de l'orientation du collagène de type I synthétisé par les cellules d'AF à la surface des membranes (immunohistochimie, SHG) a montré une relation étroite entre l'orientation des fibres du PCL sous-jacente, le cytosquelette des cellules et le dépôt extracellulaire de collagène de type I. Notre implant pourrait donc agir non seulement comme matériau de comblement d'un défaut tissulaire mais également interagir avec le tissu et les cellules localement afin de modifier et diriger le processus de réparation endogène.

Notre étude *in vivo* à court terme (1 mois) nous a permis de montrer un certain nombre de points :

- les implants ont été retenus avec succès au sein des défauts superficiels grâce à l'utilisation du patch externe de PTFE collé aux vertèbres adjacentes,
- les implants ont été intégrés au tissu d'AF environnant sans formation de granulome autour des implants, seuls quelques macrophages et cellules géantes étaient visibles au sein des patchs externes (Figure 29) indépendamment de la présence ou non d'un implant. Ceci suggère que le patch externe de PTFE (structure fibrillaire formant un feutre poreux) n'est pas totalement inerte et engendre une légère réaction inflammatoire,
- la porosité des implants permet l'infiltration de cellule dans l'intégralité de leur épaisseur,
- un tissu fibreux composé de collagène de type I a été déposé entre les membranes de PCL mais également à l'intérieur des membranes,

- les implants composés de membranes de PCL alignées induisent le dépôt d'un tissu de réparation plus dense et organisé que les implants contenant des membranes de PCL non alignées.

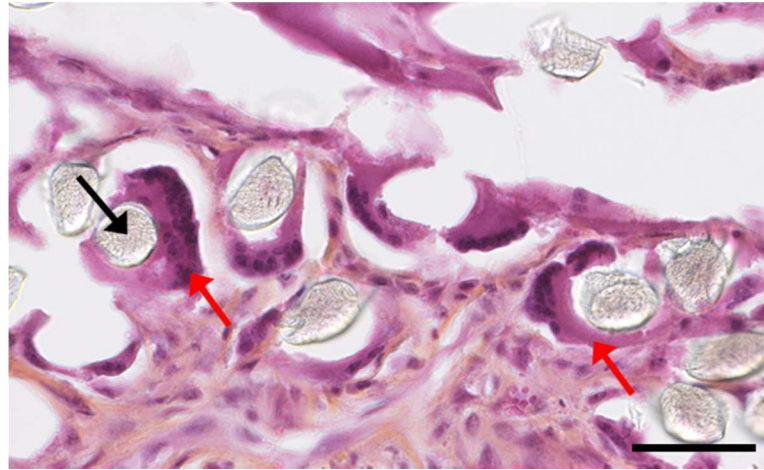


Figure 29. Coloration histologique (hématoxyline-eosine-safran) d'un patch externe de PTFE après 1 mois d'implantation chez la brebis. Des cellules géantes (flèches rouges) sont visibles autour des fibres composant le feutre de PTFE (flèche noire) (barre d'échelle : 50 μ m).

Cette étude *in vivo* réalisée à court terme (1 mois) démontre que notre implant multi-membranaire, composé de fibres de PCL alignées, fournit un environnement 3D induisant la production d'un tissu fibreux collagénique hautement organisé. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que, contrairement au tissu de réparation désorganisé mis en place en absence d'implant, le tissu fibreux organisé déposé au sein de nos membranes a des propriétés mécaniques plus adaptées pour résister à l'environnement mécanique de l'AF. Cet implant pourrait donc prévenir les hernies récurrentes et ralentir le processus de dégénérescence du DIV. Cependant, pour pouvoir vérifier cette hypothèse des études *in vivo* à plus long terme ainsi que des études des propriétés mécaniques du nouveau tissu synthétisé sont nécessaires. De plus, le tissu de réparation présent dans la condition contrôle non implantée semble présenter un plus grand nombre de vaisseaux sanguins, comparé aux conditions implantées avec nos biomatériaux. Ceci pourrait indiquer que la présence d'un implant limiterait la néo-vascularisation du défaut au sein de l'AF. Des marquages immunohistologiques sont cependant

nécessaires pour valider ces observations. Des marqueurs typiques des cellules endothéliales comme CD31 et von Willebrand factor (vWF) permettraient notamment de visualiser le contour des vaisseaux sanguins^{324,325}. Une quantification des vaisseaux sanguins permettrait alors de comparer la vascularisation dans les différentes conditions expérimentales. Par ailleurs, sachant qu'il a été montré que la néo-vascularisation de l'AF lors des hernies discales est généralement accompagnée d'une néo-innervation à l'origine de douleurs lombaires, nous pouvons nous demander si la présence de notre implant a également eu un effet « barrière » à l'infiltration de terminaisons nerveuses au sein de la lésion. Des marquages immunohistochimiques des Protein Gene Product 9,5 (PGP 9,5) et Growth-Associated Protein - 43 (GAP-43) peuvent alors être envisagées afin de visualiser et comparer la néo-innervation dans les différentes conditions d'expérimentation des études à long terme^{128,129,180}.

Ainsi, notre implant multi-membranaire constitué de fibre de PCL alignées pourrait potentiellement agir comme un matériau de comblement d'une lésion annulaire capable d'induire la néoformation d'un tissu de réparation proche de l'AF natif. L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse sont très encourageants quant au développement de nouvelles thérapies de régénération de l'AF qui pourrait présenter des avantages cliniques non négligeables, notamment la diminution de la dégénérescence discale, la prévention de la réapparition de hernies associées à des douleurs radiculaires et la prévention de la croissance neurale et vasculaire au sein de l'AF, associée à des douleurs discogéniques.

D'autre part, comme décrit précédemment, le biomatériau développé dans ce projet a pour but d'être implanté chez des patients dont la hernie discale, survenue au niveau d'un DIV « sain », engendre un risque d'une dégénérescence discale accélérée (voir paragraphe 2.1.1. première voie d'induction de la dégénérescence discale). Cependant, nous pouvons également envisager l'implantation de notre matériau chez des patients présentant une hernie discale au sein de DIV d'ores et déjà dégénéré, en l'associant avec les traitements de la dégénérescence discale

actuellement développés. En effet, nous pouvons faire l'hypothèse qu'en présence d'une lésion non réparée au sein de l'AF, l'efficacité des traitements d'ingénierie tissulaire, visant à rétablir la densité cellulaire et l'homéostasie matricielle du NP, peut être entravée. Dans cette optique, notre modèle de culture *ex vivo* a, de nouveau, été utilisé afin de déterminer si notre matériau non cellularisé était également capable d'interagir avec des cellules provenant de DIV dégénérés. Pour cela, des explants d'AF provenant de DIV de brebis dégénérés et de DIV humain dégénérés (obtenus lors d'une discectomie totale effectuée au CHU de Nantes par le Pr. P-M Longis), ont été cultivés en présence de membranes de PCL alignées et non alignées pendant 28 jours. Les résultats obtenus sur ces DIV dégénérés ovins et humains sont similaires à ceux obtenus avec les DIV de brebis sain décrits précédemment. En effet, une colonisation spontanée des membranes électrospinnées, une prolifération des cellules à la surface de ces matériaux et un alignement du collagène de type I synthétisé par les cellules avec les fibres de PCL sous-jacentes ont été observés (Figure 30).

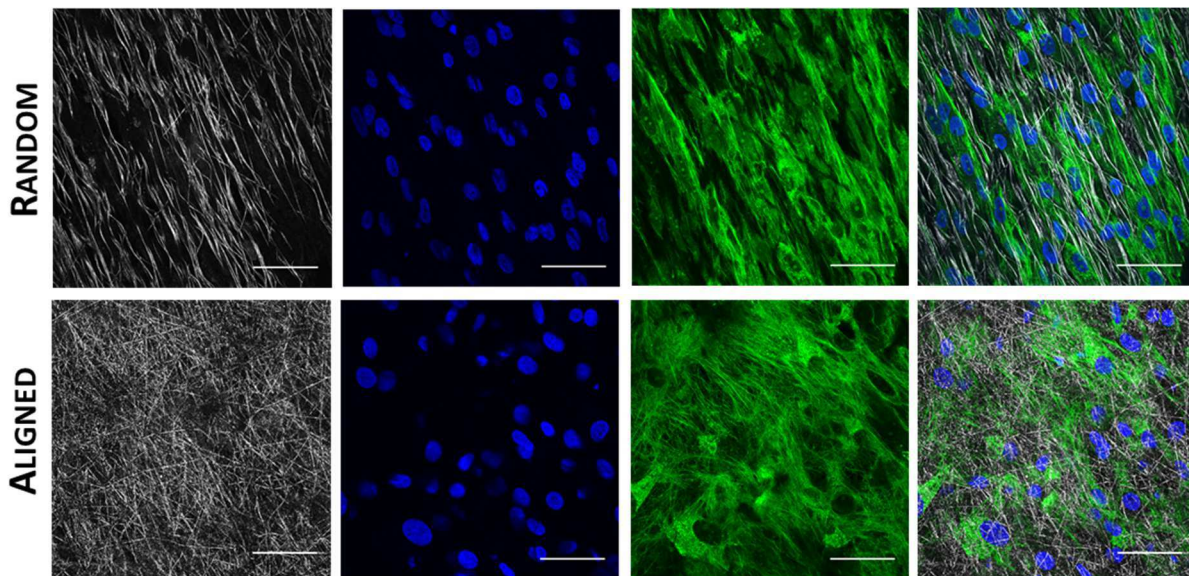


Figure 30. Observation de cellules d'AF humain à la surface des membranes de PCL au microscope confocal. Visualisation des fibres de PCL (gris), des noyaux (bleu) et du collagène de type I (vert) (barre d'échelle : 50 μm).

Ces résultats suggèrent, d'une part, que les cellules d'AF humain se comportent de manière similaire aux cellules ovines, confirmant la pertinence de l'utilisation du modèle ovin dans notre

étude, d'autre part, que la dégénérescence discale pourrait ne pas être un obstacle à l'utilisation de notre implant. Nous pouvons alors envisager de tester *in vivo* cette hypothèse en implantant notre dispositif dans un modèle animal de dégénérescence discale, induite par une lésion au sein de l'AF, en combinaison avec un traitement de la dégénérescence^{120, 178, 181,326,327}.

La poursuite de ce projet peut être envisagée selon différentes approches. La première et la plus évidente est la poursuite des études *in vivo* à plus long terme.

Ces études à plus long terme permettront de vérifier un certain nombre de points :

- La confirmation des résultats à des temps plus long : l'intégration de l'implant avec le tissu environnant, son maintien dans la zone lésée, l'augmentation de la quantité de tissu collagénique déposé au sein des membranes électrospinnées avec le temps,
- Les propriétés mécaniques du tissu de réparation lors de la dégradation du PCL. Des analyses mécaniques utilisant des tests de nanoindentation, d'analyses mécaniques dynamiques (DMA), de microscopie à force atomique (AFM) ou encore des test *ex vivo* effectués sur la zone d'intérêt ou sur l'unité fonctionnelle vertébrale entière, peuvent être envisagées^{103,328,329}. Ces données nous permettront de comparer les propriétés mécaniques du tissu de réparation déposé au contact de notre implant, d'une part, avec le tissu de réparation sans implant et d'autre part, avec le tissu natif.
- La validation de l'utilisation de PCL au sein de notre biomatériau. Le PCL se dégrade lentement et il est possible que la réparation complète du défaut soit ralentie par le faible taux de dégradation du PCL. En effet, les observations histologiques, ainsi que les observations au microscope à génération de second harmonique (SHG) réalisées sur les DIV de brebis après 1 mois d'implantation, ont montré que le tissu collagénique au sein des membranes de PCL semblait moins mature et dense que le collagène présent autour de l'implant ainsi que dans l'espace intermembranaire. Ceci peut suggérer un ralentissement

du processus de réparation au sein des membranes. Un matériau avec une dégradabilité plus rapide pourrait alors être nécessaire.

Dans cette optique, nous sommes actuellement en train de réaliser des études à des temps plus long (3 mois et 6 mois) afin de vérifier la continuité des résultats obtenus.

Par ailleurs, dans l'optique d'améliorer notre implant et sa confection, nous pouvons envisager l'utilisation d'appareil d'électrospinning plus sophistiqué. L'utilisation d'un collecteur composé d'un réseau d'électrodes sur un substrat isolant (quartz, polystyrène...) permettrait de diriger l'orientation des fibres et de créer un matériau constitué de plusieurs couches, chacune contenant des fibres présentant un alignement uniaxial particulier (Figure 31). Chaque paires d'électrodes peut alors être chargée séquentiellement (par exemple 1/3 puis 2/4) afin de produire un implant multicouche mimant l'organisation de l'AF³³⁰.

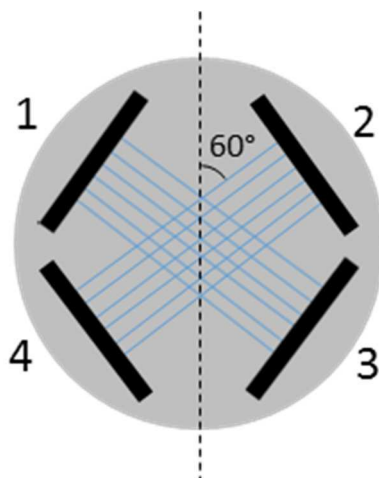


Figure 31. Collecteur composé de deux paires d'électrodes. L'application séquentielle de courant entre différentes paires d'électrode (par exemple 1/3 puis 2/4) permettrait la production d'un matériau multicouche composé de fibres alignées orientées différemment entre chaque couche (modifié d'après Liu et al. 2012³³⁰).

L'utilisation de cette technique nous permettrait d'éviter l'étape de superposition manuelle des membranes de PCL (étape longue et minutieuse) et donc limiterait certaines erreurs rencontrées dans ce projet lorsque deux membranes alignées dans la même direction ont été juxtaposées. De plus, cette technique pourrait également limiter les effets de délamination observés dans

l'un des matériaux implantés. Cependant, le « maillage » plus serré de ce type d'implant pourrait avoir un effet délétère sur l'infiltration des cellules et la diffusion des nutriments et facteurs biologiques dans toute l'épaisseur de l'implant.

Il est important de noter qu'il a également été observé que le tissu collagénique entre les membranes de PCL, qu'elles soient alignées ou non, semblait être lui-même orienté. Ceci pourrait suggérer un effet de la présence de membranes juxtaposées, probablement mécaniques, sur l'alignement de ce tissu interstitiel. Nous pourrions envisager le développement d'un implant composé de multicouches de PCL non électrospinnées, pour vérifier cette hypothèse.

Nous pouvons également envisager de changer la nature du patch externe utilisé lors de l'implantation. En effet, contrairement à notre implant, le PTFE n'est pas dégradable et ce matériau restera donc en périphérie du DIV traité. Or, une réaction inflammatoire de type macrophagique, bien que minime, a été observée au sein de ce patch de PTFE. La présence prolongée de ce type de matériau pourrait à long terme provoquer une réaction inflammatoire plus importante. Dans la mesure où le PCL ne semble pas avoir provoqué de réaction d'inflammation, il pourrait être proposé d'utiliser un patch externe composé de PCL, électrospinné ou non, pour maintenir notre implant au sein du défaut.

Enfin, nous pouvons envisager d'implanter notre biomatériau dans un modèle ovin de hernie discale dans lequel l'intégralité de l'AF est lésée. Ce modèle nous permettra alors de vérifier si notre implant ralentit la dégénérescence discale et limite les risques de réapparition de hernies discales. Nous pourrions notamment contrôler si la pression du NP induit la dislocation ou non de notre implant, ou encore si le contact avec le NP induit une inflammation au niveau de notre implant. La réparation de l'AF interne pourra également être évaluée dans ce modèle, ce qui nous permettra de déterminer si la composition de notre implant est idéale ou si celle-ci nécessite des modifications (ajout de facteurs biologiques, utilisation d'un polymère

naturelle...). Nous pourrions également envisager de comparer notre biomatériau avec le seul produit actuellement disponible sur le marché pour la réparation de l'AF : l'implant Barricaid™, afin de comparer leur potentielle prévention de réapparition de hernie et de dégénérescence discale.

Pour conclure, le développement d'une stratégie de réparation de l'AF pour traiter la lombalgie associée à des hernies discales n'est pas simple et il s'agit d'un domaine encore jeune. En effet, peu d'études *in vivo* sont actuellement publiées et de nombreuses questions restent encore sans réponses. Le biomatériau présenté dans cette thèse a permis d'apporter des éléments de réponses à certaines de ces questions et d'imaginer de nombreuses perspectives.

Conclusion personnelle

Cette thèse m'a beaucoup apporté d'un point de vue professionnel et personnel. Travailler sur un sujet novateur au sein du laboratoire a été un vrai challenge, notamment avec l'optimisation de l'appareil d'électrospinning, la mise en place de nouveaux tests mécaniques, *in vitro* et *in vivo*. Cela m'a particulièrement plu et motivée car l'ensemble des techniques utilisées a permis de construire un projet à l'interface entre la chimie, la physique et la biologie et à engendrer de nombreux échanges avec les experts de ces différentes disciplines. Je me sens particulièrement chanceuse d'avoir pu mener ce projet jusqu'aux implantations dans un nouveau modèle *in vivo*. Les échanges avec l'équipe de l'école vétérinaire et les différents chirurgiens du CHU m'ont permis de redéfinir le cahier des charges et ont donné une nouvelle dimension au projet. Ce projet constitue une première pierre d'un édifice qui, je l'espère, continuera à être construit au sein du laboratoire RMeS.

PARTIE IV – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hoy, D., March, L., Brooks, P., Blyth, F., Woolf, A., Bain, C., Williams, G., Smith, E., Vos, T., Barendregt, J., Murray, C., Burstein, R. & Buchbinder, R. The global burden of low back pain: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* **73**, 968–974 (2014).
2. Airaksinen, O., Brox, J., Cedraschi, C., Hildebrandt, J., Klaber-Moffett, J., Kovacs, F., Mannion, A. F., Reis, S., Staal, J. B., Ursin, H. & Zanolli, G. Chapter 4: European guidelines for the management of chronic nonspecific low back pain Contributors. *Eur Spine J* **15**, s192–s300 (2006).
3. Lombalgie commune (après avis de la HAS). *Assur Mal* (2017).
4. Lombalgie chronique de l'adulte et chirurgie - Méthode Recommandations pour la pratique clinique. *Haute autorité de santé* (2015).
5. Dowdell, J., Erwin, M., Choma, T., Vaccaro, A., Iatridis, J. & Cho, S. K. Intervertebral Disk Degeneration and Repair. *Neurosurgery* **80**, S46–S54 (2017).
6. Luoma, K., Riihimäki, H., Luukkonen, R., Raininko, R., Viikari-Juntura, E. & Lamminen, A. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine* **25**, 487–492 (2000).
7. Clouet, J., Vinatier, C., Merceron, C., Pot-Vaucel, M., Hamel, O., Weiss, P., Grimandi, G. & Guicheux, J. The intervertebral disc: From pathophysiology to tissue engineering. *Jt Bone Spine* **76**, 614–618 (2009).
8. Ali, A., Khan, S. A., Aurangzeb, A., Ahmed, E., Ali, G., Muhammad, G. & Mehmood, S. Lumbar disc herniation in patients with chronic backache. *J Ayub Med Coll Abbottabad* **25**, 68–70 (2013).
9. Takatalo, J., Karppinen, J., Niinimäki, J., Taimela, S., Mutanen, P., Sequeiros, R. B., Nayha, S., Jarvelin, M.-R., Kyllonen, E. & Tervonen, O. Association of modic changes, Schmorl's nodes, spondylolytic defects, high-intensity zone lesions, disc herniations, and radial tears with low back symptom severity among young Finnish adults. *Spine* **37**, 1231–1239 (2012).
10. Chiang, C.-J., Cheng, C.-K., Sun, J.-S., Liao, C.-J., Wang, Y.-H. & Tsuang, Y.-H. The effect of a new anular repair after discectomy in intervertebral disc degeneration: an

- experimental study using a porcine spine model. *Spine* **36**, 761–769 (2011).
11. Choi, Y.-S. Pathophysiology of degenerative disc disease. *Asian Spine J* **3**, 39–44 (2009).
 12. Ramani, P. Section 2: Basic knowledge in lumbar disc herniation. in *Textbook of Surgical Management of Lumbar Disc Herniation* (ed. JP Medical Ltd) 11–50 (2013).
 13. Inoue, G., Ohtori, S., Aoki, Y., Ozawa, T., Doya, H., Saito, T., Ito, T., Akazawa, T., Moriya, H. & Takahashi, K. Exposure of the nucleus pulposus to the outside of the anulus fibrosus induces nerve injury and regeneration of the afferent fibers innervating the lumbar intervertebral discs in rats. *Spine* **31**, 1433–1438 (2006).
 14. Stefanakis, M., Al-Abbasi, M., Harding, I., Pollintine, P., Dolan, P., Tarlton, J. & Adams, M. A. Annulus Fissures Are Mechanically and Chemically Conducive to the Ingrowth of Nerves and Blood Vessels. *Spine* **37**, 1883–1891 (2012).
 15. Key, J. A. & Ford, L. T. Experimental intervertebral-disc lesions. *J Bone Joint Surg Am* **30A**, 621–630 (1948).
 16. Mariconda, M., Galasso, O. & Milano, C. Frequency and clinical meaning of long-term degenerative changes after lumbar discectomy visualized on imaging tests. *Eur Spine J* **19**, 136–143 (2010).
 17. Schroeder, J. E., Dettori, J. R., Brodt, E. D. & Kaplan, L. Disc degeneration after disc herniation : are we accelerating the process ? *Evid Based Spine Care J* **3**, 33–40 (2012).
 18. Carragee, E. J., Don, A. S., Hurwitz, E. L., Cuellar, J. M., Carrino, J. A. & Herzog, R. ISSLS Prize Winner: Does Discography Cause Accelerated Progression of Degeneration Changes in the Lumbar Disc A Ten-Year Matched Cohort Study. *Spine* **34**, 2338–2345 (2009).
 19. Carragee, E. J., Spinnickie, A. O., Alamin, T. F. & Paragioudakis, S. A prospective controlled study of limited versus subtotal posterior discectomy: short-term outcomes in patients with herniated lumbar intervertebral discs and large posterior anular defect. *Spine* **31**, 653–657 (2006).
 20. Yorimitsu, E., Chiba, K., Toyama, Y. & Hirabayashi, K. Long-term outcomes of standard discectomy for lumbar disc herniation: a follow-up study of more than 10 years. *Spine* **26**, 652–657 (2001).

21. Lebow, R. L., Adogwa, O., Parker, S. L., Sharma, A., Cheng, J. & McGirt, M. J. Asymptomatic same-site recurrent disc herniation after lumbar discectomy results of a prospective longitudinal study with 2-year serial imaging. *Spine* **36**36, 2147–2151 (2011).
22. McGirt, M. J., Garcés Ambrossi, G. L., Dato, G., Sciubba, D. M., Witham, T. F., Wolinsky, J. P., Gokaslan, Z. L. & Bydon, A. Recurrent disc herniation and long-term back pain after primary lumbar discectomy: review of outcomes reported for limited versus aggressive disc removal. *Neurosurgery* **64**, 338–344 (2009).
23. Tortora, G. J. & Derrickson, B. Les principes du soutien et du mouvement. in *Principes d'anatomie et de physiologie* (ed. Boeck, D.) 1300 (2007).
24. Urban, J. P. G. & Roberts, S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther* **5**, 120–130 (2003).
25. Henry, N., Colombier, P., Lescaudron, L., Hamel, O., Le Bideau, J., Guicheux, J. & Clouet, J. Regenerative medicine of the intervertebral disc: from pathophysiology to clinical application. *Med Sci (Paris)* **30**, 1091–1100 (2014).
26. Yamanaka, Y., Tamplin, O. J., Beckers, A., Gossler, A. & Rossant, J. Live Imaging and Genetic Analysis of Mouse Notochord Formation Reveals Regional Morphogenetic Mechanisms. *Dev Cell* **13**, 884–896 (2007).
27. McCann, M. R. & Séguin, C. A. Notochord Cells in Intervertebral Disc Development and Degeneration. *J Dev Biol* **4**, 1–18 (2016).
28. Choi, K. S., Cohn, M. J. & Harfe, B. D. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: Implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev Dyn* **237**, 3953–3958 (2008).
29. Lawson, L. Y. & Harfe, B. D. Developmental mechanisms of intervertebral disc and vertebral column formation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **6**, (2017).
30. Sivakamasundari, V., Kraus, P., Sun, W., Hu, X., Lim, S. L., Prabhakar, S. & Lufkin, T. A developmental transcriptomic analysis of *Pax1* and *Pax9* in embryonic intervertebral disc development. *Biol Open* **6**, 187–199 (2017).
31. Peck, S. H., McKee, K. K., Tobias, J. W., Malhotra, N. R., Harfe, B. D. & Smith, L. J.

- Whole Transcriptome Analysis of Notochord-Derived Cells during Embryonic Formation of the Nucleus Pulposus. *Sci Rep* **7**, 1–14 (2017).
32. Moore, K. L. & Persaud, T. V. . Essentials of enbryology and birth defects. in *Study Guide and Review Manual of Human Embryology* (ed. Saunders) (Philadelphia, 1998).
 33. Chan, W. C. W., Au, T. Y. K., Tam, V., Cheah, K. S. E. & Chan, D. Coming together is a beginning: The making of an intervertebral disc. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* **102**, 83–100 (2014).
 34. Monsoro-Burq, A. H. Sclerotome development and morphogenesis: When experimental embryology meets genetics. *Int J Dev Biol* **49**, 301–308 (2005).
 35. Scaal, M. Early development of the vertebral column. *Semin Cell Dev Biol* **49**, 83–91 (2016).
 36. Sivakamasundari, V. & Lufkin, T. Bridging the Gap: Understanding Embryonic Interverterbal Disc Development. *Cell Dev Biol* **1**, 1–15 (2012).
 37. Gilbert, S. *Developmental Biology*. (Sinauer Associates, 2006).
 38. Mauch, T. J. & Schoenwolf, G. C. *Developmental Biology. Sixth Edition. By Scott F. Gilbert. American Journal of Medical Genetics* **99**, (2001).
 39. Shapiro, I. M. & Risbud, M. V. Introduction to the Structure, Function, and Comparative Anatomy of the Vertebrae and the Intervertebral Disc. in *The Intervertebral Disc: Molecular and Structural Studies of the Disc in Health and Disease* (ed. Springer science & business media) 3–15 (2013).
 40. Hayes, A. J., Benjamin, M. & Ralphs, J. R. Role of actin stress fibres in the development of the intervertebral disc: Cytoskeletal control of extracellular matrix assembly. *Dev Dyn* **215**, 179–189 (1999).
 41. Gauci, S. J., Stanton, H., Little, C. B. & Fosang, A. J. Proteoglycan and collagen degradation in osteoarthritis. in *Cartilage: Volume 2: Pathophysiology* 41–61 (2017). doi:10.1007/978-3-319-45803-8_3
 42. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J. & Yang, B. B. Structure and function of aggrecan. *Cell Research* **12**, 19–32 (2002).

43. Saad, L. & Spector, M. Effects of collagen type on the behavior of adult canine annulus fibrosus cells in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Biomed Mater Res* **71A**, 233–241 (2004).
44. Bogduk, N. The intervertebral joint and the intervertebral discs. in *Clinical Anatomy of the Lumbar Spine and Sacrum* (ed. Elsevier Health Sciences) 15–21 (2005).
45. Silva-Correia, J., Correia, S. I., Oliveira, J. M. & Reis, R. L. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotechnol Adv* **31**, 1514–1531 (2013).
46. Sharan, A. D., Tang, S. Y. & Vaccaro, A. R. Vascular anatomy of the endplates and nutriment supply of the disc. in *Basic Science of Spinal Diseases* (ed. JP Medical Ltd) 300 (2013).
47. Moore, R. J. The vertebral endplate: Disc degeneration, disc regeneration. *Eur Spine J* **15**, 333–337 (2006).
48. Brodin, H. Paths of nutrition in articular cartilage and intervertebral discs. *Acta Orthop Scand* **24**, 177–183 (1955).
49. Cassinelli, E. H. & Kang, J. D. Current understanding of lumbar disc degeneration. *Oper Tech Orthop* **10**, 254–262 (2000).
50. Tow, B. P. B., Hsu, W. K. & Wang, J. C. Disc regeneration: a glimpse of the future. *Clin Neurosurg* **54**, 122–8 (2007).
51. Roughley, P. J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine* **29**, 2691–2699 (2004).
52. Chelberg, M. K., Banks, G. M., Geiger, D. F. & Oegema, T. R. Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. *J Anat* **186** (Pt 1, 43–53 (1995).
53. Trout, J. J., Buckwalter, J. a & Moore, K. C. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus. *Anat Rec* **204**, 307–14 (1982).
54. Chen, J., Yan, W. & Setton, L. A. Molecular phenotypes of notochordal cells purified from nucleus pulposus via fluorescence-activated cell sorting. *Eur Cells Mater* **10**, 16

- (2005).
55. Sive, J. I., Baird, P., Jeziorsk, M., Watkins, A., Hoyland, J. A. & Freemont, A. J. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *J Clin Pathol - Mol Pathol* **55**, 91–97 (2002).
 56. Hunter, C. J., Matyas, J. R. & Duncan, N. A. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: A species comparison. *J Anat* **205**, 357–362 (2004).
 57. Colombier, P., Clouet, J., Hamel, O., Lescaudron, L. & Guicheux, J. The lumbar intervertebral disc: From embryonic development to degeneration. *Jt Bone Spine* **81**, 125–129 (2014).
 58. Colombier, P., Camus, A., Lescaudron, L., Clouet, J. & Guicheux, J. Intervertebral disc regeneration: A great challenge for tissue engineers. *Trends Biotechnol* **32**, 433–435 (2014).
 59. Humzah, M. D. & Soames, R. W. Human intervertebral disc: structure and function. *Structure* **356**, 337–356 (1988).
 60. Bruehlmann, S. B., Rattner, J. B., Matyas, J. R. & Duncan, N. A. Regional variations in the cellular matrix of the Annulus fibrosus of the intervertebral disc. *J Anat* **201**, 159–171 (2002).
 61. Inoue, H. & Takeda, T. Three-dimensional observation of collagen framework of lumbar intervertebral discs. *Acta Orthop Scand* **46**, 949–956 (1975).
 62. Marchand, F. & Ahmed, A. M. Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus. *Spine* **15**, 402–410 (1990).
 63. Yu, J., Fairbank, J. C. T., Roberts, S. & Urban, J. P. G. The elastic fiber network of the anulus fibrosus of the normal and scoliotic human intervertebral disc. *Spine* **30**, 1815–1820 (2005).
 64. Whatley, B. R. & Wen, X. Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration. *Mater Sci Eng C* **32**, 61–77 (2012).
 65. Clarke, I. C. Articular cartilage: a review and scanning electron microscope study. 1. The

- interterritorial fibrillar architecture. *J Bone Joint Surg Br* **53**, 732–750 (1971).
66. Postacchini, F. Anatomy and pathomorphology. in *Lumbar Disc Herniation* (ed. Springer Science & Business Media) 17–131 (2012).
67. Aulisa, L., Tamburrelli, F., Lupparelli, S., Tartarone, M. & Padua, R. Immunohistochemical investigation on type III and VI collagen organization in human intervertebral discs in the neonatal period. *Child's Nerv Syst* **14**, 104–108 (1998).
68. Cao, L., Guilak, F. & Setton, L. A. Three-dimensional morphology of the pericellular matrix of intervertebral disc cells in the rat. *J Anat* **211**, 444–452 (2007).
69. Roberts, S., Menage, J., Duance, V. & Wotton, S. F. Type III collagen in the intervertebral disc. *Histochem J* **23**, 503–8 (1991).
70. Wu, J. J., Eyre, D. R. & Slayter, H. S. Type VI collagen of the intervertebral disc. Biochemical and electron-microscopic characterization of the native protein. *Biochem J* **248**, 373–381 (1987).
71. Jin, L., Shimmer, A. L. & Li, X. The challenge and advancement of annulus fibrosus tissue engineering. *Eur Spine J* **22**, 1090–1100 (2013).
72. Sztrolovics, R., Grover, J., Cs-Szabo, G., Shi, S. L., Zhang, Y., Mort, J. S. & Roughley, P. J. The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J Orthop Res* **20**, 257–266 (2002).
73. Johnstone, B., Markopoulos, M., Neame, P. & Caterson, B. Identification and characterization of glycanated and non-glycanated forms of biglycan and decorin in the human intervertebral disc. *Biochem J* **292**, 661–6 (1993).
74. Roughley, P. J., White, R. J., Magny, M. C., Liu, J., Pearce, R. H. & Mort, J. S. Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. *Biochem J* **295**, 421–6 (1993).
75. Adams, P., Eyre, D. & Muir, H. Biochemical aspects of development and ageing of human lumbar intervertebral discs. *Rheumatol Rehabil* **16**, 22–29 (1977).
76. Adams, P. & Muir, H. Qualitative changes with age of proteoglycans of human lumbar discs. *Ann Rheum Dis* **35**, 289–96 (1976).

77. Singh, K., Masuda, K., Thonar, E. J.-M. A., An, H. S. & Cs-Szabo, G. Age-related changes in the extracellular matrix of nucleus pulposus and anulus fibrosus of human intervertebral disc. *Spine* **34**, 10–16 (2009).
78. Sztrolovics, R., Alini, M., Mort, J. S. & Roughley, P. J. Age-related changes in fibromodulin and lumican in human intervertebral discs. *Spine* **24**, 1765–71 (1999).
79. Yu, J., Tirlapur, U., Fairbank, J., Handford, P., Roberts, S., Winlove, P. C., Cui, Z. & Urban, J. Microfibrils, elastin fibres and collagen fibres in the human intervertebral disc and bovine tail disc. *J Anat* **210**, 460–471 (2007).
80. Smith, L. J. & Fazzalari, N. L. The elastic fibre network of the human lumbar anulus fibrosus: Architecture, mechanical function and potential role in the progression of intervertebral disc degeneration. *Eur Spine J* **18**, 439–448 (2009).
81. Johnson, E. F., Berryman, H., Mitchell, R. & Wood, W. B. Elastic fibres in the anulus fibrosus of the adult human lumbar intervertebral disc. A preliminary report. *J Anat* **143**, 57–63 (1985).
82. Maroudas, A., Stockwell, R. A., Nachemson, A. & Urban, J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J Anat* **120**, 113–130 (1975).
83. Errington, R. J., Puustjarvi, K., White, I. R., Roberts, S. & Urban, J. P. Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc. *J Anat* **192**, 369–378 (1998).
84. Shankar, H., Scarlett, J. A. & Abram, S. E. Anatomy and pathophysiology of intervertebral disc disease. *Tech Reg Anesth Pain Manag* **13**, 67–75 (2009).
85. Brown, M. F., Hukkanen, M. V., McCarthy, I. D., Redfern, D. R., Batten, J. J., Crock, H. V, Hughes, S. P. & Polak, J. M. Sensory and sympathetic innervation of the vertebral endplate in patients with degenerative disc disease. *J Bone Jt Surgery, Br Vol* **79**, 147–153 (1997).
86. Pope, J. E. & Mekhail, N. Intradiscal electrothermal therapy. in *Atlas of pain medicine procedures* 736 (McGraw-Hill Education, 2015).
87. Nachemson, A., Lewin, T., Maroudas, A. & Freeman, M. A. R. In Vitro Diffusion of

- DYE Through the End-Plates and the Annulus Fibrosus of Human Lumbar Inter-Vertebral Discs. *Acta Orthop Scand* **41**, 589–607 (1970).
88. Portron, S., Merceron, C., Gauthier, O., Lesoeur, J., Sourice, S., Masson, M., Fellah, B. H., Geffroy, O., Lallemand, E., Weiss, P., Guicheux, J. & Vinatier, C. Effects of In Vitro Low Oxygen Tension Preconditioning of Adipose Stromal Cells on Their In Vivo Chondrogenic Potential: Application in Cartilage Tissue Repair. *PLoS One* **8**, (2013).
 89. Urban, J. P., Holm, S., Maroudas, A. & Nachemson, A. Nutrition of the intervertebral disk. An in vivo study of solute transport. *Clin Orthop Relat Res* 101–114 (1977).
 90. Ishihara, H., McNally, D. S., Urban, J. P. & Hall, A. C. Effects of hydrostatic pressure on matrix in different regions of the intervertebral synthesis disk. *J Appl Physiol* **80**, 839–46 (1996).
 91. Bartels, E. M., Fairbank, J. C., Winlove, C. P. & Urban, J. P. Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain. *Spine* **23**, 1–7; discussion 8 (1998).
 92. Ferguson, S. J., Ito, K. & Nolte, L. P. Fluid flow and convective transport of solutes within the intervertebral disc. *J Biomech* **37**, 213–221 (2004).
 93. Urban, J. P., Holm, S., Maroudas, A. & Nachemson, A. Nutrition of the intervertebral disc: effect of fluid flow on solute transport. *Clin Orthop Relat Res* 296–302 (1982).
 94. McMillan, D. W., Garbutt, G. & Adams, M. A. Effect of sustained loading on the water content of intervertebral discs: implications for disc metabolism. *Ann Rheum Dis* **55**, 880–887 (1996).
 95. Huang, Y. C., Urban, J. P. G. & Luk, K. D. K. Intervertebral disc regeneration: Do nutrients lead the way? *Nat Rev Rheumatol* **10**, 561–566 (2014).
 96. Nerurkar, N. L., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering. *J Biomech* **43**, 1017–1030 (2010).
 97. Kurtz, S. M. & Edidin, A. A. Structure and properties of soft tissues in the spine. in *Spine Technology Handbook* (ed. Elsevier) 35–60 (2006).
 98. Ambard, D. & Cherblanc, F. Mechanical behavior of annulus fibrosus: A microstructural

- p model of fibers reorientation.
- Ann Biomed Eng*
- 37**
- , 2256–2265 (2009).
99. O’Connell, G. D., Sen, S. & Elliott, D. M. Human annulus fibrosus material properties from biaxial testing and constitutive modeling are altered with degeneration. *Biomech Model Mechanobiol* **11**, 493–503 (2012).
 100. Mikawa, Y., Hamagami, H., Shikata, J. & Yamamuro, T. Elastin in the human intervertebral disk. A histological and biochemical study comparing it with elastin in the human yellow ligament. *Arch Orthop Trauma Surg* **105**, 343–349 (1986).
 101. Long, R., Torre, O., Hom, W., Assael, D. & Iatridis, J. Design requirements for annulus fibrosus repair: review of forces, displacements and material properties of the intervertebral disc and a summary of candidate hydrogels for repair. *J Biomech Eng* **138**, 1–14 (2016).
 102. Mow, V. C. & Huiskes, R. Biomechanics of the spine. in *Basic Orthopaedic Biomechanics & Mechano-biology* (ed. & Wilkins, L. W.) 529–563 (2005).
 103. Newell, N., Little, J. P., Christou, A., Adams, M. A., Adam, C. J. & Masouros, S. D. Biomechanics of the human intervertebral disc: A review of testing techniques and results. *J Mech Behav Biomed Mater* **69**, 420–434 (2017).
 104. Valat, J. P., Rozenberg, S. & Bellaïche, L. Lombalgie. Critères cliniques et d’imagerie. *Rev du Rhum Monogr* **77**, 158–166 (2010).
 105. Adams, M. A. & Roughley, P. J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* **31**, 2151–2161 (2006).
 106. Ma, D., Liang, Y., Wang, D., Liu, Z., Zhang, W., Ma, T., Zhang, L., Lu, X. & Cai, Z. Trend of the incidence of lumbar disc herniation: Decreasing with aging in the elderly. *Clin Interv Aging* **8**, 1047–1050 (2013).
 107. Adams, M. A., Lama, P., Zehra, U. & Dolan, P. Why do some intervertebral discs degenerate, when others (in the same spine) do not? *Clin Anat* **28**, 195–204 (2015).
 108. Bergknut, N., Smolders, L. A., Grinwis, G. C. M., Hagman, R., Lagerstedt, A. S., Hazewinkel, H. A. W., Tryfonidou, M. A. & Meij, B. P. Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 1: Anatomy and physiology of the intervertebral disc and characteristics of intervertebral disc degeneration. *Vet J* **195**, 282–291 (2013).

109. Vergroesen, P. P. A., Kingma, I., Emanuel, K. S., Hoogendoorn, R. J. W., Welting, T. J., van Royen, B. J., van Dieën, J. H. & Smit, T. H. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: A vicious circle. *Osteoarthr Cartil* **23**, 1057–1070 (2015).
110. Bendtsen, M., Bunger, C., Colombier, P., Le Visage, C., Roberts, S., Sakai, D. & Urban, J. P. G. Biological challenges for regeneration of the degenerated disc using cellular therapies. *Acta Orthop* **87**, 39–46 (2016).
111. Roberts, S., Evans, H., Trivedi, J. & Menage, J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am* **88 Suppl 2**, 10–4 (2006).
112. Sowa, G., Vadalà, G., Studer, R., Kompel, J., Iucu, C., Georgescu, H., Gilbertson, L. & Kang, J. Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression. *Spine* **33**, 1821–1828 (2008).
113. Adams, M. A. & Hutton, W. C. The mechanics of prolapsed intervertebral disc. *Int Orthop* **6**, 249–253 (1982).
114. Adams, M. A., Freeman, B. J., Morrison, H. P., Nelson, I. W. & Dolan, P. Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration. *Spine* **25**, 1625–1636 (2000).
115. Yu, C. Y., Tsai, K. H., Hu, W. P., Lin, R. M., Song, H. W. & Chang, G. L. Geometric and morphological changes of the intervertebral disc under fatigue testing. *Clin Biomech* **18**, 3–9 (2003).
116. Iatridis, J. C., MacLean, J. J. & Ryan, D. A. Mechanical damage to the intervertebral disc annulus fibrosus subjected to tensile loading. *J Biomech* **38**, 557–565 (2005).
117. Callaghan, J. P. & McGill, S. M. Intervertebral disc herniation: Studies on a porcine model exposed to highly repetitive flexion/extension motion with compressive force. *Clin Biomech* **16**, 28–37 (2001).
118. Simunic, D. I., Broom, N. D. & Robertson, P. a. Biomechanical factors influencing nuclear disruption of the intervertebral disc. *Spine* **26**, 1223–1230 (2001).
119. Simunic, D. I., Robertson, P. A. & Broom, N. D. Mechanically induced disruption of the healthy bovine intervertebral disc. *Spine* **29**, 972–978 (2004).

120. Fusellier, M., Clouet, J., Gauthier, O., Le Visage, C. & Guicheux, J. Animal models and imaging of intervertebral disc degeneration. in *Gene and Cell Delivery for Intervertebral Disc Degeneration* (ed. CRC Press) (2017).
121. Martin, J. T., Gorth, D. J., Beattie, E. E., Harfe, B. D., Smith, L. J. & Elliott, D. M. Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res* **31**, 1276–1282 (2013).
122. Keorochana, G., Johnson, J. S., Taghavi, C. E., Liao, J. C., Lee, K. B., Yoo, J. H., Ngo, S. S. & Wang, J. C. The effect of needle size inducing degeneration in the rat caudal disc: Evaluation using radiograph, magnetic resonance imaging, histology, and immunohistochemistry. *Spine J* **10**, 1014–1023 (2010).
123. Masuda, K., Aota, Y., Muehleman, C., Imai, Y., Okuma, M., Thonar, E. J., Andersson, G. B. & An, H. S. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine* **30**, 5–14 (2005).
124. Yang, C. H., Chiang, Y. F., Chen, C. H., Wu, L. C., Liao, C. J. & Chiang, C. J. The effect of annular repair on the failure strength of the porcine lumbar disc after needle puncture and punch injury. *Eur Spine J* **25**, 906–912 (2016).
125. Gawri, R., Rosenzweig, D. H., Krock, E., Ouellet, J. A., Stone, L. S., Quinn, T. M. & Haglund, L. High mechanical strain of primary intervertebral disc cells promotes secretion of inflammatory factors associated with disc degeneration and pain. *Arthritis Res Ther* **16**, 1–14 (2014).
126. Moon, H. J., Kim, J. H., Lee, H. S., Chotai, S., Kang, J. D., Suh, J. K. & Park, Y. K. Annulus fibrosus cells interact with neuron-like cells to modulate production of growth factors and cytokines in symptomatic disc degeneration. *Spine* **37**, 2–9 (2012).
127. Moon, H. J., Yurube, T., Lozito, T. P., Pohl, P., Hartman, R. A., Sowa, G. A., Kang, J. D. & Vo, N. V. Effects of secreted factors in culture medium of annulus fibrosus cells on microvascular endothelial cells: Elucidating the possible pathomechanisms of matrix degradation and nerve in-growth in disc degeneration. *Osteoarthr Cartil* **22**, 344–354 (2014).
128. Freemont, A. J., Watkins, A., Le Maitre, C., Baird, P., Jeziorska, M., Knight, M. T.,

- Ross, E. R., O'Brien, J. P. & Hoyland, J. A. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J Pathol* **197**, 286–292 (2002).
129. Binch, A. L. A., Cole, A. A., Breakwell, L. M., Michael, A. L. R., Chiverton, N., Creemers, L. B., Cross, A. K. & Le Maitre, C. L. Nerves are more abundant than blood vessels in the degenerate human intervertebral disc. *Arthritis Res Ther* **17**, 1–10 (2015).
130. Siemionow, K., An, H., Masuda, K., Andersson, G. & Cs-Szabo, G. The effects of age, sex, ethnicity, and spinal level on the rate of intervertebral disc degeneration: a review of 1712 intervertebral discs. *Spine* **36**, 1333–9 (2011).
131. Manchikanti, L., Singh, V., Datta, S., Cohen, S. P. & Hirsch, J. A. Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain. *Pain Physician* **12**, E35–E70 (2009).
132. Liuke, M., Solovieva, S., Lamminen, A., Luoma, K., Leino-Arjas, P., Luukkonen, R. & Riihimäki, H. Disc degeneration of the lumbar spine in relation to overweight. *Int J Obes* **29**, 903–908 (2005).
133. Kalichman, L. & Hunter, D. J. The genetics of intervertebral disc degeneration. Associated genes. *Jt Bone Spine* **75**, 388–96 (2008).
134. Mayer, J. E., Iatridis, J. C., Chan, D., Qureshi, S. A., Gottesman, O. & Hecht, A. C. Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration. *Spine J* **13**, 299–317 (2013).
135. Livshits, G., Popham, M., Malkin, I., Sambrook, P. N., MacGregor, A. J., Spector, T. & Williams, F. M. K. Lumbar disc degeneration and genetic factors are the main risk factors for low back pain in women: The UK Twin Spine Study. *Ann Rheum Dis* **70**, 1740–1745 (2011).
136. Battié, M. C., Videman, T., Kaprio, J., Gibbons, L. E., Gill, K., Manninen, H., Saarela, J. & Peltonen, L. The Twin Spine Study: Contributions to a changing view of disc degeneration. *Spine Journal* **9**, 47–59 (2009).
137. Vo, N. V., Hartman, R. A., Yurube, T., Jacobs, L. J., Sowa, G. A. & Kang, J. D. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine Journal* **13**, 331–341 (2013).
138. Kepler, C. K., Ponnappan, R. K., Tannoury, C. A., Risbud, M. V. & Anderson, D. G.

- The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J* **13**, 318–330 (2013).
139. Risbud, M. V. & Shapiro, I. M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: Pain and disc content. *Nat Rev Rheumatology* **10**, 44–56 (2014).
140. Boden, S., Davis, D., Dina, T., Mark, A. & Wiesel, S. Abnormal magnetic-resonance scans of the cervical spine in asymptomatic subjects. *J Bone Jt Surg* **72**, 403–408 (1990).
141. Grant, M. P., Epure, L. M., Bokhari, R., Roughley, P., Antoniou, J. & Mwale, F. Human cartilaginous endplate degeneration is induced by calcium and the extracellular calcium-sensing receptor in the intervertebral disc. *Eur Cell Mater* **32**, 137–151 (2016).
142. Zhang, F., Zhao, X., Shen, H. & Zhang, C. Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration (Review). *Int J Mol Med* **37**, 1439–1448 (2016).
143. Chen, J.-W., Ni, B.-B., Li, B., Yang, Y.-H., Jiang, S.-D. & Jiang, L.-S. The Responses of Autophagy and Apoptosis to Oxidative Stress in Nucleus Pulposus Cells: Implications for Disc Degeneration. *Cell Physiol Biochem* **34**, 1175–1189 (2014).
144. Ding, F., Shao, Z. & Xiong, L. Cell death in intervertebral disc degeneration. *Apoptosis* **18**, 777–785 (2013).
145. He, Z., Pu, L., Yuan, C., Jia, M. & Wang, J. Nutrition deficiency promotes apoptosis of cartilage endplate stem cells in a caspase-independent manner partially through upregulating BNIP3. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **49**, 25–32 (2017).
146. Freemont, A. J. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology* **48**, 5–10 (2009).
147. Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine* **16**, 238–246 (2010).
148. Wang, F., Cai, F., Shi, R., Wang, X. H. & Wu, X. T. Aging and age related stresses: A senescence mechanism of intervertebral disc degeneration. *Osteoarthr Cartil* **24**, 398–408 (2016).
149. Rannou, F., Lee, T.-S., Zhou, R.-H., Chin, J., Lotz, J. C., Mayoux-Benhamou, M.-A., Barbet, J. P., Chevrot, A. & Shyy, J. Y.-J. Intervertebral disc degeneration: the role of

- the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. *Am J Pathol* **164**, 915–24 (2004).
150. Tomaszewski, K. A., Adamek, D., Konopka, T., Tomaszewska, R. & Walocha, J. A. Endplate calcification and cervical intervertebral disc degeneration: The role of endplate marrow contact channel occlusion. *Folia Morphol* **74**, 84–92 (2015).
 151. Jackson, A. R., Huang, C.-Y. & Gu, W. Y. Effect of endplate calcification and mechanical deformation on the distribution of glucose in intervertebral disc: a 3D finite element study. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* **14**, 195–204 (2011).
 152. Roberts, S., Urban, J. P., Evans, H. & Eisenstein, S. M. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. *Spine* **21**, 415–420 (1996).
 153. Wang, W. J., Yu, X. H., Wang, C., Yang, W., He, W. S., Zhang, S. J., Yan, Y. G. & Zhang, J. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin Chim Acta* **448**, 238–246 (2015).
 154. Zhang, Y., Chee, A., Shi, P., Adams, S. L., Markova, D. Z., Anderson, D. G., Smith, H. E., Deng, Y., Plastaras, C. T. & An, H. S. Intervertebral Disc Cells Produce Interleukins Found in Patients with Back Pain. *Am J Phys Med Rehabil* **95**, 407–415 (2016).
 155. Roberts, S., Caterson, B., Menage, J., Evans, E. H., Jaffray, D. C. & Eisenstein, S. M. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* **25**, 3005–3013 (2000).
 156. Rutges, J. P. H. J., Kummer, J. A., Oner, F. C., Verbout, A. J., Castelein, R. J. M., Roestenburg, H. J. A., Dhert, W. J. A. & Creemers, L. B. Increased MMP-2 activity during intervertebral disc degeneration is correlated to MMP-14 levels. *J Pathol* **214**, 523–530 (2008).
 157. Le Maitre, C. L., Hoyland, J. A. & Freemont, A. J. Interleukin-1 receptor antagonist delivered directly and by gene therapy inhibits matrix degradation in the intact degenerate human intervertebral disc: an in situ zymographic and gene therapy study. *Arthritis Res Ther* **9**, R83 (2007).
 158. Deng, B., Ren, J. Z., Meng, X. Q., Pang, C. G., Duan, G. Q., Zhang, J. X., Zou, H., Yang,

- H. Z. & Ji, J. J. Expression profiles of MMP-1 and TIMP-1 in lumbar intervertebral disc degeneration. *Genet Mol Res* **14**, 19080–19086 (2015).
159. Adams, M. A., Dolan, P. & McNally, D. S. The internal mechanical functioning of intervertebral discs and articular cartilage, and its relevance to matrix biology. *Matrix Biol* **28**, 384–389 (2009).
160. Han, W. M., Nerurkar, N. L., Smith, L. J., Jacobs, N. T., Mauck, R. L. & Elliott, D. M. Multi-scale structural and tensile mechanical response of annulus fibrosus to osmotic loading. *Ann Biomed Eng* **40**, 1610–1621 (2012).
161. Liang, T., Zhang, L.-L., Xia, W., Yang, H.-L. & Luo, Z.-P. Individual Collagen Fibril Thickening and Stiffening of Annulus Fibrosus in Degenerative Intervertebral Disc. *Spine* **42**, (2017).
162. ANAES. *Diagnostic, prise en charge et suivi des malades atteints de lombalgie chronique. Recommandations HAS* (2000).
163. Bohinski, R. Herniated lumbar disc. <https://mayfieldclinic.com/pe-hldisc.htm> (2018).
164. Modic, M. T., Steinberg, P. M., Ross, J. S., Masaryk, T. J. & Carter, J. R. Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging. *Radiology* **166**, 193–199 (1988).
165. Pfirrmann, C. W. A., Metzdorf, A., Zanetti, M., Hodler, J. & Boos, N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* **26**, 1873–1878 (2001).
166. Urrutia, J., Besa, P., Campos, M., Cikutovic, P., Cabezon, M., Molina, M. & Cruz, J. P. The Pfirrmann classification of lumbar intervertebral disc degeneration: an independent inter- and intra-observer agreement assessment. *Eur Spine J* **25**, 2728–2733 (2016).
167. Zhang, Y. H., Zhao, C. Q., Jiang, L. S., Chen, X. D. & Dai, L. Y. Modic changes: A systematic review of the literature. *Eur Spine J* **17**, 1289–1299 (2008).
168. Zhang, Y., Chee, A., Thonar, E. J.-M. A. & An, H. S. Intervertebral Disk Repair by Protein, Gene, or Cell Injection: A Framework for Rehabilitation-Focused Biologics in the Spine. *PM&R* **3**, S88–S94 (2011).

169. Rousseau, M.-A. A., Ulrich, J. A., Bass, E. C., Rodriguez, A. G., Liu, J. J. & Lotz, J. C. Stab incision for inducing intervertebral disc degeneration in the rat. *Spine* **32**, 17–24 (2007).
170. Issy, A. C., Castania, V., Castania, M., Salmon, C. E. G., Nogueira-Barbosa, M. H., Del Bel, E. & Defino, H. L. A. Experimental model of intervertebral disc degeneration by needle puncture in Wistar rats. *Brazilian J Med Biol Res* **46**, (2013).
171. Hsieh, A. H., Hwang, D., Ryan, D. A., Freeman, A. K. & Kim, H. Degenerative annular changes induced by puncture are associated with insufficiency of disc biomechanical function. *Spine* **34**, 998–1005 (2009).
172. Masuda, K., Oegema, T. R. & An, H. S. Growth factors and treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine* **29**, 2757–69 (2004).
173. Sobajima, S., Kompel, J. F., Kim, J. S., Wallach, C. J., Robertson, D. D., Vogt, M. T., Kang, J. D. & Gilbertson, L. G. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology. *Spine* **30**, 15–24 (2005).
174. Kim, D. W., Chun, H.-J. & Lee, S.-K. Percutaneous needle puncture technique to create a rabbit model of traumatic degenerative disc disease. *World Neurosurg* **84**, 1–8 (2015).
175. Chen, C., Jia, Z., Han, Z., Gu, T., Li, W., Li, H., Tang, Y., Wu, J., Wang, D., He, Q. & Ruan, D. Quantitative T2 relaxation time and magnetic transfer ratio predict endplate biochemical content of intervertebral disc degeneration in a canine model. *BMC Musculoskelet Disord* **16**, 157 (2015).
176. Kääpä, E., Holm, S., Han, X., Takala, T., Kovanen, V. & Vanharanta, H. Collagens in the injured porcine intervertebral disc. *J Orthop Res* **12**, 93–102 (1994).
177. Pfeiffer, M., Griss, P., Franke, P., Bornscheuer, C., Orth, J., Wilke, a & Clausen, J. D. Degeneration model of the porcine lumbar motion segment: effects of various intradiscal procedures. *Eur Spine J* **3**, 8–16 (1994).
178. Freeman, B. J. C., Kuliwaba, J. S., Jones, C. F., Shu, C. C., Colloca, C. J., Zarrinkalam, M. R., Mulaibrahimovic, A., Gronthos, S., Zannettino, A. C. W. & Howell, S. Allogeneic mesenchymal stem cells promote healing in postero-lateral annular lesions and improve

- indices of lumbar intervertebral disc degeneration in an ovine model. *Spine* **41**, 1 (2016).
179. Olsewski, J. M., Schendel, M. J., Wallace, L. J., Ogilvie, J. W. & Gundry, C. R. Magnetic resonance imaging and biological changes in injured intervertebral discs under normal and increased mechanical demands. *Spine* **21**, 1945–1951 (1996).
180. Melrose, J., Roberts, S., Smith, S., Menage, J. & Ghosh, P. Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine anular lesion model of experimental disc degeneration. *Spine* **27**, 1278–1285 (2002).
181. Schollum, M. L., Appleyard, R. C., Little, C. B. & Melrose, J. A detailed microscopic examination of alterations in normal anular structure induced by mechanical destabilization in an ovine model of disc degeneration. *Spine* **35**, 1965–1973 (2010).
182. Lipson, S. J. & Muir, H. Vertebral osteophyte formation in experimental disc degeneration. Morphologic and proteoglycan changes over time. *Arthritis Rheum* **23**, 319–24 (1980).
183. Lipson, S. J. & Muir, H. Experimental intervertebral disc degeneration: morphologic and proteoglycan changes over time. *Arthritis Rheum* **24**, 12–21 (1981).
184. Osti, O. L., Vernon-Roberts, B. & Fraser, R. D. 1990 volvo award in experimental studies. Annulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model. *Spine* **15**, 762–767 (1990).
185. Zhang, Y., Drapeau, S., An, H. S., Markova, D., Lenart, B. A. & Anderson, D. G. Histological features of the degenerating intervertebral disc in a goat disc-injury model. *Spine* **36**, 1519–1527 (2011).
186. Michalek, A. J., Funabashi, K. L. & Iatridis, J. C. Needle puncture injury of the rat intervertebral disc affects torsional and compressive biomechanics differently. *Eur Spine J* **19**, 2110–2116 (2010).
187. Kim, K. S., Yoon, S. T., Li, J., Park, J. S. & Hutton, W. C. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models. *Spine* **30**, 33–37 (2005).
188. Gugliotta, M., Da Costa, B. R., Dabis, E., Theiler, R., Jüni, P., Reichenbach, S., Landolt, H. & Hasler, P. Surgical versus conservative treatment for lumbar disc herniation: A

- prospective cohort study. *BMJ Open* **6**, 1–7 (2016).
189. Demirel, A., Yorubulut, M. & Ergun, N. Regression of lumbar disc herniation by physiotherapy. Does non-surgical spinal decompression therapy make a difference? Double-blind randomized controlled trial. *J Back Musculoskelet Rehabil* **30**, 1015–1022 (2017).
 190. Maher, C., Underwood, M. & Buchbinder, R. Non-specific low back pain. *The Lancet* **389**, 736–747 (2017).
 191. Andronis, L., Kinghorn, P., Qiao, S., Whitehurst, D. G. T., Durrell, S. & McLeod, H. Cost-Effectiveness of Non-Invasive and Non-Pharmacological Interventions for Low Back Pain: a Systematic Literature Review. *Appl Health Econ Health Policy* **15**, 173–201 (2017).
 192. Müller-Schwefe, G., Morlion, B., Ahlbeck, K., Alon, E., Coaccioli, S., Coluzzi, F., Huygen, F., Jaksch, W., Kalso, E., Kocot-Kępska, M., Kress, H. G., Mangas, A. C., Margarit Ferri, C., Mavrocordatos, P., Nicolaou, A., Hernández, C. P., Pergolizzi, J., Schäfer, M. & Sichère, P. Treatment for chronic low back pain: the focus should change to multimodal management that reflects the underlying pain mechanisms. *Curr Med Res Opin* **33**, 1199–1210 (2017).
 193. Parreira, P., Heymans, M. W., van Tulder, M. W., Esmail, R., Koes, B. W., Poquet, N., Lin, C.-W. C. & Maher, C. G. Back schools for non-specific low-back pain. *Cochrane Database Syst Rev* **3**, 1–98 (2017).
 194. Ribeiro, L. H., Jennings, F., Jone, A., Furtado, R. & Natour, J. Effectiveness of a back school program in low back pain. *Clin Exp Rheumatol* **26**, 81–88 (2008).
 195. Straube, S., Harden, M., Schröder, H., Arendacka, B., Fan, X., Moore, R. A. & Friede, T. Back schools for the treatment of chronic low back pain: Possibility of benefit but no convincing evidence after 47 years of research-systematic review and meta-analysis. *Pain* **157**, 2160–2172 (2016).
 196. Falah Arzpeyma, S., Mahfoozi, G., Sedighi, P. & Pour, M. Concomitance of Obesity and Overweight with Disc Height and Disc Herniation in Lumbar Spine. *Iran J Neurosurg* **2**, 11–14 (2016).

197. Samartzis, D., Karppinen, J., Luk, K. D. & Cheung, K. M. Body Mass Index and its Association with Lumbar Disc Herniation and Sciatica: A Large-Scale, Population-Based Study. *Glob Spine J* **4**, s-0034-1376593-s-0034-1376593 (2014).
198. Meredith, D. S., Huang, R. C., Nguyen, J. & Lyman, S. Obesity increases the risk of recurrent herniated nucleus pulposus after lumbar microdiscectomy. *Spine J* **10**, 575–580 (2010).
199. Van Tulder, M. W., Touray, T., Furlan, A. D., Solway, S. & Bouter, L. M. Muscle relaxants for nonspecific low back pain: A systematic review within the framework of the Cochrane Collaboration. *Spine* **28**, 1978–1992 (2003).
200. Abdel Shaheed, C., Maher, C. G., Williams, K. A. & McLachlan, A. J. Efficacy and tolerability of muscle relaxants for low back pain: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Pain* **21**, 228–237 (2017).
201. Witenko, C., Moorman-li, R., Motycka, C., Duane, K., Hincapie-castillo, J., Leonard, P. & Valaer, C. Considerations for the Appropriate Use of Skeletal Muscle Relaxants for the Management Of Acute Low Back Pain Considerations for the Use of Skeletal Muscle Relaxants for Acute Low Back Pain. *P&T* **39**, 427–435 (2014).
202. Schnitzer, T. J., Ferraro, A., Hunsche, E. & Kong, S. X. A comprehensive review of clinical trials on the efficacy and safety of drugs for the treatment of low back pain. *J Pain Symptom Manage* **28**, 72–95 (2004).
203. Chou, R., Qaseem, A., Snow, V., Casey, D., Cross, T. J., Shekelle, P. & Owens, D. K. Diagnosis and treatment of low back pain: A joint clinical practice guideline from the American College of Physicians and the American Pain Society. *Ann Intern Med* **147**, 478–491 (2007).
204. Enthoven, W. T., Roelofs, P. D., Deyo, R. A., Van, T. M. W., Koes, B. W., Enthoven Wendy, T. M., Roelofs Pepijn, D. D. M., Deyo Richard, A., van Tulder Maurits, W., Koes Bart, W., Enthoven, W. T., Roelofs, P. D., Deyo, R. A., Van, T. M. W. & Koes, B. W. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for chronic low back pain. *Cochrane Database Syst Rev* **2**, (2016).
205. Licciardone, J., Gatchel, R. & Azyal, S. Effects of opioids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on chronic low back pain and related measures: results from the

- PRECISION pain research registry. *Tex Med* **114**, 1751–1760 (2018).
206. McLain, R. F., Kalfas, I., Bell, G. R., Tetzlaff, J. E., Yoon, H. J. & Rana, M. Comparison of spinal and general anesthesia in lumbar laminectomy surgery: a case-controlled analysis of 400 patients. *J Neurosurg Spine* **2**, 17–22 (2005).
 207. Stafford, M. A., Peng, P. & Hill, D. A. Sciatica: A review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management. *Br J Anaesth* **99**, 461–473 (2007).
 208. Kuritzky, L. & Samraj, G. P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of low back pain. *J Pain Res* **5**, 579–590 (2012).
 209. Van Tulder, M., Malmivaara, A., Esmail, R. & Koes, B. Exercise therapy for low back pain: A systematic review within the framework of the cochrane collaboration back review group. *Spine* **25**, 2784–2796 (2000).
 210. Toroski, M., Nikfar, S., Mojahedian, M. M. & Ayati, M. H. Comparison of the Cost-utility Analysis of Electroacupuncture and Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in the Treatment of Chronic Low Back Pain. *JAMS* **11**, 62–66 (2018).
 211. Saal, J. a & Saal, J. S. Intradiscal electrothermal treatment for chronic discogenic low back pain: prospective outcome study with a minimum 2-year follow-up. *Spine* **27**, 966-973-974 (2002).
 212. Saal, J. S. & Saal, J. A. Management of chronic discogenic low back pain with a thermal intradiscal catheter: a preliminary report. *Spine* **25**, 382–388 (2000).
 213. He, L., Hu, X., Tang, Y., Li, X., Zheng, S. & Ni, J. Efficacy of Coblation Annuloplasty in Discogenic Low Back Pain. *Medicine (Baltimore)* **94**, e846 (2015).
 214. Helm, S., Hayek, S. M., Benyamin, R. M., Manchikanti, L., Helm, S., Hayek, S. M., Benyamin, R. M. & Manchikanti, L. Systematic review of the effectiveness of thermal annular procedures in treating discogenic low back pain. *Pain Physician* **12**, 207–232 (2009).
 215. Raj, P. P. Intervertebral disc: Anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract* **8**, 18–44 (2008).

216. Lee, M. S., Cooper, G., Lutz, G. E., Lutz, C. & Hong, H. M. Intradiscal electrothermal therapy (IDET) for treatment of chronic lumbar discogenic pain: a minimum 2-year clinical outcome study. *Pain Physician* **6**, 443–448 (2003).
217. Kloth, D. S., Fenton, D. S., Andersson, G. B. J. & Block, J. E. Intradiscal electrothermal therapy (IDET) for the treatment of discogenic low back pain: patient selection and indications for use. *Pain Physician* **11**, 659–668 (2008).
218. Sharifi, S. The development of novel biodegradable polymeric biomaterials for use in the repair of damaged intervertebral discs. (2012).
219. Schenk, B., Brouwer, P. A., Peul, W. C. & Van Buchem, M. A. Percutaneous laser disk decompression: A review of the literature. *Am J Neuroradiol* **27**, 232–235 (2006).
220. Sun, D., Li, Q., Tang, Y., Gong, W., He, L., Dou, Z. & Ni, J. Comparison of coblation annuloplasty and radiofrequency thermocoagulation for treatment of lumbar discogenic pain. *Med (United States)* **96**, 1–6 (2017).
221. Percutaneous disc nucleoplasty. *Southeastern spine institute and ambulatory surgery center. 2018* <http://www.southeasternspine.com/spinal-procedures-treatments/surgical-procedures/percutaneous-disc-nucleoplasty/> (2018). Available at: <http://www.southeasternspine.com/spinal-procedures-treatments/surgical-procedures/percutaneous-disc-nucleoplasty/>.
222. Sailhan, F. Techniques chirurgicales (dont techniques mini-invasives) utilisées dans les pathologies discales lombaires dégénératives. *Rev du Rhum Monogr* **80**, 252–259 (2013).
223. Son, I., Kim, Y. & Ha, K. Long-term clinical outcomes and radiological findings and their correlation with each other after standard open discectomy for lumbar disc herniation. *J Neurosurg Spine* **22**, 179–184 (2015).
224. Sherman, J., Cauthen, J., Schoenberg, D., Burns, M., Reaven, N. L. & Griffith, S. L. Economic impact of improving outcomes of lumbar discectomy. *Spine J* **10**, 108–116 (2010).
225. Smith, J. W. & Walmsley, R. Experimental incision of the intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Br* **33-B**, 612–625 (1951).
226. Melrose, J., Ghosh, P., Taylor, T. K., Hall, A., Osti, O. L., Vernon-Roberts, B. & Fraser,

- R. D. A longitudinal study of the matrix changes induced in the intervertebral disc by surgical damage to the annulus fibrosus. *J Orthop Res* **10**, 665–676 (1992).
227. Hampton, D., Laros, G., McCarron, R. & Franks, D. Healing potential of the Annulus fibrosus. *Spine* **14**, 398–401 (1989).
228. Fazzalari, N. L., Costi, J. J., Hearn, T. C., Fraser, R. D., Vernon-Roberts, B., Hutchinson, J., Manthey, B. a, Parkinson, I. H. & Sinclair, C. Mechanical and pathologic consequences of induced concentric anular tears in an ovine model. *Spine* **26**, 2575–2581 (2001).
229. Bailey, A., Araghi, A., Blumenthal, S. & Huffmon, G. V. Prospective, multicenter, randomized, controlled study of anular repair in lumbar discectomy: two-year follow-up. *Spine* **38**, 1161–9 (2013).
230. Parker, S. L., Grahovac, G., Vukas, D., Vilendecic, M., Ledic, D., McGirt, M. J. & Carragee, E. J. Effect of an Annular closure device (Barricaid) on same-level recurrent disk herniation and disk height loss after primary lumbar discectomy: two-year results of a multicenter prospective cohort study. *Clin Spine Surg* **29**, 454–460 (2016).
231. Choy, W. J., Phan, K., Diwan, A. D., Ong, C. S. & Mobbs, R. J. Annular closure device for disc herniation: meta-analysis of clinical outcome and complications. *BMC Musculoskelet Disord* **19**, 1–9 (2018).
232. Prothèse discale lombaire. <http://www.cad-fr.com/interventions/prothese-discale-lombaire>
233. DiPaola, C. P. & Molinari, R. W. Posterior lumbar interbody fusion. *J Am Acad Orthop Surg* **16**, 130–139 (2008).
234. Deyo, R. A. & Mirza, S. K. Trends and variations in the use of spine surgery. in *Clinical Orthopaedics and Related Research* 139–146 (2006).
235. Nardi, A., Tarantino, U., Ventura, L., Armotti, P., Resmini, G., Cozzi, L., Tonini, G., Ramazzina, E. & Rossini, M. Domino effect: Mechanic factors role. *Clin Cases Miner Bone Metab* **8**, 38–42 (2011).
236. Harrop, J. S., Youssef, J. A., Maltenfort, M., Vorwald, P., Jabbour, P., Bono, C. M., Goldfarb, N., Vaccaro, A. R. & Hilibrand, A. S. Lumbar adjacent segment degeneration

- and disease after arthrodesis and total disc arthroplasty. *Spine* **33**, 1701–1707 (2008).
237. Fairbank, J., Frost, H., Wilson-MacDonald, J., Yu, L. M., Barker, K. & Collins, R. Randomised controlled trial to compare surgical stabilisation of the lumbar spine with an intensive rehabilitation programme for patients with chronic low back pain: The MRC spine stabilisation trial. *Br Med J* **330**, 1233–1239 (2005).
 238. Malham, G. M., Parker, R. M., Ellis, N. J., Blecher, C. M., Chow, F. Y. & Claydon, M. H. Anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2: a prospective study of complications. *J Neurosurg Spine* **21**, 851–860 (2014).
 239. Crandall, D. G., Revella, J., Patterson, J., Huish, E., Chang, M. & McLemore, R. Transforaminal lumbar interbody fusion with rhBMP-2 in spinal deformity, spondylolisthesis, and degenerative disease - Part 2: BMP dosage-related complications and long-term outcomes in 509 patients. *Spine* **38**, 1137–1145 (2013).
 240. Behrbalk, E., Uri, O., Parks, R. M., Musson, R., Soh, R. C. C. & Boszczyk, B. M. Fusion and subsidence rate of stand alone anterior lumbar interbody fusion using PEEK cage with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Eur Spine J* **22**, 2869–2875 (2013).
 241. Formica, M., Divano, S., Cavagnaro, L., Basso, M., Zanirato, A., Formica, C. & Felli, L. Lumbar total disc arthroplasty: outdated surgery or here to stay procedure? A systematic review of current literature. *J Orthop Traumatol* **18**, 197–215 (2017).
 242. Jacobs, W. C. H., van der Gaag, N. A., Kruijt, M. C., Tuschel, A., de Kleuver, M., Peul, W. C., Verbout, A. J. & Oner, F. C. Total Disc Replacement for Chronic Discogenic Low Back Pain: A Cochrane Review. *Spine* **38**, 24–36 (2013).
 243. Ding, F., Jia, Z., Zhao, Z., Xie, L., Gao, X., Ma, D. & Liu, M. Total disc replacement versus fusion for lumbar degenerative disc disease: a systematic review of overlapping meta-analyses. *Eur Spine J* **26**, 806–815 (2017).
 244. Soares de souza, E., Kusabara, R., Mastromauro de Oliveira, F., Nagasse, Y., Yamazato, C., Machado & Junior, J. A. Disc replacement in lumbar spine. *Coluna/ Columna* **17**, 59–62 (2018).
 245. Assaker, R., Ritter-Lang, K., Vardon, D., Litrico, S., Fuentes, S., Putzier, M., Franke, J.,

- Jarzem, P., Guigui, P., Nakach, G. & Le Huec, J. C. Maverick total disc replacement in a real-world patient population: a prospective, multicentre, observational study. *Eur Spine J* **24**, 2047–2055 (2015).
246. Coric, D., Guyer, R. D., Nunley, P. D., Musante, D., Carmody, C., Gordon, C., Lauryssen, C., Boltes, M. O. & Ohnmeiss, D. D. Prospective, randomized multicenter study of cervical arthroplasty versus anterior cervical discectomy and fusion: 5-year results with a metal-on-metal artificial disc. *J Neurosurg Spine* **28**, 1–10 (2018).
247. Schätz, C., Ritter-Lang, K., Gössel, L. & Dreßler, N. Comparison of Single-Level and Multiple-Level Outcomes of Total Disc Arthroplasty: 24-Month Results. *Int J Spine Surg* **9**, 1–11 (2015).
248. Garcia, R., Yue, J. J., Blumenthal, S., Coric, D., Patel, V. V., Leary, S. P., Dinh, D. H., Buttermann, G. R., Deutsch, H., Girardi, F., Billys, J. & Miller, L. E. Lumbar total disc replacement for discogenic low back pain: Two-year outcomes of the activL multicenter randomized controlled IDE clinical trial. *Spine* **40**, 1873–1881 (2015).
249. Yue, J. J., Garcia, R. & Miller, L. E. The activL® Artificial Disc: A next-generation motion-preserving implant for chronic lumbar discogenic pain. *Med Devices Evid Res* **9**, 75–84 (2016).
250. Lazennec, J. Y., Even, J., Skalli, W., Rakover, J. P., Brusson, A. & Rousseau, M. A. Clinical outcomes, radiologic kinematics, and effects on sagittal balance of the 6 df LP-ESP lumbar disc prosthesis. *Spine J* **14**, 1914–1920 (2014).
251. Lazennec, J. Y., Aaron, A., Brusson, A., Rakover, J. P. & Rousseau, M. A. The LP-ESP® lumbar disc prosthesis with 6 degrees of freedom: Development and 7 years of clinical experience. *Eur J Orthop Surg Traumatol* **23**, 131–143 (2013).
252. Abi-Hanna, D., Kerferd, J., Phan, K., Rao, P. & Mobbs, R. Lumbar Disk Arthroplasty for Degenerative Disk Disease: Literature Review. *World Neurosurg* **109**, 188–196 (2018).
253. Siepe, C. J., Heider, F., Wiechert, K., Hitzl, W., Ishak, B. & Mayer, M. H. Mid- to long-term results of total lumbar disc replacement: A prospective analysis with 5- to 10-year follow-up. *Spine J* **14**, 1417–1431 (2014).

254. Park, S.-J., Lee, C.-S., Chung, S.-S., Lee, K.-H., Kim, W.-S. & Lee, J.-Y. Long-Term Outcomes Following Lumbar Total Disc Replacement Using ProDisc-II. *Spine* **41**, 971–977 (2016).
255. Lu, S.-B., Hai, Y., Kong, C., Wang, Q.-Y., Su, Q., Zang, L., Kang, N., Meng, X.-L. & Wang, Y. An 11-year minimum follow-up of the Charite III lumbar disc replacement for the treatment of symptomatic degenerative disc disease. *Eur Spine J* **24**, 2056–2064 (2015).
256. Guyer, R. D., Pettine, K., Roh, J. S., Dimmig, T. A., Coric, D., McAfee, P. C. & Ohnmeiss, D. D. Five-year follow-up of a prospective, randomized trial comparing two lumbar total disc replacements. *Spine* **41**, 3–8 (2016).
257. Joshi, A. Nucleus Implant Parameters Significantly Change the Compressive Stiffness of the Human Lumbar Intervertebral Disc. *J Biomech Eng* **127**, 536 (2005).
258. Bergknut, N., Smolders, L. A., Koole, L. H., Voorhout, G., Hagman, R. E., Lagerstedt, A. S., Saralidze, K., Hazewinkel, H. A. W., van der Veen, A. J. & Meij, B. P. The performance of a hydrogel nucleus pulposus prosthesis in an ex vivo canine model. *Biomaterials* **31**, 6782–6788 (2010).
259. Bowles, R. D. & Setton, L. A. Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair. *Biomaterials* **129**, 54–67 (2017).
260. Durdag, E., Ayden, O., Albayrak, S., Atci, I. B. & Armagan, E. Fragmentation to epidural space: First documented complication of Gelstix™. *Turk Neurosurg* **24**, 602–605 (2014).
261. Kalson, N., Richardson, S. & Hoyland, J. Strategies for regeneration of the intervertebral disc. *Regen Med* **3**, 717–729 (2008).
262. Boyd, L. M. & Carter, A. J. Injectable biomaterials and vertebral endplate treatment for repair and regeneration of the intervertebral disc. *Eur Spine J* **15**, 414–421 (2006).
263. Bron, J. L., Helder, M. N., Meisel, H. J., Van Royen, B. J. & Smit, T. H. Repair, regenerative and supportive therapies of the annulus fibrosus: achievements and challenges. *Eur Spine J* **18**, 301–313 (2009).
264. Henry, N., Clouet, J., Le Bideau, J., Le Visage, C. & Guicheux, J. Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery

- systems. *Biotechnol Adv* **36**, 281–294 (2018).
265. Clouet, J., Fusellier, M., Camus, A., Le Visage, C. & Guicheux, J. Intervertebral disc regeneration: From cell therapy to the development of novel bioinspired endogenous repair strategies. *Adv Drug Deliv Rev* (2018).
266. Leung, V. Y. L., Chan, D. & Cheung, K. M. C. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J* **15**, 406–413 (2006).
267. Reza, A. T. & Nicoll, S. B. Hydrostatic pressure differentially regulates outer and inner annulus fibrosus cell matrix production in 3D scaffolds. *Ann Biomed Eng* **36**, 204–13 (2008).
268. Le Visage, C., Kim, S. W., Tateno, K., Sieber, A. N., Kostuik, J. P. & Leong, K. W. Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: Changes in extracellular matrix biosynthesis. *Spine* **31**, 2036–2042 (2006).
269. Sakai, D. & Schol, J. Cell therapy for intervertebral disc repair: Clinical perspective. *J Orthop Transl* **9**, 8–18 (2017).
270. Orozco, L., Soler, R., Morera, C., Alberca, M., Sánchez, A. & García-Sancho, J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: A pilot study. *Transplantation* **92**, 822–828 (2011).
271. Maria, A. T. J., Toupet, K., Maumus, M., Fonteneau, G., Le Quellec, A., Jorgensen, C., Guilpain, P. & Noel, D. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *J Autoimmun* **70**, 31–39 (2016).
272. Sakai, D. & Andersson, G. B. J. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions. *Nat Rev Rheumatol* **11**, 243–56 (2015).
273. Sakai, D. & Grad, S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease. *Adv Drug Deliv Rev* **84**, 159–171 (2015).
274. Moriguchi, Y., Alimi, M., Khair, T., Manolarakis, G., Berlin, C., Bonassar, L. J. & Hartl, R. Biological treatment approaches for degenerative disk disease: a literature review of in vivo animal and clinical data. *Glob spine J* **6**, 497–518 (2016).

275. Pennicooke, B., Moriguchi, Y., Hussain, I., Bonssar, L. & Härtl, R. Biological Treatment Approaches for Degenerative Disc Disease: A Review of Clinical Trials and Future Directions. *Cureus* **8**, (2016).
276. Pockert, A. J., Richardson, S. M., Le Maitre, C. L., Lyon, M., Deakin, J. A., Buttle, D. J., Freemont, A. J. & Hoyland, J. A. Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Rheum* **60**, 482–491 (2009).
277. Melrose, J., Shu, C., Young, C., Ho, R., Smith, M. M., Young, A. A., Smith, S. S., Gooden, B., Dart, A., Podadera, J., Appleyard, R. C. & Little, C. B. Mechanical Destabilization Induced by Controlled Annular Incision of the Intervertebral Disc Dysregulates Metalloproteinase Expression and Induces Disc Degeneration. *Spine* **37**, 18–25 (2012).
278. Feng, C., Liu, H., Yang, Y., Huang, B. & Zhou, Y. Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc. *Cell Physiol Biochem* **35**, 1–16 (2015).
279. Kristin, C., Robert, S. & Michelle, P. Effects of the intradiscal implantation of stromal vascular fraction plus platelet rich plasma in patients with degenerative disc disease. *J Transl Med* **15**, 12 (2017).
280. Tuakli-Wosornu, Y. A., Terry, A., Boachie-Adjei, K., Harrison, J. R., Gribbin, C. K., LaSalle, E. E., Nguyen, J. T., Solomon, J. L. & Lutz, G. E. Lumbar Intradiskal Platelet-Rich Plasma (PRP) Injections: A Prospective, Double-Blind, Randomized Controlled Study. *PM&R* **8**, 1–10 (2016).
281. Akeda, K., Ohishi, K., Masuda, K., Bae, W. C., Takegami, N., Yamada, J., Nakamura, T., Sakakibara, T., Kasai, Y. & Sudo, A. Intradiscal injection of autologous platelet-rich plasma releasate to treat discogenic low back pain: A preliminary clinical trial. *Asian Spine J* **11**, 380–389 (2017).
282. Chan, B. P. & Leong, K. W. Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* **17**, (2008).
283. Huang, Y.-C., Hu, Y., Li, Z. & Luk, K. D. K. Biomaterials for intervertebral disc regeneration: current status and looming challenges. *J Tissue Eng Regen Med* (2018).

284. Tschugg, A., Michnacs, F., Strowitzki, M., Meisel, H. J. & Thomé, C. A prospective multicenter phase I/II clinical trial to evaluate safety and efficacy of NOVOCART Disc plus autologous disc chondrocyte transplantation in the treatment of nucleotomized and degenerative lumbar disc to avoid secondary disease: Study protocol. *Trials* **17**, 1–10 (2016).
285. Krouwels, A., Melchels, F., Van Rijen, M. H. P., Oner, F. C., Dhert, W., Tryfonidou, M. & Creemers, L. Comparing hydrogels for human nucleus pulposus cell regeneration; role of osmolarity during expansion. *Tissue Eng Part C Methods* **24**, 222–232 (2018).
286. Koepsell, L., Zhang, L., Neufeld, D., Fong, H. & Deng, Y. Electrospun nanofibrous polycaprolactone scaffolds for tissue engineering of Annulus fibrosus. *Macromol Biosci* **11**, 391–399 (2011).
287. Koepsell, L., Remund, T., Bao, J., Neufeld, D., Fong, H. & Deng, Y. Tissue engineering of Annulus fibrosus using electrospun fibrous scaffolds with aligned polycaprolactone fibers. *J Biomed Mater Res Part A* **99A**, 564–575 (2011).
288. Ma, J., He, Y., Liu, X., Chen, W., Wang, A., Lin, C. Y., Mo, X. & Ye, X. A novel electrospun-aligned nanoyarn/three-dimensional porous nanofibrous hybrid scaffold for annulus fibrosus tissue engineering. *Int J Nanomedicine* **13**, 1553–1567 (2018).
289. Mauck, R. L., Baker, B. M., Nerurkar, N. L., Burdick, J. A., Li, W.-J., Tuan, R. S. & Elliott, D. M. Engineering on the straight and narrow: the mechanics of nanofibrous assemblies for fiber-reinforced tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* **15**, 171–193 (2009).
290. Nerurkar, N. L., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Mechanics of oriented electrospun nanofibrous scaffolds for Annulus fibrosus tissue engineering. *Anticancer Res* **11**, 1609–1612 (2007).
291. Yeganegi, M., Kandel, R. A. & Santerre, J. P. Characterization of a biodegradable electrospun polyurethane nanofiber scaffold: Mechanical properties and cytotoxicity. *Acta Biomater* **6**, 3847–3855 (2010).
292. Wismer, N., Grad, S., Fortunato, G., Ferguson, S. J., Alini, M. & Eglin, D. Biodegradable electrospun scaffolds for Annulus fibrosus tissue engineering: effect of scaffold structure and composition on Annulus fibrosus cells in vitro. *Tissue Eng Part A* **20**, 672–682

- (2014).
293. Nerurkar, N. L., Baker, B. M., Sen, S., Wible, E. E., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Nanofibrous biologic laminates replicate the form and function of the annulus fibrosus. *Nat Mater* **8**, 986–92 (2009).
 294. Kang, R., Li, H., Xi, Z., Ringgard, S., Baatrup, A., Rickers, K., Sun, M., Le, D. Q. S., Wang, M., Xie, L., Xie, Y., Chen, M. & Bünger, C. Surgical repair of annulus defect with biomimetic multilamellar nano/microfibrous scaffold in a porcine model. *J Tissue Eng Regen Med* **12**, 164–174 (2018).
 295. Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* **28**, 325–347 (2010).
 296. Baji, A., Mai, Y.-W., Wong, S.-C., Abtahi, M. & Chen, P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Compos Sci Technol* **70**, 703–718 (2010).
 297. Agarwal, S., Wendorff, J. H. & Greiner, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer (Guildf)* **49**, 5603–5621 (2008).
 298. Liu, M., Duan, X. P., Li, Y. M., Yang, D. P. & Long, Y. Z. Electrospun nanofibers for wound healing. *Mater Sci Eng C* **76**, 1413–1423 (2017).
 299. Baker, B. M., Trappmann, B., Wang, W. Y., Sakar, M. S., Kim, I. L., Shenoy, V. B., Burdick, J. a. & Chen, C. S. Cell-mediated fibre recruitment drives extracellular matrix mechanosensing in engineered fibrillar microenvironments. *Nat Mater* **14**, 1262–1268 (2015).
 300. Schnell, E., Klinkhammer, K., Balzer, S., Brook, G., Klee, D., Dalton, P. & Mey, J. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend. *Biomaterials* **28**, 3012–3025 (2007).
 301. Xin, X., Hussain, M. A. & Mao, J. J. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials* **28**, 316–325 (2007).
 302. Nisbet, D. R., Forsythe, J. S., Shen, W., Finkelstein, D. I. & Horne, M. K. Review Paper:

- A Review of the Cellular Response on Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. *J Biomater Appl* **24**, 7–29 (2009).
303. Ma, B., Xie, J., Jiang, J., Schuler, F. & Bartlett, D. Rational design of nanofiber scaffolds for orthopedic tissue repair and regeneration. *Nanomedicine* **8**, 1459–1481 (2013).
 304. Bhattarai, D., Aguilar, L., Park, C. & Kim, C. A Review on Properties of Natural and Synthetic Based Electrospun Fibrous Materials for Bone Tissue Engineering. *Membranes (Basel)* **8**, 62 (2018).
 305. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D. S., Sahoo, S., Ang, L. T., Goh, J. C., Toh, S. L., Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T. R., Dalton, P. D. & Hutmacher, D. W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *J Mater Chem* **93**, 1539–1550 (2011).
 306. Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L. & Li, C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. *Rev Adv Mater Sci* **34**, 123–140 (2013).
 307. Labet, M. & Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: A review. *Chem Soc Rev* **38**, 3484–3504 (2009).
 308. Mondal, D., Griffith, M. & Venkatraman, S. S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *Int J Polym Mater Polym Biomater* **65**, 255–265 (2016).
 309. Azimi, B., Nourpanah, P., Rabiee, M. & Arbab, S. Poly (lactide -co- glycolide) Fiber : An Overview. *J Eng Fiber Fabr* **9**, 74–90 (2014).
 310. Woodruff, M. A. & Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci* **35**, 1217–1256 (2010).
 311. Woodward, S. C., Brewer, P. S., Moatamed, F., Schindler, A. & Pitt, C. G. The intracellular degradation of poly(ε caprolactone). *J Biomed Mater Res* **19**, 437–444 (1985).
 312. Lotfi, M., Ghasemi, N., Rahimi, S., Vosoughhosseini, S., Saghiri, M. A. & Shahidi, A. Resilon: A Comprehensive Literature Review. *Dent Res Dent Clin Dent Prospect* **7**, 119–131 (2013).

313. Middleton, J. C. & Tipton, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* **21**, 2335–2346 (2000).
314. Bezwada, R. S., Jamiolkowski, D. D., Lee, I. Y., Agarwal, V., Persivale, J., Trenka-Benthin, S., Erneta, M., Suryadevara, J., Yang, A. & Liu, S. Monocryl® suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture. *Biomaterials* **16**, 1141–1148 (1995).
315. Bertleff, M. J. O. E., Meek, M. F. & Nicolai, J. P. A. A prospective clinical evaluation of biodegradable Neurolac nerve guides for sensory nerve repair in the hand. *J Hand Surg Am* **30**, 513–518 (2005).
316. Huss, F. R. M., Nyman, E., Gustafson, C.-J., Gisselält, K., Liljensten, E. & Kratz, G. Characterization of a new degradable polymer scaffold for regeneration of the dermis. *Organogenesis* **4**, 195–200 (2008).
317. Petranto, R. D., Lubin, M., Floros, R. C., Pfeiffer, D. A., Spiess, K., Lenz, R., Crowell, A., Ahmad, H., Chandrani, S. & Landsman, A. S. Soft Tissue Reconstruction with Artelon for Multiple Foot and Ankle Applications. *Clin Podiatr Med Surg* **35**, 331–342 (2018).
318. Mondal, D., Griffith, M. & Venkatraman, S. S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery : Current scenario and challenges. *Int J Polym Mater Polym Biomater* **65**, 255–265 (2016).
319. Mendes, G. C. C., Brandão, T. R. S. & Silva, C. L. M. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. *Am J Infect Control* **35**, 574–581 (2007).
320. Boiano, J. M. & Steege, A. L. Ethylene Oxide and Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterilization: Precautionary Practices in U.S. Hospitals HHS Public Access. *Zentralsterilisation (Wiesb)* **23**, 262–268 (2015).
321. Ghobeira, R., Philips, C., Declercq, H., Cools, P., De Geyter, N., Cornelissen, R. & Morent, R. Effects of different sterilization methods on the physico-chemical and bioresponsive properties of plasma-treated polycaprolactone films. *Biomed Mater* **12**, (2017).
322. Boyer, C., Figueiredo, L., Pace, R., Lesoeur, J., Rouillon, T., Visage, C. Le, Tassin, J. F., Weiss, P., Guicheux, J. & Rethore, G. Laponite nanoparticle-associated silated

- hydroxypropylmethyl cellulose as an injectable reinforced interpenetrating network hydrogel for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* **65**, 112–122 (2018).
323. Bard. *BARD surgical felts, pledgets and tapes. Instructions for use. Manufacturer specifications.* <http://www.bardpv.com/wp-content/uploads/2017/01/BAW1392300R1-Bard-Surgical-Felts-Pledgets-and-Tapes-IFU-released-12-20-16-.pdf>
324. van Amerongen, M., Molema, G., Plantinga, J., Moorlag, H. & van Luyn, M. Neovascularization and vascular markers in a foreign body reaction to subcutaneously implanted degradable biomaterial in mice. *Angiogenesis* **5**, 173–180 (2002).
325. Gálvez-Montón, C., Fernandez-Figueras, M. T., Martí, M., Soler-Botija, C., Roura, S., Perea-Gil, I., Prat-Vidal, C., Lluçà-Valldeperas, A., Raya, Á. & Bayes-Genis, A. Neoinnervation and neovascularization of acellular pericardial-derived scaffolds in myocardial infarcts. *Stem Cell Res Ther* **6**, 1–7 (2015).
326. Ledet, E. H., Jeshuran, W., Glennon, J. C., Shaffrey, C., De Deyne, P., Belden, C., Kallakury, B. & Carl, A. L. Small intestinal submucosa for anular defect closure: long-term response in an in vivo sheep model. *Spine* **34**, 1457–1463 (2009).
327. Hegewald, A. A., Medved, F., Feng, D., Tsagogiorgas, C., Beierfuß, A., Schindler, G. A. K., Trunk, M., Kaps, C., Mern, D. S. & Thomé, C. Enhancing tissue repair in Annulus fibrosus defects of the intervertebral disc: analysis of a bio-integrative annulus implant in an in-vivo ovine model. *J Tissue Eng Regen Med* **9**, 405–414 (2015).
328. Lewis, N. T., Hussain, M. A. & Mao, J. J. Investigation of nano-mechanical properties of annulus fibrosus using atomic force microscopy. *Micron* **39**, 1008–1019 (2008).
329. Graham, H., Hodson, N., Hoyland, J., Millward-Sadler, S., Garrod, D., Scothern, A., Griffiths, C., Watson, R., Cox, T., Erler, J., Trafford, A. & Sherratt, M. Tissue section AFM: In situ ultrastructural imaging of native biomolecules. *Matrix Biol* **29**, 254–260 (2010).
330. Liu, W., Thomopoulos, S. & Xia, Y. Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine. *Adv Healthc Mater* **1**, 10–25 (2012).

Titre : Médecine régénératrice du disque intervertébral : Mise au point et évaluation de biomatériaux électrospinnés pour la réparation de l'*Annulus fibrosus*

Mots clés : Disque intervertébral, hernie discale, *Annulus fibrosus*, électrospinning, polycaprolactone, implant multicouche

Résumé : Le disque intervertébral est un composant fondamental de la colonne vertébrale jouant un rôle essentiel dans la mobilité du rachis. Il a été montré que 20% des lombalgies chroniques sont liées à une hernie discale, définie comme la protrusion du *Nucleus pulposus* (NP), à travers l'*Annulus fibrosus* (AF), dans le canal rachidien pouvant induire la compression d'une racine nerveuse à l'origine des douleurs dites «projetées». Les lésions au sein de l'AF permettent l'entrée de vaisseaux et terminaisons nerveuses rendant le DIV lui-même douloureux, il s'agit de douleurs dites « discogéniques ». Actuellement, la procédure chirurgicale utilisée est la discectomie partielle qui consiste à enlever la partie herniée et ainsi décompresser la racine nerveuse impliquée dans la douleur projetée. Bien qu'efficace à court terme, les résultats cliniques à long terme

sont plus ou moins satisfaisants. En effet, les défauts au sein de l'AF persistent avec le temps et sont associés à un risque de 20% de réapparition d'une hernie discale et conduisent à une augmentation de 20% de la fréquence d'apparition de la dégénérescence discale. Dans ce contexte, cette thèse a pour objectif de développer à l'aide de la technique d'électrospinning un biomatériau non cellularisé dont la structure reproduit l'organisation fibreuse de l'AF natif. La capacité de ce biomatériau à promouvoir une infiltration spontanée de cellules de l'AF, leur orientation et le dépôt d'une matrice extracellulaire orientée, a ensuite été testée dans un modèle de culture d'explant d'AF de brebis. Enfin, la stimulation de la régénération de l'AF par ce biomatériau a été évaluée dans un modèle de défaut annulaire induit chez la brebis.

Title: Regenerative medicine of the intervertebral disc: Design and evaluation of electrospun structured polycaprolactone biomaterials for *Annulus fibrosus* repair.

Keywords : Intervertebral disc, herniation, *Annulus fibrosus*, electrospinning, polycaprolactone, multi-layer scaffold

Abstract: The intervertebral disc is a fundamental component of the spine which plays an essential role in the mobility of the spine. It has been shown that 20% of chronic low back pain is related to a disc herniation, defined as the protrusion of the *Nucleus pulposus* (NP), through the *Annulus fibrosus* (AF), in the spinal canal that can induce the compression of a nerve root and cause radicular pain. Moreover, lesions within the AF allow the entry of vessels and nerve endings that make the IVD itself painful, which is called "discogenic" pain. Currently, the surgical procedure used is partial discectomy, which consists in removing the herniated tissue, thus decompressing the nerve root involved in the radicular pain. Although short term efficiency has been proven, long-term clinical outcomes are questionable. Indeed, defects within the AF persist

in time due to the limited intrinsic healing capacity of the AF and are associated with a 20% risk of reoccurrence of a disc herniation and lead to a 20% increase in the frequency of occurrence of disc degeneration. In this context, the objective of this thesis was to develop, using the electrospinning technique, a non-cellularized biomaterial whose structure reproduces the fibrous organization of native AF. Subsequently, the ability of this biomaterial to promote spontaneous infiltration of AF cells, their orientation and the deposition of an oriented extracellular matrix was tested in a sheep AF explant culture model. Finally, the stimulation of AF regeneration by this biomaterial was evaluated in an induced annular defect model in the sheep.