

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Technologies Biomédicale, Médecine Régénératrice et
Biomatériaux

Par

Leslie FRAPIN

Libération séquentielle de facteurs biologiques pour la régénérescence endogène du disque intervertébral

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 11 décembre 2019

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

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

David Eglin

Professeur des Universités

AO Research institute Davos

Alexandra Clayser-Montebault

Maitre de Conférence des Universités

Laboratoire d'Ingénierie des
Matériaux Polymères, CNRS UMR
5223, Université Claude Bernard Lyon 1

Composition du Jury :

Président de jury : Emmanuel Belamie

Professeur des Universités – Ecole Pratique des Hautes Etudes,
Institut Charles Gerhardt, UMR 5253 CNRS – Université de Montpellier

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

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier – Université de Nantes,
Laboratoire RMeS, INSERM UMRS 1229

Invité(s)

Marion Fusellier Maitre de Conférences

Université de Nantes, Laboratoire RMeS, INSERM UMRS 1229

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier Monsieur Pierre Weiss et Monsieur Jérôme Guicheux pour m'avoir accueillie, il y a maintenant 5 ans, au sein du Laboratoire LIOAD INSERM UMRS 791.

Merci à Monsieur Jérôme Guicheux et Madame Catherine Le Visage de m'accueillir actuellement au sein du Laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229.

Je remercie, Madame Catherine Le Visage, ma directrice de thèse, pour m'avoir encadrée durant ces 5 années, de mes stages de pharmacie à mon doctorat de recherche. Merci pour ton temps consacré à ma formation professionnelle et tes nombreux conseils depuis l'époque de mon premier stage à maintenant. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussée à me dépasser afin de mener au terme cette aventure si enrichissante tant professionnellement que personnellement.

Je remercie également Monsieur Jérôme Guicheux, mon co-directeur de thèse, de m'avoir donné ma chance sur ce projet. Merci pour ta disponibilité, ta grande rigueur et tes nombreux conseils scientifiques qui ont grandement participé à ma maturité scientifique.

Je remercie Monsieur Johann Clouet, mon co-encadrant de thèse, pour son aide lors du choix crucial de poursuivre mon parcours professionnel par une thèse de sciences. Merci de ton soutien et de ta confiance lors de ma soutenance au concours de l'école doctorale et durant les années suivantes.

Merci à vous trois, de m'avoir laissé la possibilité d'être autonome durant ces trois années et d'avoir été compréhensifs aux moments difficiles, tout en ayant su me pousser.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame Alexandra Clayer-Montembault et Monsieur David Eglin pour me faire l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs, ainsi qu'à Monsieur Emmanuel Belamie pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

Je remercie également Madame Marion Fusellier d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que membre invité. Merci également pour ta précieuse aide concernant tous les aspects translationnels de ce projet et pour m'avoir guidée durant les nombreuses expérimentations à l'école vétérinaire ONIRIS. Merci pour ton énergie qui a rendu possible ces expérimentations et ta bonne humeur permanente.

Je tiens à remercier tout particulièrement Claire Chédeville, Manon André, Edouard Samarut et Constantin Moraru qui ont chacun apporté une grande contribution à ce projet. Merci pour toutes les expérimentations réalisées et pour m'avoir aidé lorsque les journées ne comptaient pas assez d'heures. Merci également à Julie Lesoeur de m'avoir guidée pour toute la partie histologique de ce projet et t'être rendue disponible pour répondre à mes multiples interrogations. Merci à Boris Halgand, pour être toujours là quand on a besoin de lui, et pour ses précieux conseils tant professionnels que personnels.

Merci également à Dominique Rouleau, Stéphane Madec, Olivier Gauthier, Nora Boushina, Patrice Roy, Ingrid Leborgne et Cyrille Décante pour votre bonne humeur, votre disponibilité et votre aide durant les nombreuses expérimentations à l'école vétérinaire ONIRIS.

Je remercie également l'ensemble des membres du laboratoire pour leur sympathie et leur bonne humeur durant tout ce temps passé au laboratoire et en dehors.

Parce que ce ne fut pas qu'une riche expérience professionnelle mais également une véritable aventure personnelle, et parce que j'ai eu besoin de vous tous pour la mener à bien.

Je suis particulièrement reconnaissante envers tous mes merveilleux amis que m'a offert cette thèse :

Merci à ma princesse Chichi avec qui ça a été le grand amour dès la première seconde. Je suis tellement heureuse de te connaître. J'ai l'impression de te connaître depuis toujours et que tu fasses partie de ma vie était une évidence. Merci pour tous nos fous rires, toutes nos discussions, nos petites attentions que l'on a l'une pour l'autre et les bons week-ends que l'on passe ensemble. Je sais que des « Richards » et des bons moments ensemble il y en aura encore pleins Mme Chichi et que ce n'est pas la distance qui empêchera cela.

Merci à ma super coloc de quelques semaines, Elody, avec qui nous sommes devenue également rapidement très proche, tellement que tu m'as même très gentiment accueilli chez toi. Merci mon chonbi pour ces merveilleux fous rires au labo et ces nombreuses soirées qui resteront de superbes souvenirs de mes premiers temps à Nantes mais également des actuels. J'ai l'impression de me retrouver dans ton parcours et je sais que cette amitié que l'on a tissé est solide et va continuer d'être remplie d'éclats de joies.

Merci à ma super Maudus qui a été très importante tant dans mon parcours personnel que professionnel au labo. Tu as été une véritable amie de galère durant nos thèses et grâce à ça nous avons construit une véritable amitié qui a grandi chaque jour. Tu as été un pilier durant les coups durs et j'espère avoir pu remplir ce rôle-là pour toi aussi. Ta réconfortante présence m'a manqué au labo pour cette dernière année mais tu as été là malgré tout avec moi à me soutenir en permanence. Je suis fière de nous ma Maudus et maintenant vivement la suite.

Merci à mon Kiki, ma blondasse préférée. Dès les débuts nous avons tissé de solides liens d'amitié tous les deux, avec de nombreuses bières partagées ça c'est sûr mais aussi de vrais moments de discussions et de nombreuses passions communes. Grâce à toi j'ai réalisé mon premier semi-marathon et j'espère qu'on aura l'occasion d'en courir d'autres ensemble. Je sais que malgré tes airs un peu distants parfois je peux vraiment compter sur toi et je sais que ça, ça ne changera pas. On se revoit vite en Suisse maintenant pour t'apprendre à skier et faire de belles randonnées ensemble.

Merci à Pierre, mon frère de thèse. Heureusement que tu as été là pour vivre cette aventure avec moi. Vivre ces fins de thèse ensemble n'a fait que renforcer notre amitié. Nous avons partagé les bons moments comme les plus difficiles. Tu as toujours été une oreille attentive à qui me confier mais également une solide épaule sur laquelle me reposer. J'espère avoir pu t'apporter les mêmes choses durant cette aventure et je sais que la suite nous réserve pleins de bons moments à partager. Courage mon Pierre, on tient le bon bout et on pourra être fière de nous.

Merci à ma Giugiu, pour ton amitié, ta douceur et ta gentillesse. Cette année nous a également beaucoup rapproché et j'en suis très heureuse. Ne doute plus de toi, aie confiance, car tu es tout à fait capable de déplacer des montagnes.

Merci à Nina et Bob mes copines de bureau jusqu'au bout. Merci pour votre amitié, votre bonne humeur, vos nombreux conseils avisés et votre soutien quotidien. Vous m'avez toujours attentivement écouté, avez supporté mes plaintes et remises en question de la fin de thèse et surtout vous m'avez aidé à tenir aux moments plus difficiles. Merci les filles.

Merci à Cyril, mon bff, pour ton soutien, ta compréhension et ton rire fort et franc. Merci pour avoir su me faire sourire avec tes taquineries mêmes quand le moral n'était pas toujours là. Je te souhaite bon courage pour cette dernière année que j'ai hâte d'arroser aux bons vins que tu nous auras concocté.

Mon Kéké, mon fier ardéchois préféré, pour tous les bons moments quotidiens passés durant ces premières années. Merci pour être comme tu es, un ami fidèle sur qui compter pour avoir toujours la bonne blague à sortir ou le gentil mot pour te réconforter. J'ai été tellement déçu de ne pas pouvoir partager quotidiennement cette aventure avec toi, mais finalement cela ne nous a pas du tout empêché de passer pleins de superbes moments ensemble malgré tout.

Ma tornade Mélanie, pour ta force, ton rire et ta bonne humeur. Tu es quelqu'un de formidable que j'ai eu la chance de rencontrer ces dernières années, avec une discrétion légendaire qui fait de toi la superbe tornade que tu es. J'ai adoré chaque discussion et soirée passée ensemble ma belle et j'ai hâte d'avoir le temps de plus se voir pour profiter de ces bons moments.

Merci à vous tous pour avoir partagé mes joies, m'avoir soutenue et supportée pendant ces 3 années. Vous avez tous tant embellis mon quotidien durant ces années.

J'ai également une grosse pensée pour Fabien, Lily, Mousse-Mousse et Brian, avec lesquels je suis très heureuse d'avoir passé tant de bons moments. Merci pour votre bonne humeur et votre soutien. Je vous souhaite tout le meilleur et pleins de courage pour vos thèses, je suis sûre que vous allez tout déchirer. J'ai hâte que l'on fête ça tous ensemble.

Je remercie également mes autres amis du laboratoire et nantais : Vincent, Chaton, Soazig, Audrey, Cécile, Alex, Boris, Solenne, Caro, Rodolphe, Eloïse, Lucie et Agathe pour leur amitié et tous les bons moments passés ensemble. Merci d'avoir été là.

Je remercie également mes amis de toujours, Mamat, Théo, Popy, Por Favor, Brubru, Mammouth, Julouille, Adélou, Dorou, mes deux Morues et ma Dedin, pour votre amitié si précieuse qui m'apporte tant. Vous m'avez tous aidé à vivre pleinement cette aventure en m'apportant des moments de soutien et de décompression dès que cela était nécessaire.

Enfin,

Je tiens tout particulièrement à remercier Constance, celle qui est comme ma sœur depuis toujours. Merci mon Lapin pour ton soutien infailible à chaque instant. Malgré la distance et comme à chaque fois tu as été au plus proche de moi pour m'aider de la meilleure des manières possible dans cette aventure. Merci pour ta bienveillance, ton écoute, tes nombreux conseils et tes coups de boost qui m'ont aidée à tenir et à me remotiver dans les moments les plus difficiles. Et même si tu ne pourras pas être là le jour J je sais que c'est pour la meilleure

des raisons possibles et qu'on aura moult occasions de fêter toutes ces bonnes nouvelles après. Encore de merveilleuses nouvelles aventures qui commencent mon Lapin!

Je remercie énormément mes parents Pascale et Henri, et mes sœurs Axelle et Cléa. Je sais que me soutenir pendant ces trois années n'a pas été de tout repos et je ne vous remercierai jamais assez d'être tant là pour moi de jour comme de nuit. Merci pour votre amour, votre bienveillance et votre soutien. Merci d'avoir su m'aider à me relever quand j'en ai eu besoin. C'est grâce à vous tout particulièrement que j'en suis là aujourd'hui.

Un grand merci aussi à mes super mamies pour votre amour, votre soutien et toutes vos petites attentions.

Merci enfin du fond du cœur à toi Eric, pour avoir accepté de vivre cette aventure avec moi à chaque instant. Merci de m'avoir soutenu dès le premier jour. Merci de m'avoir relevée dans les moments difficiles et m'avoir toujours redonnée le sourire. Tu m'as permis de tenir et cette thèse je te la dois grandement. J'ai maintenant tellement hâte de vivre toutes les belles choses qui nous attendent. Merci pour ton amour, ta bienveillance et tout le bonheur que tu m'apportes à chaque instant.

Finalement, parce que c'est pour vous que j'ai voulu me lancer puis poursuivre dans la recherche médicale, et parce que j'ai plus qu'envie de partager cette aventure également avec vous je dédie cette thèse à mes deux aimés grands-pères qui me manquent tant aujourd'hui.

Publications

Revue scientifique

- « **Lessons learned from intervertebral disc pathophysiology to guide rational design of sequential delivery systems for therapeutic biological factors** ».

L. Frapin, J. Clouet, M. Fusellier, V. Delplace, J. Guicheux, C. Le Visage – Publiée dans *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019 ; 13497, 23

Article expérimental

- « **Controlled release of biological factors for endogenous progenitor cells migration and intervertebral disc extracellular matrix remodeling** ».

L. Frapin, J. Clouet, C. Chedeville, C. Moraru, E. Samarut, N. Henry, M. André, E. Bord, B. Halgand, J. Lesoeur, M. Fusellier, J. Guicheux, C. Le Visage – Soumis dans *eBiomedicine*

Communications

Communications orales

- L. Frapin « Données récentes de la science et développement de système à libération contrôlée de facteurs biologiques pour la réparation endogène du disque intervertébral ».

A la Racine du Mal – Parcours de soins du patient atteint de radiculalgie 2017, Nantes, France

- L. Frapin, J. Clouet, N. Henry, C. Chedeville, M. Fusellier, J. Guicheux, C. Le Visage « Controlled release of biological factors for progenitor cell-mediated endogenous repair of intervertebral discs ».

European Orthopaedic Research Society (EORS) 2018, Galway, Irlande

- L. Frapin, J. Clouet, N. Henry, C. Chedeville, M. Fusellier, J. Guicheux, C. Le Visage « Controlled release of biological factors for progenitor cell-mediated endogenous repair of intervertebral discs ».

Bioregate European Regenerative Medicine Forum 2018, Nantes, France, *prix de la meilleure communication orale*

- L. Frapin, J. Clouet, N. Henry, C. Chedeville, M. Fusellier, J. Guicheux, C. Le Visage « Controlled release of biological factors for progenitor cell-mediated endogenous repair of intervertebral discs ».

Biospine 7th International Congress on Biotechnologies for Spine Surgery 2019, Rome, Italie

- L. Frapin, J. Clouet, N. Henry, C. Chedeville, M. Fusellier, J. Guicheux, C. Le Visage « Controlled release of biological factors for progenitor cell-mediated endogenous repair of intervertebral discs ».

Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) EU 2019, Rhodes, Grèce

Communications affichées

- L. Frapin, J. Clouet, N. Henry, C. Chedeville, J. Guicheux, C. Le Visage « Controlled release of biological factors for the endogenous repair of intervertebral discs ». **Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress 2017**, Las Vegas, Nevada, Etats-Unis
- L. Frapin, J. Clouet, N. Henry, C. Chedeville, J. Guicheux, C. Le Visage « Controlled release of biological factors for the endogenous repair of intervertebral discs ». **Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress 2018**, Liverpool, Angleterre

Encadrements

- **Constantin Moraru (Novembre 2017 – Novembre 2018 – Année recherche, Stage Master 2 Biologie – Santé – spécialité : Biologie Biotechnologie et Recherche Thérapeutique – Nantes)**

Développement d'un modèle de culture *ex vivo* de disque intervertébral ovin pour l'étude des approches de médecine régénératrice de la régénérescence discale.

- **Edouard Samarut (Novembre 2018 – Novembre 2019 – Année recherche, Stage Master 2 Sciences du Médicament, Parcours Biothérapies et Médicaments de Thérapies Innovantes – Nantes)**

Apport des modèles de dégénérescence discale *ex vivo* dans l'approche de la médecine régénérative discale endogène, chez l'ovin.

Abréviations

ADAMTs: A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin repeats

AF : Anneau fibreux (*Annulus fibrosus*)

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

AIS : Anti-Inflammatoires Stéroïdiens

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

BMP : Bone Morphogenetic Protein

CIMP-1 : CpG Island Methylator Phenotype 1

CNT : Cellules Notochordales

CSA : Cellules Souches/Stromales Adipeuses

CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

CCL5 : Chemokine C-C motif Ligand 5

CXCL12 : Chemokine C-X-C motif Ligand 12

DD : Dégénérescence Discale

DDL : Dégénérescence Discale Lombaire

DIV : Disque Intervertébral

FasL : Fas-Ligand

FDA : Food and Drug Administration

GDF-5 : Growth Differentiation Factor 5

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IRM : Imagerie à Résonnance Magnétique

MEC : Matrice Extracellulaire

MMP : Métalloprotéinase

NP : Noyau pulpeux (*Nucleus pulposus*)

NPCy : Nucléopulpocytes

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PG : Protéoglycane

PC : Plateau Cartilagineux

Shh : Sonic Hedgehog

SiRNA : Small interfering Ribonucleic Acid

T : Brachyury

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TIMPs : Tissue Inhibitor of Metalloprotéinases

TNF : Tumor Necrosis Factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Table des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DU RACHIS HUMAIN ET DES DISQUES INTERVERTEBRAUX (DIV) QUI LE COMPOSENT...	19
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DIFFUSION EN OXYGENE, NUTRIMENTS, EAU ET EXCRETION DES DECHETS METABOLIQUES QUI SE DERoule AU TRAVERS DES PLATEAUX CARTILAGINEUX DANS UN DIV SAIN.	20
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA COMPOSITION DU NP ET DE L'AF D'UN DIV HUMAIN JUVENILE SAIN.	22
FIGURE 4 : STRUCTURE ET ORGANISATION DES COMPOSANTS DE LA MEC DU NOYAU PULPEUX.....	22
FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE LAMELLAIRE COMPLEXE DE L'AF.	24
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TRANSMISSION DES FORCES VERS LE NP PUIS A L'AF, LORS D'UNE COMPRESSION VERTICALE DU DIV.....	24
FIGURE 7 : CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES ET STRUCTURAUX QUI SE METTENT EN PLACE LORS D'UNE DEGENERESCENCE DISCALE ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MODIFICATIONS DE LA MEC DU NP.....	28
FIGURE 8 : DIALOGUE MOLECULAIRE SUPPOSE ENTRE LES CNT ET LES NPCy.	29
FIGURE 9 : DESEQUILIBRE DE LA BALANCE ANABOLISME / CATABOLISME LORS DE LA MISE EN PLACE DES PROCESSUS DE DEGENERESCENCE DISCALE.	30
FIGURE 10 : CASCADES PHYSIOPATOLOGIQUES DE LA DEGENERESCENCE DISCALE.	32
FIGURE 11 : CLASSIFICATION DE MODIC DE LA DEGENERESCENCE DISCALE BASEE SUR L'IRM.	35
FIGURE 12 : CLASSIFICATION DE PFIRRMANN DE LA DEGENERESCENCE DISCALE BASEE SUR L'IRM.....	35
FIGURE 13 : ARTHRODESE ET ARTHROPLASTIE	41
FIGURE 14 : CAPACITES DE DIFFERENCIATION ET TRANSDIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES.....	49
FIGURE 15 : STRATEGIES INNOVANTES DE LIBERATION SEQUENTIELLE D'AGENTS BIOLOGIQUES, EN VUE D'UNE REGENERESCENCE MAXIMALE DES DIV.	54
FIGURE 16 : REPRESENTATION DES UNITES DE BASE CONSTITUANTS LE PULLULANE.....	61
FIGURE 17 : REPRESENTATION CHIMIQUE DU PROCESSUS DE RETICULATION POLYSACCHARIDIQUE PAR LE STMP EN MILIEU BASIQUE.....	62
FIGURE 18 : ADSORPTION ET PROFILS DE LIBERATION DES CHIMIOKINES CXCL12 ET CCL5 DES MICROBILLES DE PULLULANE.	70
FIGURE 19 : LIBERATION SEQUENTIELLE DES FACTEURS BIOLOGIQUES: CCL5, CXCL12, TGF- β 1 ET GDF-5 A PARTIR DES MICROBILLES DE PULLULANE.....	71
FIGURE 20 : CINETIQUE DE LIBERATION DES FACTEURS TGF- β 1 ET GDF-5 A PARTIR DU SYSTEME BIPHASIQUE PMBs/HPMC-Si.	72
FIGURE 21 : TESTS D'OPTIMISATION DES ESSAIS D'EVALUATION DE LA MIGRATION CELLULAIRE IN VITRO.....	75
FIGURE 22 : EVALUATION DE LA BIOACTIVITE IN VITRO DES CHIMIOKINES CXCL12 ET CCL5 SUR LA MIGRATION DES CSA HUMAINES.	78
FIGURE 23 : VARIATION DE LA MIGRATION DES CSA HUMAINES INDUITE PAR LES CHIMIOKINES CXCL12 ET CCL5 LIBEREES DES PMBs, EN FONCTION DU DONNEUR.....	79
FIGURE 24 : ÉVALUATION DE L'AGREGATION ENTRE LES PMBs ET LES CSA HUMAINS ET DE LA MEC SYNTHETISEE IN VITRO PAR LES CSA HUMAINES CULTIVEES AVEC DES PMBs CHARGEES EN TGF- β 1 ET GDF-5.	82
FIGURE 25 : ESSAIS SUPPLEMENTAIRES DE L'EVALUATION IN VITRO DE LA BIOACTIVITE DES PMBs CHARGES EN TGF- β 1 ET GDF-5 SUR DES CSA HUMAINES.....	85

FIGURE 26 : IMAGERIES A RESONNANCE MAGNETIQUE (IRM) REPRESENTATIVES DES RACHIS DE BREBIS (3-7 ANS) UTILISEES POUR LE MODELE EX VIVO OVIN DE DD SPONTANEE.....	88
FIGURE 27 : EVALUATION DE LA BIOACTIVITE IN VITRO DES CHIMIOKINES CXCL12 ET CCL5 SUR LA MIGRATION DE CSA OVINES.	94
 TABLEAU 1 : AVANTAGES ET LIMITES DES DIFFERENTES CELLULES ENVISAGEES DANS LE CADRE D'UNE THERAPIE CELLULAIRE DISCALE.	48

Table des matières

INTRODUCTION	12
PARTIE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LE DISQUE INTERVERTEBRAL ET LA DÉGÉNÉRESCENCE DISCALE ...	17
A. LE DISQUE INTERVERTEBRAL	18
GENERALITES	18
ANATOMIE DISCALE ET RELATION STRUCTURE-FONCTION.....	19
B. LA DÉGÉNÉRESCENCE DISCALE	25
PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DÉGÉNÉRESCENCE DISCALE	27
DIAGNOSTIC	34
C. LA PRISE EN CHARGE ACTUELLE DE LA DÉGÉNÉRESCENCE DISCALE ET DES DOULEURS LOMBAIRES	36
EPIDEMIOLOGIE ET RECUEIL DES DOULEURS LOMBAIRES	36
COUT DE LA PRISE EN CHARGE	37
RECOMMANDATIONS ET PRISE EN CHARGE ACTUELLE	38
D. STRATEGIES NOVATRICES DE TRAITEMENT DE LA DÉGÉNÉRESCENCE DISCALE ET DES DOULEURS LOMBAIRES	43
STRATEGIES DE LIBERATION SEQUENTIELLE EN FONCTION DE LA PROGRESSION DE LA DD	45
FACTEURS ANABOLIQUES	46
RE-CELLULARISATION DU NP.....	47
<i>Injection de cellules exogènes</i>	<i>47</i>
<i>Recrutement et mobilisation de cellules endogènes</i>	<i>50</i>
FACTEURS ANTI-CATABOLIQUES	52
E. ARTICLE DE REVUE.....	55
F. OBJECTIFS DE LA THESE.....	56
PARTIE II : DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES A LIBERATION SEQUENTIELLE DE FACTEURS BIOLOGIQUES POUR LA REGENERESCENCE ENDOGENE DU DISQUE INTERVERTEBRAL	58
A. RATIONNEL DE L'ETUDE	59
LE PULLULANE	61
B. RESULTATS EXPERIMENTAUX	62
C. ARTICLE EXPERIMENTAL.....	63
PARTIE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	66
PARTIE IV : CONCLUSIONS GENERALES.....	97
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100

INTRODUCTION

La colonne vertébrale chez l'homme correspond à un empilement complexe de 23 unités, chacune constituée de deux vertèbres séparées par un disque intervertébral (DIV). Le DIV, situé en position antérieure par rapport à la moelle épinière, est une articulation semi-mobile jouant un rôle central et fondamental dans la cinématique rachidienne. Il assure le maintien de la dynamique du rachis, tout en amortissant les chocs subis lors des mouvements de l'ensemble du corps. Chaque DIV présente une organisation interne unique qui lui confère élasticité et résistance, lui permettant de répartir les contraintes qu'il subit et de jouer ainsi le rôle d'amortisseur fibro-hydraulique. Il se compose d'une partie centrale, le noyau pulpeux ou *Nucleus pulposus* (NP) entouré d'une partie périphérique, l'anneau fibreux ou *Annulus fibrosus* (AF), et enfin de deux plateaux cartilagineux (PC) qui font la jonction avec les vertèbres sus- et sous-jacentes. Les sollicitations quotidiennes du DIV font une structure fragile et peuvent conduire à sa dégénérescence. Celle-ci s'accompagne dans certains cas de douleurs, nommées lombalgies, ressenties au niveau de la partie lombaire du rachis. Les lombalgies représentent un problème de santé publique majeur. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80% des individus sont ou seront touchés au moins une fois au cours de leur vie par des douleurs lombaires. Ces douleurs lombaires sont expliquées dans 40% des cas par une dégénérescence discale lombaire (DDL).

La prise en charge de ce problème de santé publique, qui ne fait que croître au regard du vieillissement des populations, est actuellement centrée sur le soulagement des douleurs. Des traitements pharmacologiques (antalgiques et anti-inflammatoires) sont proposés dans le cas de douleurs lombaires peu invalidantes. Dans les cas les plus sévères, des approches chirurgicales peuvent être proposées. Deux options sont alors envisagées : l'arthrodèse qui a pour principe l'ablation du DIV associée à une fusion des vertèbres sus- et sous-jacentes, et l'arthroplastie basée sur le remplacement du DIV par une prothèse. Ces stratégies thérapeutiques restent limitées et ne s'attaquent pas à l'origine de la lombalgie discogénique. Ainsi, le développement de nouvelles approches curatives est en cours, afin d'envisager de contrecarrer la cause des lombalgies discogéniques et restaurer le tissu dans son intégrité. L'amélioration des connaissances relatives aux processus menant à la dégénérescence du DIV a permis d'envisager de nouvelles approches en particulier de médecine régénératrice qui représente une stratégie particulièrement prometteuse. Celle-ci est basée sur la restauration du tissu natif à l'aide de techniques mini-invasives. Ces stratégies innovantes ont pour objectif

principal de restaurer la physiologie tissulaire autant en termes de structure que de fonctions biologiques, par l'utilisation d'agents thérapeutiques ciblant les processus dégénératifs discaux complexes. La dégénérescence discale est un phénomène naturel lié au vieillissement pouvant être accéléré et amplifié par divers facteurs. Sa mise en place implique de nombreux mécanismes biologiques qui induisent un important dérèglement de l'homéostasie tissulaire, conduisant à une rupture de la balance anabolisme/catabolisme en faveur d'évènements cataboliques et inflammatoires. Une diminution radicale de la densité cellulaire du NP, combinée à une atteinte qualitative et quantitative des composants de sa matrice extracellulaire (MEC) conduit alors à des modifications structurelles du tissu. Ces altérations tissulaires vont finalement affecter les propriétés mécaniques du DIV qui peuvent s'accompagner de l'apparition de douleurs ressenties par le patient. Il s'agit d'un véritable cercle vicieux impliquant de nombreux processus moléculaires et cellulaires. Les stratégies innovantes aspirent donc à restaurer la physiologie discale par repeuplement du NP et synthèse d'une nouvelle MEC saine. Afin de relancer la machinerie anabolique discale, deux types de stratégies sont envisagées au sein de la communauté scientifique : i) l'apport de cellules exogènes au niveau du NP dégénéré ; ou plus récemment ii) la stimulation des cellules discales endogènes par apport de facteurs biologiques. Ces 2 stratégies ont pour ambition commune la synthèse d'une nouvelle MEC nucléopulpogénique saine afin de restaurer la hauteur discale. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes concentrés sur la deuxième stratégie impliquant des cellules endogènes. De manière intéressante, il a été récemment décrit l'existence de cellules aux caractéristiques de cellules souches au sein de DIV sains et dégénérés chez l'humain et chez plusieurs mammifères. Ces cellules souches endogènes ont pu être isolées et caractérisées. Ces cellules expriment des marqueurs similaires à ceux des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (CD90, CD105 and CD73) et présentent également les mêmes capacités de différenciation. De plus, la présence de ces cellules souches discales au niveau des différentes régions du DIV suggèrent leur potentielle capacité de migration au sein du tissu. Cette capacité de migration a conduit à définir l'existence de routes de migration reliant les plateaux cartilagineux à l'AF et au NP. C'est dans ce contexte, que mon projet de thèse s'est développé, avec un axe de recherche s'articulant autour de l'utilisation de ces cellules souches discales. L'objectif de ce travail est ainsi de mettre à profit ces cellules souches discales en tant que cellules régénératrices afin de stimuler une réparation endogène du DIV. Pour ce faire, la migration de ces cellules vers le NP dégénéré, suivie de la stimulation de leurs

activités anaboliques sont deux étapes essentielles en vue de la synthèse d'une nouvelle MEC saine de type nucléopulpogénique. Pour stimuler une telle réparation tissulaire endogène, l'utilisation de facteurs biologiques spécifiques apparaît comme une option prometteuse. Ainsi, l'utilisation de molécules aux propriétés chimioattractantes afin de mobiliser puis recruter les cellules souches endogènes, ainsi que le recours à des facteurs de croissance afin de guider la synthèse d'une nouvelle MEC adaptée, constituent l'hypothèse principale de ce travail. Cependant, il est connu que les effets thérapeutiques de tels facteurs biologiques sont limités par leur rapide dégradation *in vivo*, amplifiée dans l'environnement hostile d'un DIV dégénéré. Afin de permettre le recrutement et la stimulation de l'activité anabolique de ces cellules souches endogènes, une action prolongée de ces facteurs biologiques est indispensable. La stratégie envisagée dans ce travail repose sur la succession de deux étapes principales avec l'action consécutive de chimiokines et de facteurs de croissance et relève donc d'un apport séquentiel de ces molécules. Or le DIV est un tissu particulièrement fragile et difficile d'accès, le caractère mini-invasif des thérapies envisagées est essentiel, en limitant des interventions répétitives. Pour toutes ces raisons, l'utilisation de biomatériaux injectables permet de s'affranchir de ces limites. En effet, le biomatériau va permettre de protéger les agents thérapeutiques durant et après l'injection ; de libérer les facteurs de manière progressive afin de prolonger dans le temps leur actions thérapeutiques et même de combiner l'apport séquentiel de plusieurs facteurs en n'ayant recours qu'à une seule injection.

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer un système injectable à libération séquentielle de facteurs biologiques afin i) de mobiliser puis de recruter les cellules souches discales au niveau du NP dégénéré, puis ii) de stimuler la synthèse par ces cellules recrutées d'une nouvelle MEC de type nucléopulpogénique, dans le but de restaurer l'homéostasie du NP et ainsi régénérer le tissu discal. Pour ce faire, deux types de facteurs biologiques ont été étudiés. Le premier type correspond à deux chimiokines (CCL5 et CXCL12). Le second type correspond à deux facteurs de croissance (GDF-5 et TGF- β 1). Ces facteurs biologiques sont combinés à des microbilles de pullulane.

Ce manuscrit est divisé en 4 grandes parties. Une première partie bibliographique décrivant la structure du DIV (Partie I - A : Le disque intervertébral), la physiopathologie de la DDL (Partie I - B Physiopathologie discale), les traitements actuels (Partie I - C La prise en charge actuelle de la dégénérescence discale et des douleurs lombaires) et enfin les stratégies thérapeutiques

novatrices pour le traitement des douleurs lombaires et la régénérescence discale (Partie I - D Stratégies novatrices de traitement de la dégénérescence discale et des douleurs lombaires). Une revue de la littérature, a été réalisée sur ces thématiques et est publiée dans le journal « Advanced Drug Delivery Review » (<https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.08.007>). Elle est incluse à la fin de la partie bibliographique.

La seconde partie présente une partie des résultats expérimentaux obtenus (Partie II – Développement d'un système à libération séquentielle de facteurs biologiques pour la régénérescence endogène du DIV). Une partie des résultats obtenus ont été soumis récemment sous la forme d'un article expérimental dans le journal « EBioMedicine ».

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

PARTIE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LE
DISQUE INTERVERTEBRAL ET LA
DÉGENERESCENCE DISCALE

A. Le disque intervertébral

Généralités

Le DIV est l'élément central d'une unité fonctionnelle rachidienne. C'est une articulation semi-mobile (amphiarthrose) qui sépare les vertèbres successives les unes des autres et qui confère à la colonne vertébrale ses capacités de mobilité et de maintien (Sally Roberts et al. 2006; Panjabi et al. 1994) (*Figure 1*). Le rachis humain compte 6 DIV au niveau cervical, 12 au niveau thoracique et 5 au niveau lombaire. Ces 23 DIV représentent un quart de la hauteur de la colonne vertébrale humaine et sont tous situés en position antérieure par rapport à la moelle épinière (Girish Pattappa et al. 2012). Chaque DIV présente 6 degrés de liberté avec des mouvements de flexions, extensions, inclinaisons latérales et rotations (Hsieh and Twomey 2009). Les DIV ont un diamètre moyen de 40 mm et une hauteur de 7 à 12 mm variant selon la localisation, avec une hauteur maximale pour les DIV situés en région lombaire (Urban and Roberts 2003). De plus, la forme des DIV varie selon leur situation au sein de la colonne vertébrale. Tandis que les DIV thoraciques sont ronds, les DIV lombaires sont ovales. De plus, cette articulation rachidienne présente certaines spécificités qui en font un tissu unique et complexe. Le DIV est la structure la moins vascularisée du corps humain, les cellules du DIV se trouvent à environ 8 mm du vaisseau sanguin le plus proche, susceptible de leur fournir de l'oxygène (Grunhagen et al. 2011). La tension en oxygène au centre du NP est d'environ 3 mm Hg, bien plus basse que celle du cartilage articulaire (20-80 mm Hg) ou encore des poumons (103 mm Hg) (Bartels et al. 1998). Cette faible vascularisation conduit à faire du DIV un tissu hypoxique, pauvre en nutriments et en oxygène, nécessitant alors une adaptation métabolique de ses cellules. L'adaptation des cellules discales à ces conditions hypoxiques est notamment due à la stabilisation du facteur HIF α (Hypoxia Inducible Factor) quelle que soit la teneur en oxygène, contrairement aux cellules cartilagineuses au sein desquelles les protéines de la famille HIF sont régulées selon le taux d'oxygène (Risbud et al. 2006; Agrawal et al. 2007). De plus, les cellules discales vont utiliser préférentiellement le métabolisme anaérobie afin de réduire leur consommation en oxygène. Ce recours exclusif à la glycolyse anaérobie va être responsable d'une acidification du milieu discal qui va alors présenter un pH aux alentours de 6,9 à 7,2, en raison de la réduction du pyruvate en lactate par le NADH,H⁺ (Kalsen, Richardson, and Hoyland 2008; Agrawal et al. 2007).

Ajoutée à cette propriété hypovasculaire, le DIV constitue en outre un tissu très faiblement innervé avec des terminaisons nerveuses présentes uniquement au niveau de la partie externe de l'AF (Purmessur, Freemont, and Hoyland 2008).

Enfin, il fait également partie des quelques tissus de l'organisme présentant un privilège immunitaire, tels que le cerveau, la rétine, les testicules et le fœtus (Bechmann et al. 1999; Griffith et al. 1995; Bellgrau et al. 1995; Runic et al. 1996). Le privilège immunitaire d'un tissu consiste à présenter une capacité de tolérance envers l'introduction d'antigènes étrangers sans entraîner l'apparition de réponse immunitaire inflammatoire (Engelhardt, Vajkoczy, and Weller 2017). Actuellement, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce privilège immunitaire. Il s'agit tout d'abord de l'existence d'une barrière physique autour du tissu discal. La seconde hypothèse repose sur l'existence de mécanismes moléculaires mettant en jeu les protéines transmembranaires Fas-Ligand (FasL ou CD95) de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) (Takada et al. 2002; Inui et al. 2004).

Chaque DIV sain est composé de trois structures essentielles : l'anneau fibreux (*Annulus fibrosus*, AF) qui entoure le noyau pulpeux (*Nucleus pulposus*, NP), et les plateaux cartilagineux (PC) qui permettent de faire la jonction avec les vertèbres sus et sous-jacentes (Huang, Urban, and Luk 2014; Adams et al. 2015) (*Figure 1*).

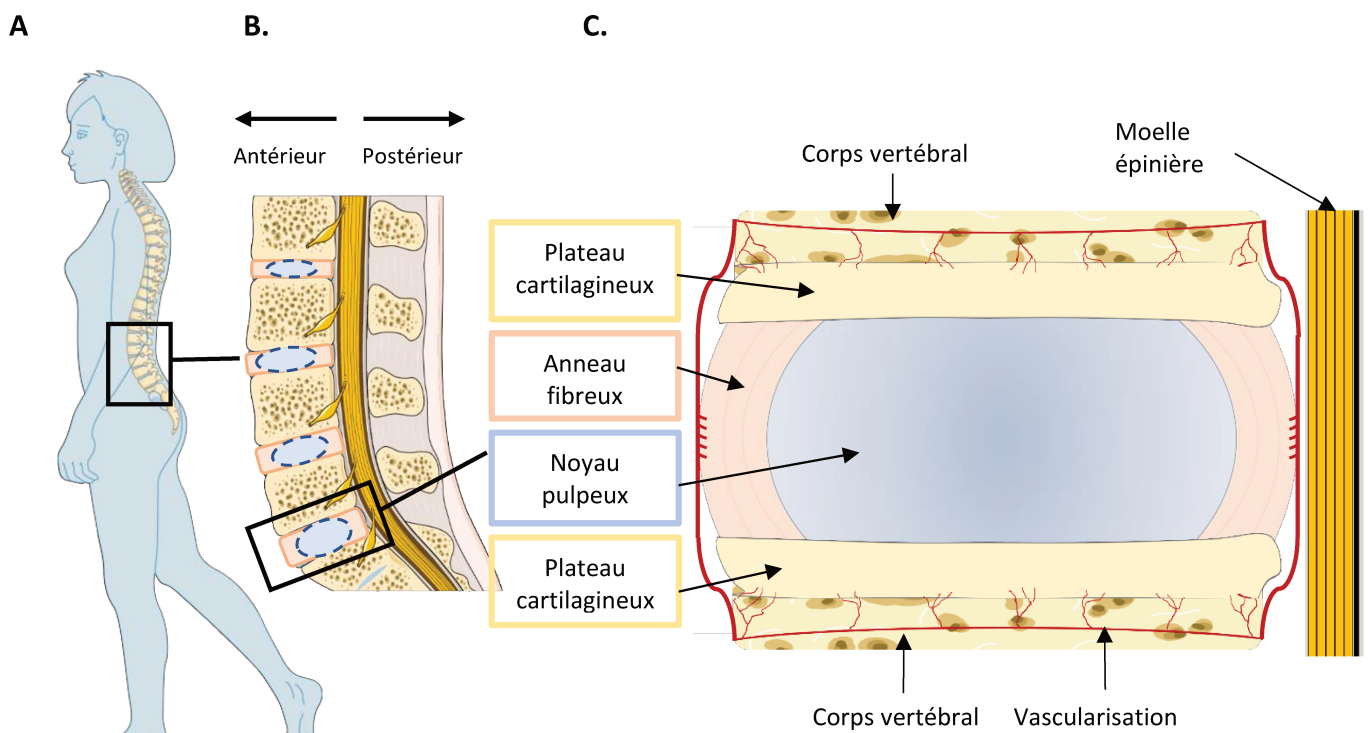


Figure 1 : Représentations schématiques du rachis humain et des disques intervertébraux (DIV) qui le composent. (A) Colonne vertébrale humaine. (B) Section lombaire de la colonne vertébrale, avec visualisation des DIV présents entre chacune des vertèbres et situés en position antérieure par rapport à la moëlle épinière. C. Organisation interne d'un DIV sain avec distinction des 3 régions qui le constituent : le noyau pulpeux (NP), l'anneau fibreux (AF) et les plateaux cartilagineux (PC).

Anatomie discale et relation structure-fonction

Comme dit précédemment, chaque DIV sain est constitué de deux plateaux cartilagineux (PC) bordant le tissu discal au-dessus et en-dessous, d'un noyau pulpeux (NP) central entouré d'un anneau fibreux (AF) en périphérie. Nous allons désormais détailler ces trois zones distinctes composant le DIV (*Figure 1*).

a. Les plateaux cartilagineux

Les plateaux cartilagineux sont de fines structures cartilagineuses (épaisseur < 1mm) permettant de faire les jonctions avec les vertèbres sus- et sous-jacentes. Ils font partie intégrante du DIV (Sally Roberts et al. 2006). Ils sont constitués de chondrocytes qui synthétisent une matrice extracellulaire (MEC) similaire à celle du cartilage articulaire, riche en protéoglycanes (PG) et collagène de type II, avec des ratios différents selon les parties en contact avec le NP ou l'AF. En effet, la zone des PC au contact du NP est composée davantage de PG tandis que celle au contact de l'AF contient plus de collagène (S. Roberts, Menage, and Urban 1989). Cette composition spécifique des PC apporte souplesse et déformabilité à ces structures. De plus, il s'agit des principales routes de diffusion en oxygène et nutriments mais également pour l'excrétion des déchets métaboliques (Urban, Smith, and Fairbank 2004; Rodriguez et al. 2012). Effectivement, la présence d'un réseau de fins vaisseaux sanguins au sein des PC va permettre le transport des petites molécules nécessaire à la maturation, nutrition et homéostasie discale (Maroudas et al. 1975; Huang, Urban, and Luk 2014) (*Figure 2*).

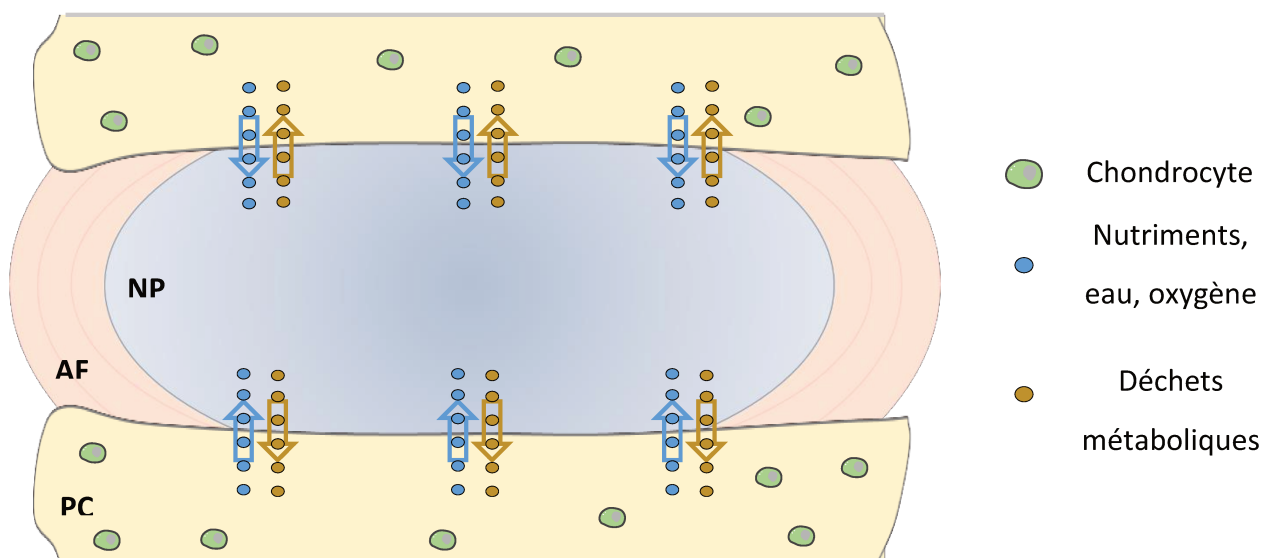


Figure 2 : Représentation schématique de la diffusion en oxygène, nutriments, eau et excrétion des déchets métaboliques qui se déroule au travers des plateaux cartilagineux dans un DIV sain.

b. Le noyau pulpeux ou *Nucleus pulposus*

Au centre du DIV nous retrouvons le NP qui est une structure gélatineuse, hautement hydratée ($\geq 80\%$ (w/w)) et présentant une densité cellulaire faible, d'environ 3 000 cellules/mm³ (S. Roberts et al. 1991; Hayes, Benjamin, and Ralphs 2001). Chez l'homme, le NP est notamment caractérisé par la présence concomitante, lors des premières années de vie, de deux populations cellulaires distinctes : les cellules notochordales (CNT) et les nucléopulpocytes (NPCy) (Chelberg et al. 1995) (*Figure 3*). Les CNT sont des vestiges de la notochorde embryonnaire. Elles sont larges et composées de grandes vacuoles ce qui permet de les distinguer des NPCy qui sont quant à elles des cellules de petite taille (Trout, Buckwalter, and Moore 1982; Chen, Yan, and Setton 2005). Ces CNT sont présentes à la naissance puis elles disparaissent progressivement jusqu'à disparaître définitivement à la maturité squelettique (C.J. Hunter, Matyas, and Duncan 2003). De manière intéressante, cette disparition cellulaire précoce n'a pas lieu chez tous les mammifères. En effet, chez certaines espèces ces cellules persistent même après la maturité squelettique (souris, rat, lapin). Il est donc important de retenir que chez l'homme sain, les CNT matures ne sont présentes qu'au sein d'un NP juvénile, tandis que les NPCy persistent après maturation du NP. Ces NPCy, qui apparaissent à la naissance, présentent un phénotype proche de celui des chondrocytes. En effet ces cellules sphériques présentent la capacité de synthétiser une MEC riche en collagène de type II et en agrécane semblable à la MEC du cartilage articulaire (Chelberg et al. 1995; Sive et al. 2002; Christopher J. Hunter, Matyas, and Duncan 2004). Cependant, ces deux types de cellules, NPCy et chondrocytes n'ont pas la même origine embryologique : le NP provient de la notochorde, tandis que le cartilage articulaire provient du mésoderme (Aguiar, Johnson, and Oegema 1999). Ces deux types cellulaires sécrètent les mêmes constituants matriciels : agrécane et collagène de type II, mais avec un ratio différent. Les NPCy ont une activité sécrétoire définie par un ratio agrécane/collagène II de 27 : 1 tandis que ce ratio est de 2 : 1 pour les chondrocytes articulaires (Mwale et al. 2004). De plus, de récentes études ont confirmé l'expression spécifique par les NPCy de plusieurs marqueurs phénotypiques, tels que CD24, PAX1, HIF- α , CA12, OVOS2, Cytokératine 8/18/19 et OVOS2 (liste non exhaustive) (Risbud et al. 2015; Choi, Johnson, and Risbud 2015). Comme précisé auparavant, la MEC produite au niveau du NP est riche en collagène de type II et en agrécane. Ce dernier est un PG chargé négativement présentant des capacités de rétention hydrique. Il est composé d'une

protéine de 225 à 250 kDa, associée de façon covalente à une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate et une trentaine de kératane sulfate. Il s'associe à l'acide hyaluronique et à une petite glycoprotéine de liaison de façon non covalente, pour former des agrégats de haut poids moléculaire (Dudhia 2005) (*Figure 4*).

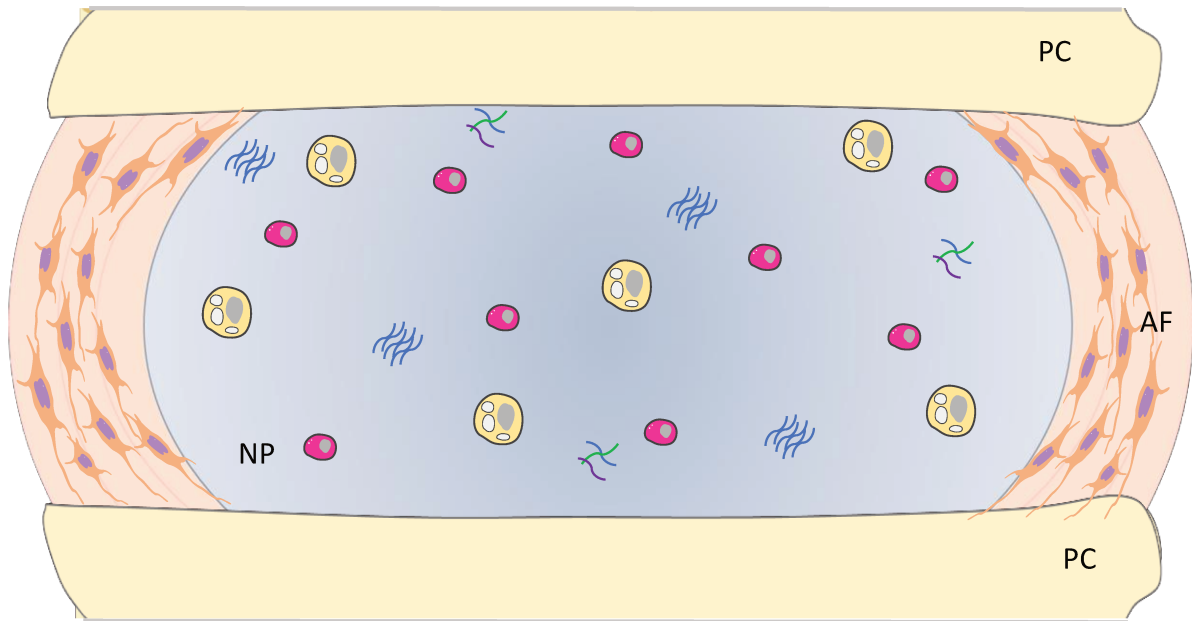


Figure 3 : Représentation schématique de la composition du NP et de l'AF d'un DIV humain juvénile sain.

Dans le NP, coexistent deux types cellulaires : les cellules notochordales (en jaune) et les nucléopulposocytes (en rose), permettant d'assurer l'homéostasie de la MEC et ainsi l'hydratation du NP. Autour du NP, l'AF est une structure très organisée, en lamelles collagéniques concentriques, et composée de cellules fibroblastiques (en orange).

 Composants de la MEC du NP (agrécan, HA et collagène)

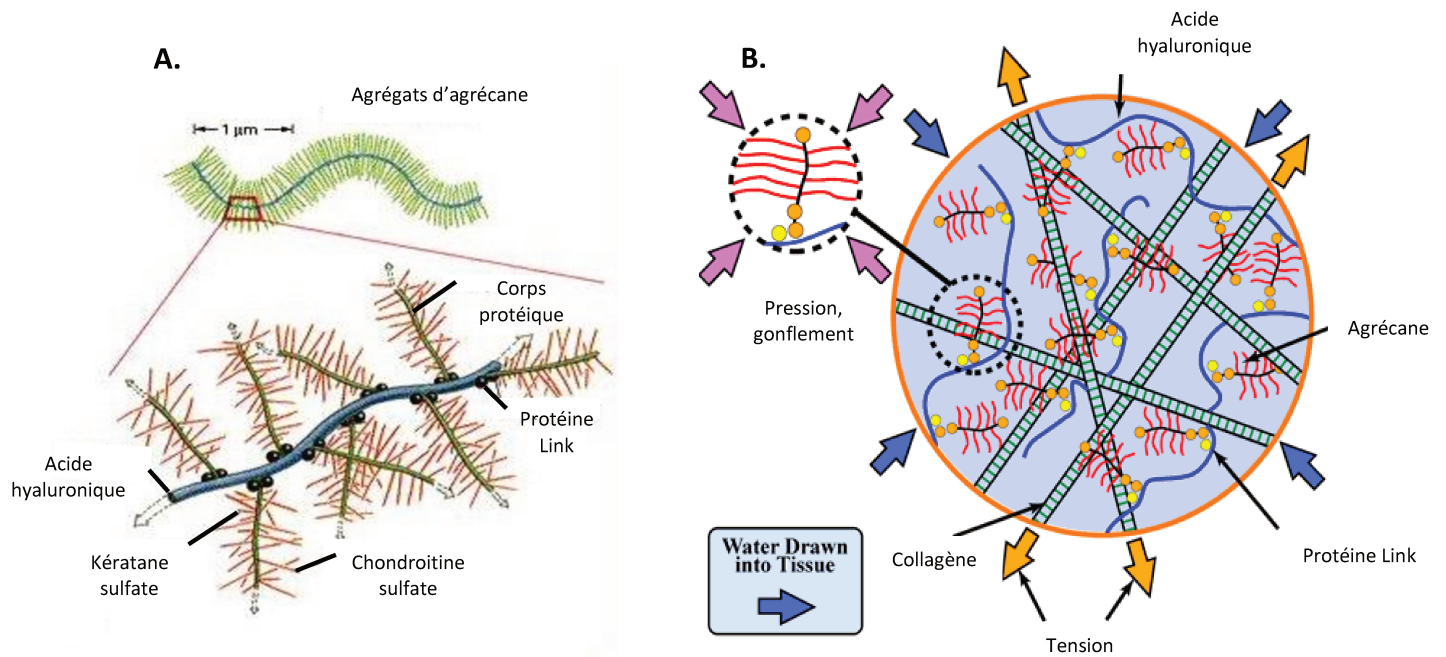


Figure 4 : Structure et organisation des composants de la MEC du noyau pulpeux.

(A) Représentation schématique d'un agrégat d'agrécan associé à une chaîne d'acide hyaluronique (D'après Alberts et al., 2014)(Alberts et al. 2014) ; (B) Représentation schématique de la MEC de type cartilagineuse présente au niveau du NP, elle se compose d'un réseau dense de fibres de collagène, qui constituent la trame fibrillaire, entourées de

substance fondamentale composée essentiellement d'eau et de protéoglycanes (PG). Ces derniers grâce à leur charge nette négative attirent les ions sodium positifs, et donc les molécules d'eau par osmose, permettant alors la formation d'un gel hydraté baignant les cellules (D'après Aggrecan - Link Protein Hyaluronan Aggregates by Timothy E. Hardingham).(Hardingham 1998).

Le complexe agrécane – acide hyaluronique est responsable du caractère hautement hydraté de la MEC du NP. Cela confère aux DIV une forte résistance aux forces de compression et une capacité importante de déformabilité (Colombier et al. 2013). D'autre part, lors de la maturation du tissu discal, l'existence d'un dialogue cellulaire important a été suggérée entre les deux types de cellules du NP, assurant ainsi l'équilibre métabolique de sa MEC (Henry et al. 2014; Christopher J Hunter, Matyas, and Duncan 2004; Aguiar, Johnson, and Oegema 1999). En effet les CNT matures, qui sont les premières présentes, produiraient des signaux paracrines *via* des facteurs comme CTGF/CCN2 (Connective Tissue Growth Factor) et Sonic Hedgehog (Shh) qui favoriseraient alors la prolifération des NPCy et la synthèse des composants matriciels par celles-ci (Erwin et al. 2006; Erwin 2008) (*figure 8*). Ces hypothèses déjà largement admises, suggèreraient donc que ce sont ces relations cellulaires qui seraient à l'origine de l'intégrité matricielle et de l'équilibre homéostatique du NP.

c. L'anneau fibreux ou *Annulus fibrosus*

Entourant le NP, il y a l'Anneau fibreux (AF) qui est constitué d'un réseau de fibres de collagène organisée en 15-25 lamelles concentriques superposées les unes par rapport aux autres, en respectant des angles bien précis (Lee et al. 2007; Girish Pattappa et al. 2012). Au sein d'une même couche, les fibres de collagène sont obliques et orientées d'environ 30 degrés par rapport au plan transverse. L'AF est constitué de cellules fibroblastiques à la densité de 9000 cellules/mm³ qui vont synthétiser une MEC très organisée et riche en collagène, qui est majoritairement de type I (80%) (Rannou, F., P. Poiraudou, M. Corvol 2000; Adams and Roughley 2006) (*Figure 5*). Elle est composée de 60 à 70% d'eau et les collagènes représentent 50 à 70% de son poids sec (Buckwalter, Cooper, and Maynard 1976). Ce sont ces derniers, ainsi que l'organisation en lamelles, qui confèrent au DIV sa résistance aux forces de tension. Cette structure à l'architecture spécifique est divisée en 2 zones : l'AF externe, plus fibreux, mieux ordonné et possédant une résistance supérieure ; et l'AF interne moins organisé et moins rigide (Gluais et al. 2019). La proportion de collagène de type I décroît de l'AF externe vers l'AF interne, tandis que la proportion en eau et collagène de type II, au contraire, augmente de l'AF externe vers l'AF interne (Johnstone et al. 1992). De plus, les cellules de l'AF produisent

de la lubricine, glycoprotéine lubrifiante, au niveau intralamellaire, qui permet la résistance aux contraintes de frottements (Johnstone et al. 1992; Elsaid et al. 2005).

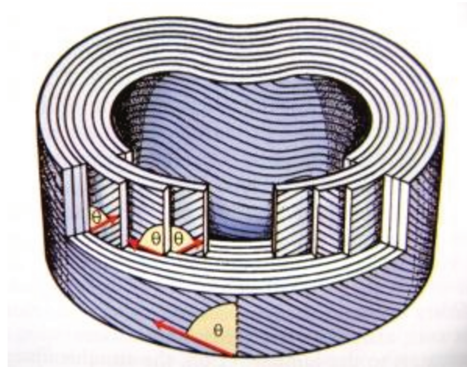


Figure 5 : Représentation schématique de la structure lamellaire complexe de l'AF.

(D'après Neumann, 2010, page 323)(Donald A. Neumann 2010).

d. Fonctions discales

La structure et les fonctions du DIV sont étroitement liées. En effet, c'est grâce à sa structure spécifique que le DIV résiste aux contraintes mécaniques auxquelles il est constamment soumis du fait de sa localisation. Véritable amortisseur fibro-hydraulique, le DIV répartit les chocs et contraintes qu'il reçoit en adaptant sa forme et sa teneur en eau (Takatalo et al. 2011). Les charges sont transférées aux DIV *via* les corps vertébraux qui bordent chaque DIV. Ils dispersent les contraintes vers le NP, qui doit alors être résistant aux forces de compression. Le NP va ensuite transmettre les charges reçues, de manière radiale et tangentielle à l'AF, qui va s'étendre et doit être, quant à lui, résistant aux forces de tension (Donald A. Neumann 2010) (*Figure 6*).

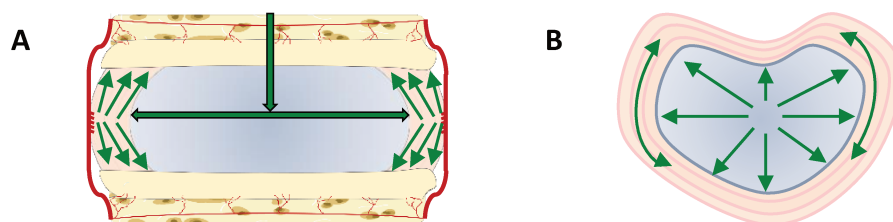


Figure 6 : Représentation schématique de la transmission des forces vers le NP puis à l'AF, lors d'une compression verticale du DIV.

(A) Une diminution de la hauteur du NP est observée, celui-ci essaie de s'étendre contre l'AF et exerce alors une tension au niveau des fibres de collagène de l'AF, (B) cette pression radiale exercée par le NP est rapidement équilibrée par la tension élastique qui se développe dans les fibres de l'AF qui vont ainsi s'allonger. En conséquence, une charge de 40 kg produit, dans un disque sain, seulement 1 mm de compression verticale et 0.5 mm d'expansion radiale (Modifié d'après Neumann, 2010, page 331)(Donald A. Neumann 2010).

Ces capacités de résistance aux contraintes mécaniques sont dues aux propriétés osmotiques qui sont reliées à la composition biologique des structures discales. Le NP, par son aspect gélatineux et sa nature très hydratée, constitue un tissu hautement déformable. Il agit comme

un liquide viscoélastique en absorbant les forces de compression par variation de pression osmotique, entraînant alors des modifications de la hauteur discale. La teneur en eau de la MEC du NP varie selon les positions et les contraintes auxquelles est soumis le corps humain. En effet, en position allongée le DIV reprend de la hauteur en se gorgeant d'eau, tandis qu'en position debout et/ou en cas de contrainte prolongée le NP perd de sa teneur en eau et présente alors une diminution de sa hauteur (Johnstone et al. 1992). D'un autre côté, l'organisation lamellaire et concentrique des fibres de collagène de l'AF, lui offre quant à elle, une aptitude à se fléchir, se tordre ou encore à résister au cisaillement. Ces modifications de la hauteur discale sont le résultat de l'osmorégulation de la MEC du NP, jusqu'à obtention d'un nouvel équilibre osmotique. Les protéoglycanes matriciels sont particulièrement impliqués dans ces processus osmotiques (Adams and Roughley 2006). Dans ce contexte, la qualité structurelle de la MEC du DIV conditionne sa bonne résistance aux contraintes qu'il subit. De plus, ces contraintes mécaniques agissent également au niveau des cellules discales entraînant une réponse biologique de celles-ci, variant en fonction du type de contrainte appliquée (magnitude, durée, fréquence, point d'impact) (Masuoka et al. 2007). De récentes études sur les mécanismes de mécanotransduction au niveau cellulaire ont mis en avant l'importance de certains récepteurs transmembranaires, tels que les intégrines (Christine Lyn Le Maitre et al. 2009). D'autres études ont, quant à elles, exploré le rôle joué par le cytosquelette dans la mécanotransduction discale suggérant des différences d'architecture, d'expression génique et protéique des trois éléments principaux du cytosquelette, i) l'actine, ii) la tubuline et iii) la vimentine. Ainsi, la β -tubuline et la vimentine joueraient un rôle dans la résistance aux forces de compression, tandis que la β -actine serait davantage impliquée dans la résistance aux forces de tension (S. Li, Duance, and Blain 2008). Ces mécanorécepteurs renseignent les cellules sur l'intensité et la durée des contraintes et déclenchent des réactions appropriées (S. P. Roberts et al. 1995).

B. La dégénérescence discale

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il est estimé que 40% des douleurs lombaires chroniques proviennent de la dégénérescence discale. Il s'agit de lombalgies discogéniques (Cheung et al. 2009; Andersson 1999; Borenstein 2013). Il faut cependant noter que la lombalgie est un symptôme provenant de causes variées (Valat, Rozenberg, and Bellaïche 2010). L'origine multifactorielle de la dégénérescence discale lombaire est aujourd'hui bien

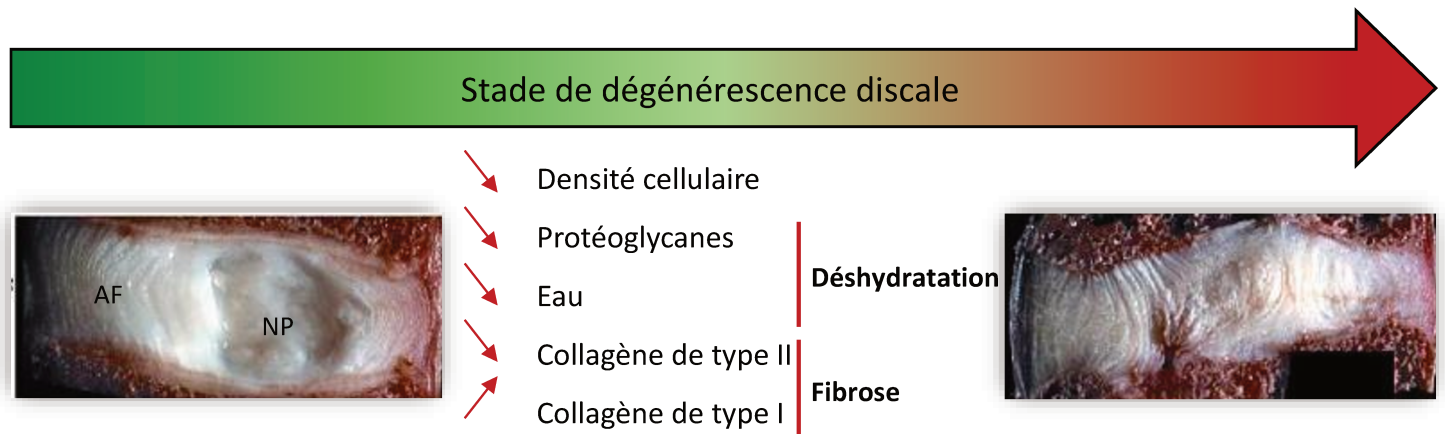
décrite, avec des composantes génétique, biomécanique et environnementale (Andersson 1999). En effet le polymorphisme génétique pourrait avoir un rôle non négligeable dans la mise en place de ce processus de dégénérescence, comme notamment l'implication suggérée du gène codant pour le récepteur de la vitamine D, essentiel dans le remodelage osseux et le maintien de l'intégrité du squelette (Videman et al. 2001; Yoshiharu Kawaguchi et al. 2002; Livshits et al. 2011). De plus, des études réalisées sur des jumeaux, ont mis en évidence l'impact du polymorphisme génétique sur l'apparition de la dégénérescence discale (Battié et al. 2009). Cet impact, qui pourrait être de 75%, touche en majorité les gènes codant pour des protéines constitutives de la MEC discale, telles que l'agrécan et les collagènes de type I et II (Y Kawaguchi et al. 1999; Pluijm et al. 2004; S. W. Li et al. 1995). Cependant, au vu de l'ampleur des effets de la dégénérescence discale, il paraît peu probable qu'un seul gène soit en cause dans la mise en place de cette affection. Celle-ci peut clairement être considérée comme une maladie multigénique associée à d'autres facteurs de risques notamment non-génétiques. En effet, la prévalence de la lombalgie discogénique peut également être augmentée par des facteurs environnementaux et biomécaniques tels que le tabagisme, la catégorie socio-professionnelle, ou encore la sédentarisation. De plus, certaines maladies métaboliques dont l'obésité, l'athérosclérose ou encore les troubles hormonaux sont aujourd'hui considérées comme étant des facteurs de risque pouvant augmenter le développement de la DDL (Ain et al. 2012; Kauppila 2009). Enfin, les infections bactériennes semblent également être impliquées dans la mise en place de ce processus et particulièrement dans l'apparition des symptômes de DIV dégénérés douloureux (Arndt et al. 2012; Hadjipavlou et al. 2008). Cliniquement, les lombalgies discogéniques se manifestent par des douleurs et des fourmillements rachidiens, une perte de la sensibilité ou encore des difficultés de dextérité manuelle ou locomotrice (Luoma et al. 2000). A un stade plus tardif, cette dégénérescence discale peut se manifester par des radiculopathies (atteintes des racines nerveuses de la colonne vertébrale), des sténoses (rétrécissement du canal lombaire), ou des hernies (saillie d'une portion d'un DIV) (Adams et al. 2015). D'un point de vue moléculaire, les lombalgies discogéniques se caractérisent par une décellularisation du NP combinée à une atteinte quantitative et qualitative de sa MEC. Ces modifications biologiques entraînent une diminution des capacités de résistance du NP aux contraintes mécaniques, pouvant induire dans les cas les plus extrêmes, une altération de l'AF (Vergroesen et al. 2015; Adams et al.

2015). Même si ces phénomènes physiopathologiques restent des hypothèses, ils sont aujourd'hui largement suggérés dans la littérature.

Physiopathologie de la dégénérescence discale

Le DIV voit ses capacités de résistance aux contraintes mécaniques diminuer avec l'âge, les DIV plus touchés étant ceux de la région lombaire. Dégénérescence discale et vieillissement sont souvent assimilés cependant une distinction entre ces deux événements a été proposée par Adams et Roughley en 2006, basée sur le délai d'apparition des modifications structurales résultant de chacun de ces phénomènes (Adams and Roughley 2006; Sally Roberts et al. 2006; Adams et al. 2015). La dégénérescence apparaît de façon accélérée et est actuellement définie comme étant une situation pathologique due à une réponse aberrante des cellules du DIV à la suite de phénomènes traumatiques et/ou inflammatoires. Le vieillissement correspond au contraire à un processus progressif et physiologique de l'évolution du DIV. Ces deux phénomènes peuvent également être distingués en étudiant les mécanismes de sénescence cellulaire impliqués dans chacun de ces cas (Freemont 2009). En effet, des études ont démontré l'existence de deux mécanismes distincts de sénescence cellulaire. La « sénescence répllicative » qui est un phénomène naturel et inéluctable dû aux divisions cellulaires successives entraînant un raccourcissement des télomères au niveau des chromosomes ; et la « sénescence prématurée » induite par le stress oxydatif ou en réponse à plusieurs facteurs tels que les cytokines (Freemont 2009). Ce dernier mécanisme, mis en évidence par la présence des marqueurs p16 et p21, est retrouvé préférentiellement au sein des DIV dégénérés et entraîne une accélération du vieillissement discal (Christine L. Le Maitre, Hoyland, and Freemont 2007; Kim et al. 2009; Helen E Gruber et al. 2007). Ainsi, les mécanismes de dégénérescence discale, qu'ils soient dus au vieillissement ou pathologiques, résulteraient notamment d'un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme, entraînant alors la production notamment de cytokines pro-inflammatoires et la dégradation de la MEC discale (Risbud and Shapiro 2013; Henry et al. 2014; Clouet et al. 2009; Vo et al. 2013). Le NP dégénéré perd progressivement son aspect gélatineux et subit plusieurs remaniements morphologiques liés à des modifications structurales de sa MEC (Sally Roberts et al. 2006; Hadjipavlou et al. 2008). Il a été suggéré que lors d'une DDL la densité cellulaire du NP dégénéré diminuait de manière importante et cette diminution serait accompagnée d'une atteinte qualitative et quantitative des composants de sa MEC. La quantité en PG chute ce qui conduit à une

déshydratation du NP associée à une baisse de la pression osmotique. Il a également été rapporté que la quantité de fibres de collagène de type II diminue progressivement tandis que des fibres de collagène de type I augmente conduisant à une fibrose du NP (*Figure 7*). Ces atteintes cellulaires et moléculaires diminuent les capacités du DIV à résister aux contraintes mécaniques et provoquent ainsi l'apparition potentielle des symptômes douloureux associés (Vergroesen et al. 2015).



***Figure 7 :** Changements morphologiques et structuraux qui se mettent en place lors d'une dégénérescence discale et représentation schématique des modifications de la MEC du NP.
(Modifié d'après Adams et al., 2015) (Adams et al. 2015).*

Comme indiqué précédemment, l'existence d'un dialogue cellulaire entre les CNT et NPCy a fait l'objet d'investigations (Merceron et al. 2014; Erwin et al. 2006; Erwin 2008; C.J. Hunter, Matyas, and Duncan 2003). Plusieurs études ont récemment suggéré que la rupture de ce dialogue cellulaire serait largement impliquée dans les processus de mise en place de la DD. Cette interruption du dialogue cellulaire entre les CNT et les NPCy pourrait alors jouer un rôle non négligeable dans la mise en place des changements dégénératifs qui s'en suivent. En effet, après la naissance, les CNT jouent notamment un rôle protecteur important envers les NPCy, en les protégeant de la mort cellulaire apoptotique par la sécrétion des facteurs spécifiques suivants : CTGF, Shh et TGF- β (Transforming Growth Factor) (*Figure 8*).

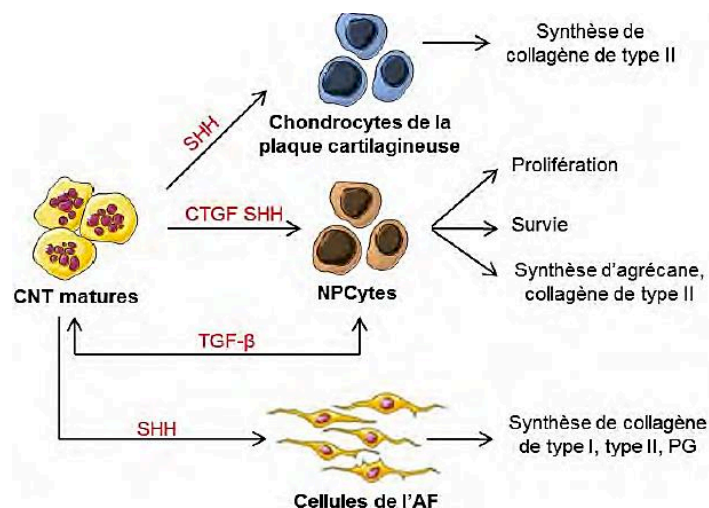


Figure 8 : Dialogue moléculaire supposé entre les CNT et les NPCy.

Schéma récapitulatif des facteurs sécrétés par les CNT et réponse des différentes cellules discales. Abréviations : PG : protéoglycane ; Shh : Sonic Hedgehog ; CTGF : Connective Tissue Growth Factor ; TGF-β : Transforming Growth Factor ; CNT : Cellules Notochordales ; NPCytes : Nucléopulpocytes. (D'après la thèse de doctorat de Pauline Colombier, 2016) (Colombier 2016).

Ainsi, aujourd'hui une des hypothèses principales quant à la mise en place des processus dégénératifs discaux concernerait l'implication de la rupture de ce dialogue cellulaire, déjà démontré comme responsable de la maturation du DIV. Il est suggéré que cette communication entre les CNT et les NPCy serait fortement impliquée dans l'homéostasie discale et que la dérégulation de celle-ci serait à l'origine d'une cascade d'évènements dégénératifs au sein de ce tissu conduisant à sa dégénérescence. En parallèle, d'autres hypothèses évoquent quant à elles le rôle joué par certains facteurs discaux non régulés par le dialogue cellulaire. En effet, les facteurs de la famille des Bone morphogenetic protein (BPM-2, BMP-7) et le Growth differentiation factor 5 (GDF-5), seraient impliqués dans les modifications matricielles mises en place au cours de la dégénérescence (Takae et al. 1999; Than et al. 2012; C. Feng et al. 2015). Le GDF-5, qui promeut la synthèse des composants de la MEC du NP et inhibe l'expression de certaines MMPs, est inhibé par les cytokines pro-inflammatoires TNF-α et l'IL-β présentes lors de la DD (C. Feng et al. 2015; Christine L Le Maitre, Freemont, and Hoyland 2009). L'inhibition de son action pourrait alors jouer un rôle dans l'atteinte de la MEC discale (Maier and Harfe 2011) (*Figure 10*).

Le NP n'est pas le seul élément atteint lors d'une dégénérescence du DIV. Effectivement la MEC de l'AF est également altérée. Ces fibres de collagène deviennent plus irrégulières et fines, fragilisant ainsi l'ensemble de la structure. Un déchirement de l'AF, allant, dans certains cas, jusqu'à l'expulsion du NP (hernie discale) peut ainsi être observé. Cette protrusion du NP peut être source d'importantes douleurs ressenties par le patient, dues au pincement des

nerfs environnants (Gluais et al. 2019). En parallèle, ces modifications matricielles vont entraîner un bouleversement de la répartition des contraintes mécaniques, ressenties par les cellules de l'AF *via* leurs mécanorécepteurs de surface, il en résulte alors une apoptose cellulaire (Leung et al. 2009; Rannou et al. 2004). La frontière entre le NP et l'AF disparaît alors progressivement. L'ensemble de ces mécanismes de dégénérescence met en avant le lien primordial qui existe entre les structures cellulaires et matricielles du DIV, ainsi que la relation étroite entre ses différentes régions, leurs aspects et les fonctions de ce tissu unique. Comme nous l'avons décrit précédemment, l'atteinte qualitative et quantitative de la MEC discale est en grande partie responsable de l'état de dégénérescence d'un DIV. Un des éléments clefs de la mise en place de ce processus provient de la rupture de l'homéostasie métabolique du DIV. En effet, au sein d'un DIV sain un équilibre métabolique compensant anabolisme et catabolisme assure l'intégrité du tissu discal (*Figure 9*). Le rôle de différents facteurs initiateurs anaboliques et/ou cataboliques dans la mise en place du mécanisme de dégénérescence du DIV a été mis en évidence lors d'études *in vitro*.

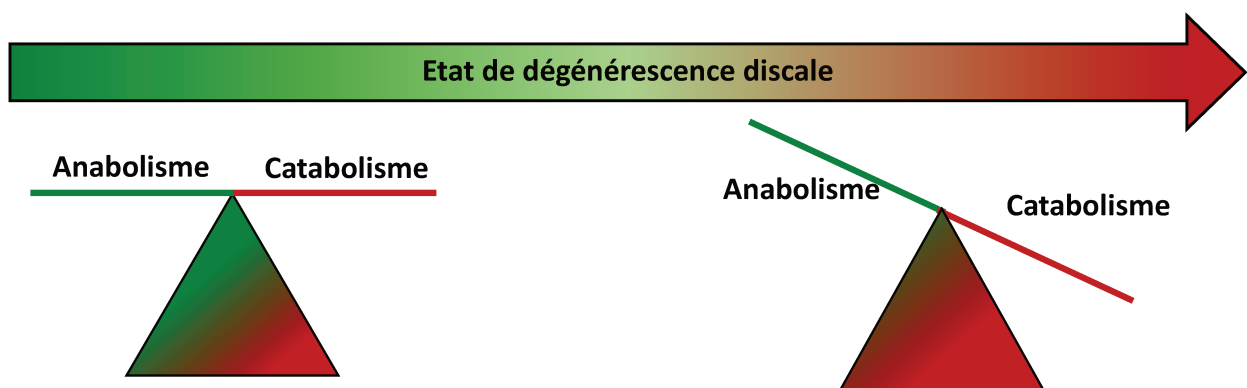


Figure 9 : Déséquilibre de la balance anabolisme / catabolisme lors de la mise en place des processus de dégénérescence discale.

Les facteurs anaboliques, qui activent la synthèse moléculaire, retrouvés au sein des DIV dégénérés sont essentiellement des cytokines et des membres de la superfamille du TGF- β . Ces mêmes facteurs sont classiquement utilisés lors d'étapes de différenciation chondrogénique *in vitro*, en raison de leur capacité à stimuler l'expression de collagène de type II et de PG (TGF- β , BMP-2 et 1, CIMP-1 (CpG island methylator phenotype))(Yoon and Patel 2006). Quant aux facteurs cataboliques, responsables de la dégradation moléculaire, la surexpression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α et β (interleukin) et TNF- α (Tumor Necrosis Factor)) lors de la dégénérescence discale est observée. Cette surexpression entraîne alors une augmentation du taux de production d'enzymes cataboliques (MMP-1, -2,-7,-8,-9,-10,-13,-14, et ADAMTS (agrécane)-1,-4,-5,-9 et -15) par les cellules discales (Kalson,

Richardson, and Hoyland 2008; Weiler et al. 2002; Rutges et al. 2008; S Roberts et al. 2000). Ces cytokines pro-inflammatoires inhibent également l'activation des TIMPS, inhibiteur physiologique des MMPs (*Figure 10*). L'apparition de néo-vaisseaux et de nerfs au sein du tissu discal est également un élément clef de la dégénérescence du DIV. Il a été démontré notamment que le TNF α stimule la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) responsable de l'apparition de nouveaux vaisseaux au sein du DIV (Ohba et al. 2009). Par ailleurs, une néo-innervation, due à l'activation de la neurogénèse *via* la stimulation de NGF par certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6,-8 et Prostaglandines E2), a récemment été décelée. Cette neurogénèse entraînant une perte du caractère non-innervé spécifique du DIV et est en partie responsable, par sécrétion de la substance P, de l'inflammation et des douleurs liées à la lombalgie discogénique (Freemont 2009; Pockert et al. 2009) (*Figure 10*).

Autre élément à prendre en compte, le rôle des plateaux cartilagineux (PC) dans le processus de dégénérescence discale est aujourd'hui à considérer. En effet, les chondrocytes de la plaque cartilagineuse vont se différencier, devenant hypertrophiques. Une calcification des PC est ainsi observée (Aigner et al. 1998; Paietta, Burger, and Ferguson 2013; Huang, Urban, and Luk 2014). La diminution du réseau capillaire et du nombre de pores, altère alors les capacités de nutrition, d'oxygénation et d'évacuation des métabolites, au sein du tissu discal. Ceci peut notamment induire une diminution de la densité cellulaire et la perte de la capacité des cellules à répondre aux contraintes mécaniques subies (Hee et al. 2011; Horner and Urban 2001; Ishii et al. 1991). De plus, l'accumulation des déchets métaboliques va entraîner une acidification du milieu discal, ce qui va impacter la survie de cellules et stimuler l'activation des MMP-3, jouant un rôle primordial dans la dégradation de la MEC résidente (Gunja-Smith and Woessner 1993). L'ensemble de ces modifications du microenvironnement discal engendre un stress cellulaire qui se manifeste par diverses réponses cellulaires telles que l'apoptose, la sénescence et l'autophagie, qui font actuellement l'objet de diverses études afin d'approfondir nos connaissances quant à l'implication de ces activités cellulaires sur la progression de la dégénérescence discale (Rannou et al. 2004; Campisi et al. 2011; Helen E Gruber et al. 2015) (*Figure 10*).

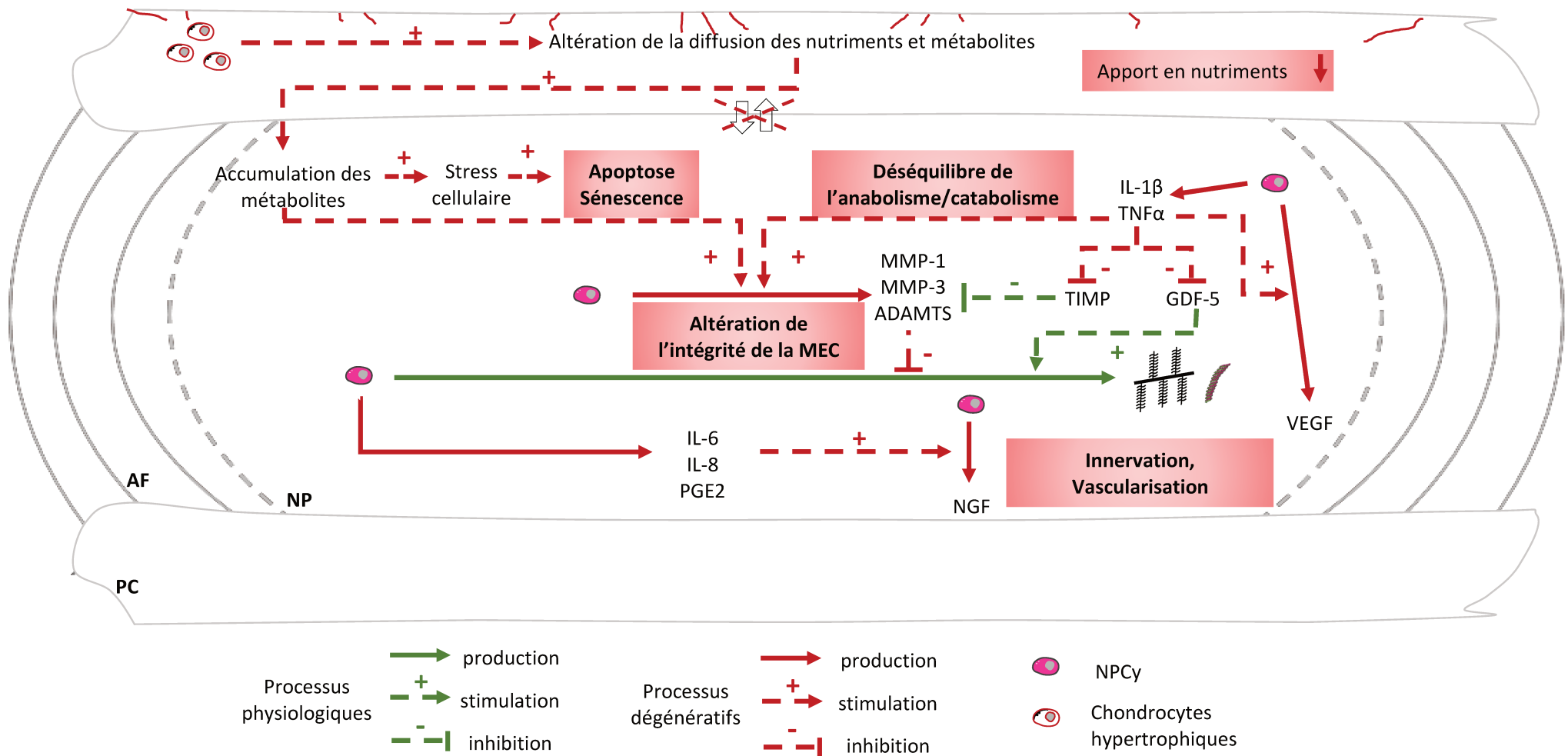


Figure 10 : Cascades physiopathologiques de la dégénérescence discale.

Le dérèglement de l'homéostasie est un élément clé de la dégénérescence des DIV, avec une diminution significative du nombre de nucléopulposocytes (NPCy) combinée à des changements qualitatifs et quantitatifs des composants de la MEC du NP. La calcification des PC entrave les voies de diffusion, diminuant ainsi l'apport de nutriments aux cellules discales, entraînant en fin de compte, la sénescence et l'apoptose de ces dernières. En parallèle, les NPCy produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL- β et TNF- α) qui stimulent la synthèse des MMP et des ADAMTS, inhibant quant à eux la production des composants de la MEC du NP. D'autre part, la surexpression des IL-6, IL-8 et du PGE2 par les NPCy stimule l'innervation et la vascularisation par augmentation des facteurs respectifs NGF et VEGF, générant ainsi les douleurs discales. Les processus de dégénérescence constituent donc un cercle vicieux qui s'auto-entretient et amplifie la dégénérescence.

Le phénomène de dégénérescence discale met en jeu une multitude de mécanismes cellulaires, qui conduisent à une altération de la production de la MEC discale, une activité enzymatique anormale, ainsi qu'à une surexpression de substances pro-inflammatoires. Ce profond déséquilibre de l'homéostasie discale bouleverse les interactions primordiales entre les cellules et les constituants de la MEC, entraînant un cercle vicieux (*Buttle et al, Biochem Soc Trans, 2007*). Ainsi, comme pour de nombreuses maladies dégénératives l'hypothèse qu'une cellule « malade » pourrait conduire à la formation d'une MEC « malade », et qu'une MEC « malade » conduira à une atteinte cellulaire à plus ou moins long terme est souvent émise (*Buttle 2007*).

La dégénérescence discale est relativement complexe, impliquant un nombre important de mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de modifications d'ordres morphologique, physique et mécanique. Même si ces dernières années nos connaissances relatives à la physiopathologie discale ont progressé rapidement, il reste encore de nombreux points à approfondir afin de maîtriser l'ensemble des phénomènes menant à la compréhension du processus menant à la dégénérescence du tissu discal. De plus, la caractéristique du DIV d'être non vascularisé et non innervé lui donne un potentiel d'auto-guérison très limité. Actuellement, différentes prises en charges thérapeutiques des patients lombalgiques sont mises en place. La prise en compte de son étiologie semble être la clef de sa guérison.

Diagnostic

La dégénérescence discale peut se manifester par une douleur ou une gêne fonctionnelle ressentie entre la douzième côte et le pli fessier, associée dans certains cas à des irradiations dans les membres inférieurs (Valat, Rozenberg, and Bellaïche 2010). Ces douleurs se manifestent essentiellement au niveau des étages L4-L5 et L5-S1. Le diagnostic des lombalgies discogéniques se fait à la suite de douleurs lombaires ressenties par le patient, puis par différentes techniques d'imagerie complémentaires les unes des autres : i) la radiographie, qui va permettre d'apprécier la hauteur discale et la calcification intradiscale ; ii) le scanner, qui permet d'évaluer la morphologie du DIV et son hypodensité ; iii) et l'imagerie à résonance magnétique (IRM), qui permet, par visualisation d'un contraste important, de différencier le tissu discal sain du dégénéré. Les séquences T1 et T2 à l'IRM permettent d'estimer respectivement les modifications au niveau des plateaux cartilagineux et l'état d'hydratation du DIV. L'association des séquences T1 et T2 permet de définir la classification de Modic, qui distingue 3 stades de dégénérescence discale (Modic et al. 1988) et qui permet aux cliniciens de distinguer les patients symptomatiques des patients asymptomatiques (*Figure 11*). Le diagnostic de la DD peut également se faire par l'interprétation du score de Pfirrmann, qui permet de grader l'intensité de la DD (*Figure 12*). Ce score est basé sur l'association du signal T2, la couleur du NP, la distinction entre le NP et l'AF, et la hauteur discale (Pfirrmann et al. 2001). En effet, les modifications morphologiques et structurales, précédemment évoquées, qui interviennent au cours de la physiopathologie de la DD, sont responsables entre autres d'une déshydratation massive du NP. Cette déshydratation engendre des conséquences physiques visibles par les techniques d'imagerie. Ainsi, la déshydratation du NP va entraîner une diminution de la hauteur discale observable en radiographie (Anderson and Tannoury 2005).

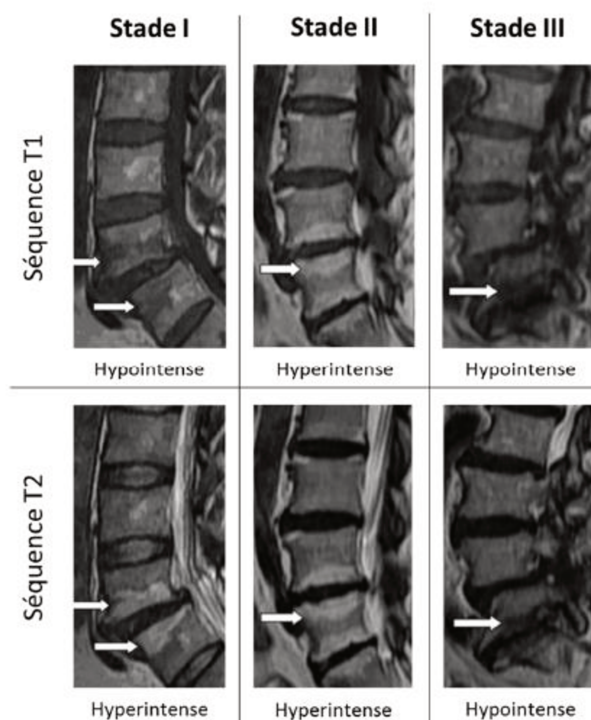


Figure 11 : Classification de Modic de la dégénérescence discale basée sur l'IRM.
(d'après (Y. H. Zhang et al. 2008))

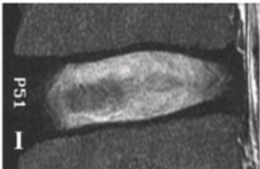
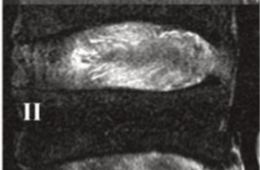
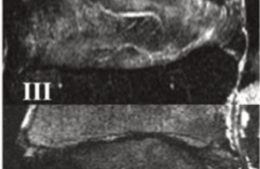
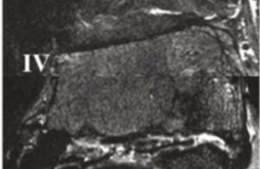
Grade de Pfirrmann (IRM)	Grade	Structure	Distinction AF/NP	Intensité du signal	Hauteur discale
	I	Homogène blanche brillante	Nette	Hyper-intense	Normale
	II	Inhomogène +/- barres horizontales	Nette	Hyper-intense	Normale
	III	Inhomogène gris	Difficile	Intermédiaire	Normale à légèrement diminuée
	IV	Inhomogènes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

Figure 12 : Classification de Pfirrmann de la dégénérescence discale basée sur l'IRM.
(d'après Pfirrmann et al., 2001(Pfirrmann et al. 2001) et (Y. Zhang et al. 2011))

A la suite du diagnostic de lombalgie discogénique, des prises en charge thérapeutiques sont alors mises en place, permettant de diminuer la douleur engendrée par cette maladie. La prise en charge thérapeutique actuelle des DDL, principalement fondée sur des approches médicamenteuses ou chirurgicales, reste cependant très limitée car elle vise essentiellement le soulagement de la douleur sans s'attaquer à l'origine de la maladie. Après une vue d'ensemble des traitements disponibles et utilisés de nos jours, nous nous intéresserons plus particulièrement aux approches innovantes en cours de développement, qui permettraient une régénérescence du DIV dégénéré et ainsi une restauration de l'intégrité du tissu discal et de ses fonctions mécaniques, essentielles pour la mobilité rachidienne.

C. La prise en charge actuelle de la dégénérescence discale et des douleurs lombaires

Epidémiologie et recueil des douleurs lombaires

Les douleurs de dos sont, de nos jours, un problème de santé publique majeur dans les sociétés industrielles occidentales (Urban and Roberts 2003). La prévalence annuelle des lombalgies, estimées comme l'un des symptômes les plus communs de nos sociétés modernes, est évaluée à au moins, 50% (Adams and Roughley 2006). Cette valeur varie selon les études en raison de la définition même de la lombalgie, des méthodes d'évaluation, de la période de prévalence ou encore de la nature de la population étudiée (Dionne, Dunn, and Croft 2006; Jeffries, Milanese, and Grimmer-Somers 2007). Néanmoins, il a été calculé, de manière unanime, que 80% de la population mondiale est ou sera touchée à un moment ou un autre de la vie, par ce phénomène de lombalgie. Depuis quelques années, ces chiffres ne cessent de croître au regard du vieillissement actuel de la population mondiale. Les femmes semblent davantage touchées par ces douleurs que les hommes, et les enfants et adolescents sont également touchés par ces douleurs lombaires invalidantes (Hoy et al. 2014; Pellisé et al. 2009). Déjà très fréquentes au sein de la population générale, les lombalgies le sont encore davantage dans des populations professionnellement exposées à des facteurs de risque spécifiques. Il s'agit notamment de personnes exerçant des travaux exigeant des efforts physiques importants et répétés, des activités impliquant des postures fatigantes ou prolongées, ou encore des professions entraînant une exposition durable du corps à des vibrations (conducteurs d'engins). Les résultats des enquêtes menées sur la population française générale sont comparables aux données des études menées dans d'autres pays. Il faut garder cependant en mémoire que la douleur ne peut être évaluée par le praticien qu'à

la suite d'une description subjective par le patient. Ce caractère subjectif du recueil de la douleur rend son analyse par le praticien compliqué, et ce d'autant plus si l'évaluation de cette douleur se fait dans le temps. C'est également à l'aide de questionnaires rétrospectifs que les douleurs lombaires peuvent être étudiées. L'analyse de ces questionnaires permet par la suite de mettre en évidence plusieurs paramètres pouvant avoir un impact sur l'évolution des douleurs et ainsi identifier les facteurs de risques potentiels. Cependant, en 2007, Schwarz et ses collaborateurs ont décrit le phénomène de « memory decay », suggérant une dégradation importante de la mémoire des douleurs dans le temps, remettant alors en cause la fiabilité de ce type de questionnaire pour un recensement de qualité concernant les douleurs passées (Schwarz 2007). Dans ce contexte, un nouveau type de suivi, encore peu utilisé, est apparu récemment, avec le « Short Message Service » (SMS) permettant de pallier la dégradation progressive de la mémoire des douleurs. En effet ce type de recensement de la douleur est basé sur l'envoi de questions courtes par SMS automatiques à intervalles réguliers (par exemple un par semaine), permettant ainsi le recueil de la douleur « instantanée » sur une longue période (Kongsted and Leboeuf-Yde 2009). Cependant ce suivi par SMS présente également des contraintes, notamment par le contenu limité des questions.

Cout de la prise en charge

La lombalgie, reconnue comme le mal du XXI^e siècle par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), représente la seconde cause de consultation médicale dans les pays industrialisés (derrière les troubles cardiaques) (W. J. Wang et al. 2015). Les difficultés, voire l'incapacité, qu'elle entraîne, à se mouvoir, est la cause de nombreux soins et d'arrêts de travail fréquents, répétés ou prolongés, souvent accompagnés de retentissements psychologiques et sociaux. Les douleurs lombaires sont reconnues comme étant parmi les affections les plus coûteuses pour la sécurité sociale (Hoy et al. 2014). La prise en charge des patients lombalgiques constitue donc un enjeu socio-économique majeur. Ce mal d'origine multifactoriel est associé dans 40% des cas à une dégénérescence discale (Henry et al. 2018). Ce type de lombalgies, appelé lombalgies discogéniques, affectent environ 600 millions de personnes dans le monde (Vos et al. 2012). Les coûts annuels de la prise en charge thérapeutique et des arrêts de travail fréquents qu'engendrent ces douleurs lombaires d'origine discale, s'élèvent à 90 milliards de Dollars aux Etats-Unis et à 2 milliards d'Euros en France, d'après une étude réalisée en 2012

par la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (Martin et al. 2008; Anaes 2000).

Recommandations et prise en charge actuelle

Le plus souvent, le traitement de la lombalgie discogénique est prescrit sur de longues durées. En effet, 10% des lombalgies deviennent chroniques. La prise en charge actuelle reste uniquement symptomatique, car aucune des alternatives thérapeutiques disponibles ne permet de soigner la cause de ces douleurs lombaires. Leur traitement actuel a donc pour objectif de soulager la douleur, minimiser la gêne fonctionnelle et améliorer la qualité de vie des patients. Les recommandations de l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé) depuis 2000 concernant les patients atteints de lombalgies chroniques insistent sur l'importance d'une prise en charge complète et multidisciplinaire (Anaes 2000). Celle-ci repose sur l'utilisation de traitements non pharmacologiques (perte de poids, pratique d'une activité sportive régulière...), de traitements pharmacologiques (antalgiques, anti-inflammatoires...) et chirurgicaux (arthrodèse, arthroplastie...).

Ces dernières années, l'émergence d'un nouveau type de thérapies est à prendre en compte dans la prise en charge des lombalgies. Il s'agit notamment de la massothérapie, la balnéothérapie, l'acupuncture ou encore la stimulation électrique nerveuse transcutanée (TENS) (Andronis et al. 2017).

a. Traitements non pharmacologiques

Il est classiquement préconisé une diminution du surpoids, la réalisation d'exercices physiques adaptés et réguliers ainsi qu'une mobilité quotidienne. La manipulation vertébrale a été démontrée ces dernières années comme étant efficace à court terme dans le soulagement de la douleur.

- La perte de poids : l'obésité est un facteur favorable au développement accéléré de la dégénérescence discale par l'augmentation du stress mécanique imposé aux DIV lors des mouvements de l'ensemble du corps. De plus, dans la physiopathologie de l'arthrose, les adipokines sécrétées par le tissu adipeux stimulent la dégradation du cartilage articulaire, celles-ci pourraient alors avoir une action similaire dans le cas d'une DDL au niveau des plateaux cartilagineux (Berenbaum and Sellam 2008; Toussiot, Streit, and Wendling 2007).

- La pratique sportive: il est actuellement admis que la pratique d'une activité sportive modérée et régulière améliore à la fois la douleur et la fonctionnalité discale chez le patient lombalgique (Williams et al. 1991).
- La kinésithérapie : la rééducation est recommandée, car elle peut permettre de diminuer les douleurs, grâce à des massages ou à l'application de chaleur sur l'articulation. Elle permet aussi de récupérer une certaine mobilité, en augmentant la souplesse, et permet de renforcer les muscles à proximité du DIV.

b. Traitements pharmacologiques

Ces règles hygiéno-diététiques sont le plus souvent associées à un traitement pharmacologique basé sur l'utilisation d'anti-inflammatoires (AI) et d'antalgiques qui peuvent être administrés par voie orale, transdermale ou par injection. Parmi les anti-inflammatoires utilisés dans le but de soulager les douleurs lombaires, on retrouve i) des AI stéroïdiens (AIS) et ii) non stéroïdiens (AINS), iii) des opiacés ainsi que iv) des myorelaxants (Airaksinen et al. 2006; Chou et al. 2007). Les stéroïdes et corticostéroïdes (Méthyl-prednisolone, Hydrocortisone, Triamcinolone et Dexaméthasone) sont des petites molécules hormonales qui peuvent être injectées par voie épidurale, directement au niveau du DIV inflammé. Ils ont une action efficace et immédiate en inhibant la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, et présentent également une activité immunosuppressive (Stafford, Peng, and Hill 2007). Les AINS (diclofenac, kétoprofène, ibuprofène, naproxène, célécoxib et étoricoxib) qui inhibent la cyclo-oxygénase agissent comme un traitement conservateur (Blanquer, Grijpma, and Poot 2015). Il s'agit de la prise en charge *per os* la plus couramment prescrite pour soulager des douleurs lombaires à court terme (Kuritzky and Samraj 2012). Les opioïdes, molécules psychoactives agissant sur le système nerveux central et périphérique, peuvent également être prescrits afin d'obtenir un effet analgésique, à la suite d'une administration orale, parentérale ou transdermale. Deux types d'opioïdes peuvent être utilisés, les opioïdes faibles en première intention, tel que le tramadol, puis en seconde intention les opioïdes forts de types morphiniques, tels que l'oxycodone, l'hydromorphone, ou la buprénorphine (Gordon et al. 2010; Khoromi et al. 2007; Schnitzer et al. 2000). Malgré leur efficacité démontrée dans la prise en charge des douleurs lombaires chroniques non spécifiques et des douleurs neuropathiques, les risques d'addiction résultant de leur administration ne sont pas à négliger. Enfin, ces thérapies analgésiques peuvent être supplémentées par des myorelaxants

(benzodiazépines), présentant des propriétés antispasmodiques, permettant de soulager les douleurs lombaires non spécifiques (Van Tulder et al. 2003). Concernant l'ensemble de ces médicaments, il s'agit de traitements pharmacologiques *per os*, de courte durée, de première intention et ne visant qu'au soulagement de la douleur et à la diminution des symptômes. Certains AIS et AINS peuvent également être injectés localement. Ces divers traitements pharmacologiques conventionnels peuvent être initiés aux différents stades de dégénérescence discale, afin de réduire l'inflammation et la douleur (Airaksinen et al. 2006). Il est à retenir que l'ensemble de ces traitements pharmacologiques sont fortement limités par la répétition nécessaire des prises et injections du fait de la courte demi-vie de toutes ces molécules. De plus, ces injections thérapeutiques se font dans des zones relativement fragiles, du fait de la proximité de la moelle épinière notamment et de par la présence de gros vaisseaux environnants. La répétition des injections est donc à éviter le plus possible car chaque injection épidurale reste une intervention délicate.

c. Traitements chirurgicaux

Dans les cas où les douleurs récidivent et que les traitements conservateurs cités ci-dessus ne sont pas ou plus suffisants pour subvenir à la perte des fonctions discales, un traitement chirurgical est alors mis en place. Principalement, deux approches chirurgicales peuvent alors être envisagées afin de traiter les dégénérescences discales symptomatiques réfractaires aux traitements pharmacologiques : l'arthrodèse et l'arthroplastie (*Figure 13*). L'arthrodèse lombaire (« gold standard » ou traitement de référence) est une intervention chirurgicale consistant à fusionner les deux vertèbres bordant le DIV dégénéré, afin d'immobiliser définitivement l'articulation intervertébrale et ainsi pallier aux douleurs lombaires (Martin et al. 2007). Des cages de fusion sont utilisées depuis plusieurs années, et permettent de respecter les contraintes mécaniques au niveau des vertèbres adjacentes. Historiquement composées de titane, ces cages de fusion sont désormais constituées de fibres de carbone ou de polyether-etherketon (PEEK) et permettent la réalisation d'IRM (DiPaolo, 2008). Ces implants polymériques contiennent un greffon osseux, provenant, dans la plupart des cas, de la crête iliaque, associés à un système de maintien permettant la stabilisation de l'implant lors de la fusion. L'efficacité clinique de cette approche chirurgicale a été démontrée comme permettant de diminuer les douleurs dans 70 à 80% des cas (Deyo and Mirza 2006). Cependant, les résultats cliniques témoignent d'une perte de mobilité, successive à la fusion

vertébrale, au niveau des étages traités. Cette altération non négligeable conduit à des modifications biomécaniques de la colonne vertébrale dans son intégralité, pouvant ensuite induire des dégénérescences au niveau des étages discaux adjacents, survenant dans les 5 ans post-chirurgie. Cet « effet domino » concerne près de 30% des cas d'arthrodèse (Harrop et al. 2008). Il a également été rapporté que cette technique chirurgicale ne semblait pas montrer de bénéfice supérieur aux prises en charges conventionnelles sur le long terme. En effet, la supériorité concernant l'amélioration de la qualité de vie à 2 ans apparaît comme évidente, cependant au-delà de ce temps, l'absence de supériorité place aujourd'hui cette approche chirurgicale comme sujette à discussion au sein de la communauté médicale (Fairbank et al. 2005). Dans son ensemble, l'arthrodèse reste une avancée majeure pour la prise en charge des patients discogéniques représentant un succès pour la majorité de patients opérés. L'optimisation de cette approche reste toutefois encore à améliorer (Tally et al. 2018; G. Liu et al. 2016; Hostin et al. 2016).

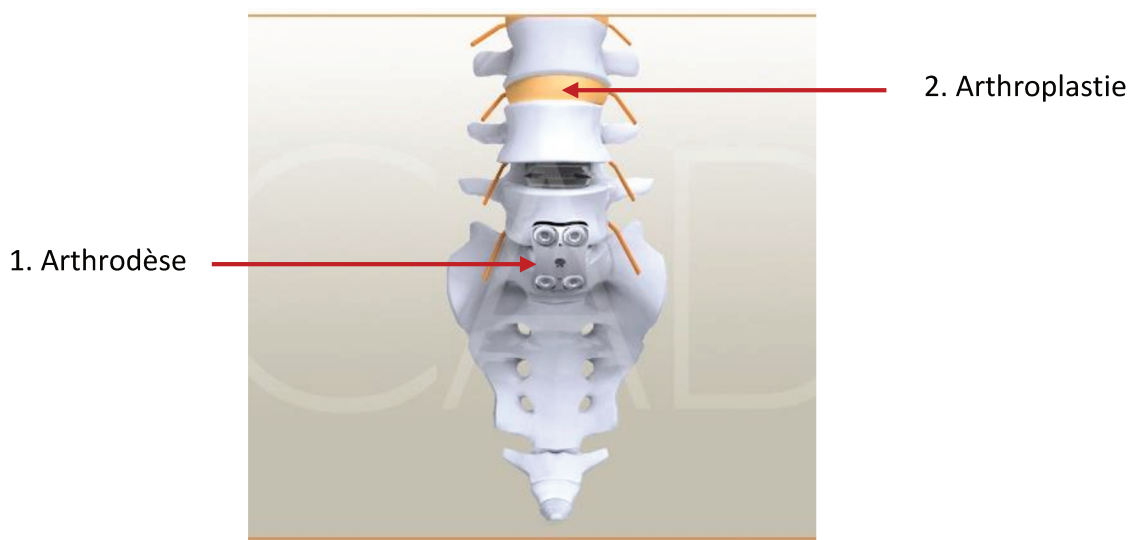


Figure 13 : Arthrodèse et arthroplastie

Classiquement utilisées lors d'une prise en charge chirurgicale des DD symptomatiques réfractaires aux traitements pharmacologiques.

Avec le développement, il y a déjà plusieurs années, des prothèses totales de genoux et de hanches, l'idée de remplacer des DIV dégénérés par un implant (arthroplastie) est rapidement apparue. Ce qui permettrait de préserver la mobilité articulaire et ainsi passer outre les limites de l'arthrodèse (O'Halloran and Pandit 2007; Kovac 2018). La difficulté des études menées a principalement été de développer une prothèse discale idéale (Bono and Garfin 2004). Aujourd'hui, des prothèses discales totales afin de remplacer le DIV dans son intégralité (SB Charité III®, PRODISC-L®) et des prothèses discales partielles qui permettent de remplacer

uniquement le NP (Prosthetic Device Nucleus (PDN®)), sont retrouvées. L'objectif premier de l'arthroplastie est de maintenir la mobilité discale, contrairement à l'arthrodèse dont le but est d'immobiliser l'étage dégénéré. Les observations cliniques ont mis en évidence les atouts supérieurs de l'arthroplastie, qui par la conservation des caractéristiques mécaniques de l'étage rachidien traité, évite par conséquent la dégénérescence des segments vertébraux adjacents et permet un retour rapide aux fonctions de la vie courante. Cette supériorité a été affirmée par les études promues par la Food and Drug Administration (FDA) (Guyer et al. 2004). L'efficacité antalgique permettant le retour rapide des patients aux activités professionnelles confirme le bénéfice certain de cette intervention chirurgicale. Cependant, certaines rares complications au niveau de la prothèse ont été décrites, et le faible recul clinique ainsi que le biais important des études rétrospectives réalisées, indiquent que les données obtenues devront être confirmées (Van Den Eerenbeemt et al. 2010). Il est à noter que les prothèses partielles lombaires présentent un avantage supérieur aux prothèses totales. En effet, les prothèses partielles, en remplaçant uniquement la structure dégénérée, préservent les structures saines environnantes (AF, plateaux cartilagineux, ligaments) et sont à utiliser dans les cas précoces de DDL, avant que l'AF ne soit lésé. Le risque majeur de ce type de traitement est le possible déplacement de la prothèse vers l'AF, ce qui peut entraîner une déchirure au niveau de celui-ci. Le manque de recul clinique, ainsi que le faible nombre d'études relatant de l'utilisation de prothèses partielles limitent leurs le recours à celles-ci.

La prise en charge actuelle de la lombalgie, basée sur des approches médicamenteuses ou chirurgicales, reste, de nos jours, encore limitée car l'ensemble de ces thérapies ne visent uniquement qu'à diminuer la douleur sans s'attaquer à l'origine de la pathologie. De plus, les techniques d'arthrodèse et d'arthroplastie sont très invasives et présentent des risques respectifs de dégénérescence des étages adjacents et de descellement de prothèse. Finalement, aucun de ces traitements actuels ne restaure la fonction du tissu discal. Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies est devenu une priorité au sein de la communauté scientifique. Ces approches innovantes sont basées sur l'amélioration des connaissances de la physiologie et la physiopathologie discale afin de restaurer le DIV dans son intégralité. Comme décrit précédemment, la dégénérescence discale résulte d'un dérèglement profond de l'homéostasie tissulaire combinant de nombreux processus, d'ordres cellulaire, moléculaire et inflammatoire. Ceci va alors altérer le dialogue entre la MEC les cellules résidentes, finissant alors par impacter le DIV biologiquement, structurellement et

mécaniquement. Il s'agit d'un véritable cercle vicieux survenant à plusieurs niveaux avec l'implication de trois principaux événements : i) une augmentation de l'activité inflammatoire et catabolique, ii) une diminution progressive de la densité cellulaire et iii) la perte des fonctions anaboliques associée à la dégradation matricielle du DIV. Il est aujourd'hui bien décrit que ces trois bouleversements biologiques seraient étroitement interconnectés. Il apparaît donc nécessaire de prendre en compte l'ensemble de ces processus dégénératifs afin de restaurer le tissu discal dégénéré dans son intégralité. Ainsi, les approches qui permettraient une régression de l'inflammation, une re-cellularisation des NP dégénérés, ainsi qu'une reconstitution de sa matrice extracellulaire (MEC), apparaissent comme des alternatives prometteuses, ce qui fait de la médecine régénératrice une approche particulièrement intéressante.

D. Stratégies novatrices de traitement de la dégénérescence discale et des douleurs lombaires

La médecine régénératrice, apparue ces dernières années, a pour objectif principal la restauration des fonctions des tissus ou organes lésés. Deux types de maladies sont ciblés par ces récentes stratégies thérapeutiques. Il s'agit des maladies dégénératives telles que l'arthrose, la DD ou encore la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson ; et des maladies destructrices, telles que le diabète (lésions cellulaire et organique). Dans la suite de cette étude nous nous intéresserons uniquement à la médecine régénératrice du DIV, qui comme nous l'avons précédemment évoqué se base sur la restauration de l'homéostasie discale et le rééquilibrage de la balance anabolisme/catabolisme au sein du NP. Pour ce faire, 2 types de stratégies sont principalement évaluées : i) les stratégies anti-catabolique et/ou anti-inflammatoires, dans le but de diminuer voire stopper la dégradation matricielle et ii) les stratégies anaboliques ciblant la re-cellularisation du NP et la stimulation de la synthèse d'une nouvelle MEC de type nucléopulpogénique. Pour ce faire, 4 grandes approches de médecine régénératrices existent : i) la thérapie cellulaire ii) la thérapie moléculaire, iii) la thérapie génique et iv) l'ingénierie tissulaire qui associe une ou plusieurs des précédentes approches à l'utilisation d'un biomatériau. Ces différentes approches ayant pour objectif commun de restaurer le dialogue cellule/MEC ont d'ores et déjà été largement étudiées et ont fait l'objet de nombreuses revues de la littérature publiées ces dernières années (Sakai and Andersson 2015; Fontana, See, and Pandit 2015; Clouet et al. 2018; Henry et al. 2018). Cependant, la

plupart de ces études ne s'intéressent qu'à la correction de seulement un seul des trois événements dégénératifs principaux énoncés plus haut (inflammation et catabolisme, diminution radicale de la densité cellulaire, perte des fonctions anaboliques), par apport soient de facteurs anti-cataboliques, soient de cellules réparatrices ou de facteurs de croissance. Malgré des résultats encourageants, ces stratégies n'ont pour l'heure à notre connaissance, pas suffi à engendrer une régénérescence robuste et complète du DIV. L'idée de combiner ces différentes stratégies afin de prendre en compte les trois événements principaux du processus de DD, fait progressivement surface au sein de la communauté scientifique et semble aujourd'hui particulièrement prometteuse en vue d'une réversion complète de la DD (Frapin et al. 2019). Ainsi, la stimulation du microenvironnement dégénéré discal par l'apport de plusieurs agents thérapeutiques de différentes natures (cytokines anti-inflammatoire, facteurs de croissance, acides nucléique et cellules) est à sérieusement envisager. Bien entendu, la mise en place de telles stratégies constitue un véritable défi à différents niveaux et se révèle être particulièrement complexe à développer.

Premièrement, un aspect essentiel de ces thérapies concerne le caractère non invasif de celles-ci. Ainsi l'injection mini-invasive de ces agents thérapeutiques en intra-discale par la voie trans-annulaire est aujourd'hui considérée comme étant l'option la plus prometteuse afin de régénérer le DIV tout en évitant au maximum les risques de lésions du tissu, même si celles-ci ne sont pas nulles (Elliott et al. 2008). La voie trans-pédiculaire est également étudiée en parallèle mais a démontré pour l'heure l'induction d'une dégénérescence discale post-injection (Vadalà et al. 2013; Le Fournier et al. 2017; Vadalà et al. 2018). Quoi qu'il en soit, l'apport des différents agents thérapeutiques doit se dérouler par l'intermédiaire d'une unique injection intra-discale. En effet, au vu de la fragilité et de la complexité du tissu discal et des structures environnantes, le recours à des injections répétées semble trop délétère. Cependant les facteurs biologiques et les cellules sont des agents particulièrement fragiles et sujet à la dégradation *in situ*, présentant respectivement des temps de demi-vie très court et une survie post-injection décrite comme particulièrement faible (Blanquer, Grijpma, and Poot 2015; C. Feng et al. 2015). Ces difficultés, accentuées dans un environnement aussi hostile que celui d'un DIV dégénéré, constituent de réelles barrières à l'obtention d'un effet thérapeutique efficace et durable au long terme. Ainsi, afin de combiner plusieurs agents thérapeutiques aux rôles variés, le développement d'un système de libération prolongée de

ces agents constitue un point essentiel dans la mise en place de telles stratégies (Seelbach et al. 2015). Ce système de libération doit également être adapté à l'injection intra-discale et au microenvironnement discal, afin de protéger les agents lors de l'injection et *in situ* et ainsi optimiser leurs effets thérapeutiques (D'Este, Eglin, and Alini 2018).

Deuxièmement, intervenir sur les différents processus de la DD suggère d'être capable, non pas seulement de prolonger mais aussi de contrôler la libération des différents agents thérapeutiques, car ces derniers devront surement agir de manière consécutive dans le temps. En effet, la réparation séquentielle des différents aspects de la dégénérescence discale semble indispensable à la mise en place d'une stratégie robuste de régénérescence. Ainsi, dans un premier temps la libération de cytokines anti-inflammatoires, anti-cataboliques et anti-apoptotiques permettrait de réduire l'hostilité du milieu discal dégénéré et d'améliorer ainsi les effets thérapeutiques des agents anaboliques. Puis, dans un deuxième temps, l'apport de cellules au niveau du NP permettrait une re-cellularisation de ce microenvironnement, qui aura été préalablement « soigné ». Enfin, le relargage de facteurs de croissance spécifiques stimulerait les actions anaboliques des cellules résidentes et de celles précédemment apportées, afin de booster la synthèse d'une nouvelle MEC adaptée au niveau du NP. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens avant de pouvoir mettre en place un tel schéma thérapeutique. En effet, le choix des différents agents thérapeutiques à utiliser, lesquels combiner ensemble, leurs doses adéquates, ainsi que leurs profils de libération séquentielle, restent à étudier. Des éléments biochimiques sont aussi également à prendre en compte. En effet, la forme et la taille du système de libération, ainsi que le choix du polymère le constituant, sont décrits comme étant des paramètres influant sur les caractéristiques de libération contrôlée de facteurs biologiques. De plus ces derniers doivent être injectables en vue d'une application discale.

Stratégies de libération séquentielle en fonction de la progression de la DD

Un autre point important à aborder concerne l'adaptation de ces stratégies de libération séquentielle de facteurs biologiques, au stade de la dégénérescence discale. En effet, comme nous l'avons précédemment décrit, la DD constitue un véritable cercle vicieux qui s'autoalimente par le lien étroit résidant entre les différents processus cellulaires et moléculaires impliqués (Adams and Roughley 2006; Vergroesen et al. 2015). Cependant l'apparition et l'intensité de ces événements varient en fonction du stade de dégénérescence,

notamment au niveau cellulaire. Trois stades de dégénérescence peuvent être distingués : le stade de dégénérescence précoce, le stade de dégénérescence modérée et le stade de dégénérescence sévère. La distinction entre ces différents stades se fait sur la base de la hauteur discale et des douleurs ressenties par le patient (Pfirrmann et al. 2001). Ces modifications structurelles et mécaniques sont intimement liées aux changements biologiques se déroulant au cours d'une DD. Ainsi, nous pouvons en déduire que la hauteur discale plus importante d'un DIV au stade de dégénérescence précoce par rapport à un DIV sévèrement dégénéré, suggère la présence d'une MEC saine en quantité plus importante. Ceci reflète alors une activité anabolique présente et donc la présence de cellules résidentes encore actives, et une activité inflammatoire modérée. Ainsi dans le cas d'un DIV précocement dégénéré, l'apport de facteurs anaboliques et/ou facteurs anti-cataboliques permettant respectivement soit de stimuler les cellules résidentes et booster leurs activités de synthèse, soit limiter l'inflammation, pourrait s'avérer suffisant pour inverser ces processus précoces de DD. Cependant, dans le cas d'un DIV modérément ou sévèrement dégénéré la re-cellularisation du NP semble essentielle afin de relancer la machinerie anabolique, le nombre de NPCy résidents étant insuffisant et leur activité de synthèse trop altérées pour compenser la dégradation matricielle. La re-cellularisation du NP apparaît donc comme une étape préalable nécessaire à la libération de facteurs de croissance dans les cas de DD modéré et sévère (*Figure 15c*).

Facteurs anaboliques

Parmi les nombreux candidats, le TGF- β , facteur anabolique et anti-inflammatoire attire particulièrement notre attention. En effet, le TGF- β stimule la synthèse par les NPCy d'une MEC saine (Bedore, Leask, and Séguin 2014). Il assure également le maintien du niveau d'expression du CCN2, permettant ainsi de contrecarrer les effets de l'IL-1 β (C M Tran et al. 2014; Bedore, Leask, and Séguin 2014). De plus, lorsque celui-ci est associé à la dexaméthasone, la prolifération de NPCy humains dégénérés est augmentée et permettrait de mettre en place un profil génique anti-catabolique (Liang et al. 2013). Un deuxième facteur anabolique, le GDF-5, est au centre des recherches actuelles, car il est fortement impliqué dans le développement précoce du DIV (C. Feng et al. 2015). Ce facteur de croissance stimule la prolifération des NPCy et leur synthèse d'agrécan et de collagène de type II (Chujo et al. 2006). De manière intéressante, ces deux facteurs agissent en synergie sur la différenciation

in vitro de cellules souches adipeuses (CSA) humaines en cellules de type NPCy, notamment en stimulant l'expression des marqueurs spécifiques de NPCy et des composants de la MEC du NP (Colombier et al. 2016). Actuellement, 4 essais cliniques ont à notre connaissance été réalisés, afin d'étudier le potentiel régénérateur du facteur de croissance GDF-5 dans le traitement de la DDL chronique (NCT01182337, NCT01158924, NCT01124006, NCT00813813 ; www.clinicaltrial.gov) (Henry et al. 2018). Ces essais cliniques ont été effectués chez des patients souffrant d'une DDL symptomatique confirmée. Un suivi à 36 mois post-injection a été réalisé afin d'évaluer la sécurité, la tolérance et l'efficacité d'une injection unique de GDF-5 (0,25 mg à 2,0 mg). Pour 3 de ces 4 essais, aucun effet indésirable majeur directement lié à l'injection de GDF-5 n'a été observé. Les patients ont signalé une amélioration modérée de leurs douleurs et de leur handicap (<https://clinicaltrials.gov>). A notre connaissance, les résultats de ces essais cliniques n'ont pas encore été publiés.

Re-cellularisation du NP

Injection de cellules exogènes

La thérapie cellulaire, basée sur l'apport de cellules *in situ* afin de remplacer ou suppléer les cellules défaillantes, apparaît comme une alternative prometteuse. Différentes sources cellulaires peuvent alors être envisagées dans le cas d'une thérapie cellulaire du DIV. Trois sources cellulaires ont principalement été étudiées, présentant chacune des avantages et des limites qui sont résumés dans le tableau ci-dessous ([Tableau 1](#)). Il s'agit des cellules du NP, des chondrocytes articulaires et des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Concernant les deux premiers types cellulaires, leur utilisation a rapidement été abandonnée. En effet, l'utilisation de cellules de NP ou de chondrocytes articulaires est fortement limitée notamment du fait de leur faible disponibilité, de leur faible capacité proliférative et de leur tendance à se dé-différencier lors des manipulations *in vitro*. De plus, des risques importants de morbidité au niveau des sites donneurs ont été reportés (Hohaus et al. 2008; Hans Jörg Meisel et al. 2007; Paesold, Nerlich, and Boos 2007). Des études cliniques ont tout de même été menées et ont mis en évidence, pour certaines d'entre elles, une amélioration de la qualité de vie des patients à un ou deux ans (Sakai and Andersson 2015; Hohaus et al. 2008; Hans Jörg Meisel et al. 2007; Hans Joerg Meisel et al. 2006; Acosta et al. 2011). En parallèle, des études menées sur les CSM, troisième source cellulaire envisagée comme intéressante en vue d'une transplantation discale, ont démontré que ces dernières possèdent une capacité régénérative

et permettent de s'affranchir de certaines limites relatives aux deux précédents types cellulaires (Sakai and Andersson 2015). Nous détaillerons ici davantage les CSM et leur utilisation en vue d'une régénérescence des DIV.

Source cellulaire	Avantages	Inconvénients
Cellules du NP autologues	▪ Phénotype identique ▪ Synthèse de MEC discale	▪ Morbidité au site donneur ▪ Risque de DD des étages adjacents ▪ Faible nombre cellulaire ▪ Risque de dédifférenciation lors des étapes d'amplification <i>in vitro</i>
Chondrocytes articulaires	▪ Similitudes phénotypiques	▪ Morbidité douloureuse au site donneur ▪ Risque de dédifférenciation lors des étapes d'amplification <i>in vitro</i>
CSM	▪ Facilité d'accès (CSA++) ▪ Quantité importante (CSA++) ▪ Importante capacité d'amplification <i>in vitro</i> ▪ Multipotence et capacité de transdifférenciation ▪ Tolérance immunitaire	▪ Nécessité de différenciation

Tableau 1 : Avantages et limites des différentes cellules envisagées dans le cadre d'une thérapie cellulaire discale.

Les CSM, largement décrites depuis 1960, sont définies comme présentant les caractéristiques spécifiques suivantes : adhérence au plastique, auto-renouvellement, phénotype immun spécifique (CD90+, CD73+, CD105+, CD34- et CD45-) et des propriétés de multipotence (capacités de différenciation en adipo-, chondro- et ostéocytes)(Friedenstein et al. 1968). Les CSM sont présentes au sein de différents tissus dans lesquels elles se trouvent en plus ou moins grandes proportions (moelle osseuse, tissu adipeux, derme, liquide synovial, cordon ombilical, placenta et liquide amniotique). Tandis que le nombre de CSM retrouvées au sein de la moelle osseuse est estimé autour de 0.01%, il est estimé à 2% au sein du tissu adipeux (Kern et al. 2006). Parmi ces différentes CSM, les CSM du tissu adipeux (Cellules Souches Adipeuse : CSA) nous semblent particulièrement intéressantes. En effet leur accessibilité, leur importante quantité et leur capacité moindre à se différencier en chondrocytes hypertrophiques font de celles-ci des candidates prometteuses en vue d'une utilisation pour la médecine régénératrice du DIV (Ronzière et al. 2010). En plus de leur capacité à se différencier en cellules mésodermiques, les CSM sont également capables de se différencier en cellules de l'endoderme (hépatocytes, cellules intestinales et cellules de poumon) et de

l'ectoderme (cellules épithéliales et neurones). Ces aptitudes à se transdifférencier étendent ainsi leur potentiel régénératif vers davantage de tissus, tels que ceux d'origine neuroectodermique ou endodermique (Itaba et al. 2015; Lindvall, Kokaia, and Martinez-Serrano 2004) (*Figure 14*).

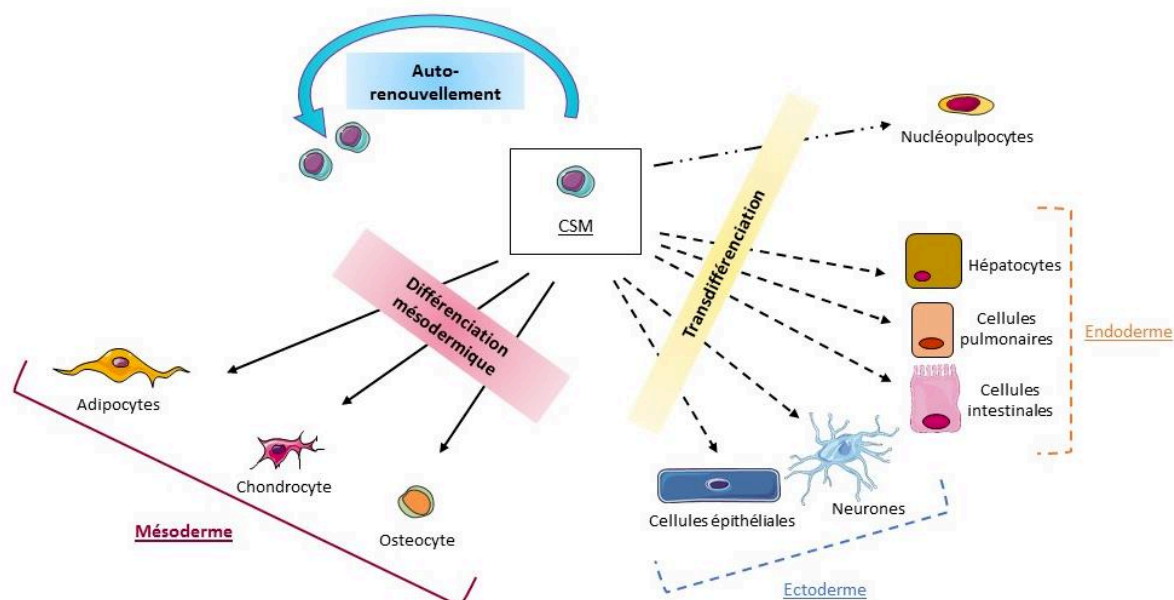


Figure 14 : Capacités de différenciation et transdifférenciation des cellules souches mésenchymateuses. (Modifié depuis Uccelli et al., Nat Rev Immunol, 2008). (Uccelli, Moretta, and Pistoia 2008)

Au regard de ces propriétés de multipotence et de transdifférenciation, l'utilisation des CSM a été envisagée pour l'obtention de NPCy et quelques études ont d'ores et déjà rapporté la faisabilité de cette transdifférenciation en NPCy dont le phénotype est proche de celui des chondrocytes (Colombier et al. 2016). Par ailleurs, la tolérance immunitaire des CSM par modulation de la réponse inflammatoire tissulaire en fait des candidates prometteuses en vue d'applications cliniques potentielles, permettant d'éviter la prise de traitements immunosuppresseurs au long cours et ainsi limiter les effets secondaires qui accompagnent ceux-ci (Ryan et al. 2005). En plus des molécules anti-inflammatoires (IL-6, IL-10, PGE2...), les CSM sécrètent de nombreux facteurs de croissance et facteurs trophiques, indispensables à la restauration des fonctions tissulaires, comme l'indiquent les études portant sur l'utilisation des CSM dans le traitement des maladies auto-immunes ou neurodégénératives (Swart et al. 2015). Toutes ces propriétés spécifiques constituent un avantage considérable pour l'utilisation des CSM en vue d'applications thérapeutiques novatrices au niveau discal. Plusieurs approches utilisant des CSM sont actuellement envisagées dans le cadre d'une

régénérescence discale : des approches consistant à injecter directement des CSM au sein de DIV dégénéré ou encore des approches d'ingénierie tissulaire, combinant biomatériau et CSM (Sakai et al. 2015; Clouet et al. 2018; Henry et al. 2018). Parmi ces méthodes, les CSM peuvent être injectées telles quelles en vue d'une différenciation *in situ* (Uccelli, Moretta, and Pistoia 2006; Gao et al. 2016) ou être préalablement différenciées *in vitro* en « NP-like cells » avant d'être injectées au sein du NP dégénéré (Stoyanov et al. 2011; Xia et al. 2019). Cependant, la transplantation de cellules exogènes est soumise à plusieurs limites qui ralentissent la sortie de ces stratégies sur le marché thérapeutique. En effet, le recours à des cellules exogènes nécessite la réalisation d'étapes de culture *in vitro* en vue de leur isolement, amplification et/ou différenciation, qui engendre alors des risques non négligeables de contaminations d'ordres bactérienne, fongique ou virale. Ces manipulations augmentent alors le coût et la durée de préparation des cellules exogènes en vue de leur transplantation. Des considérations éthiques sont à ajouter à ces limites techniques et réglementaires, compliquant encore davantage leur utilisation en clinique humaine.

Recrutement et mobilisation de cellules endogènes

La découverte récente de cellules souches/progénitrices existante au sein du tissu discal sain et dégénéré, mises en évidence chez différents mammifères (lapin, rat, porcs) dont l'homme, offre des alternatives prometteuses de régénérescence endogène du DIV (L. T. Liu et al. 2011; Risbud et al. 2007; H. Henriksson et al. 2009). Ces cellules souches/progénitrices discales ont été localisées au niveau des différentes régions anatomiques du DIV (PC, AF et NP), avec des quantités variant selon la localisation (PC > AF et NP), suggérant ainsi la migration de ces cellules au sein du tissu discal (H. Henriksson et al. 2009; H. B. Henriksson et al. 2012; Brisby et al. 2013). Ainsi, l'hypothèse de l'existence de routes de migration communiquant entre les PC, l'AF et le NP a été émise. Parallèlement, il a été démontré que ces cellules discales remplissaient l'ensemble des critères des CSM décrits par la Société Internationale de Thérapie cellulaire (ISCT), du fait de l'expression de certains de leurs marqueurs membranaires : CD44, CD90, CD105 and CD73 (Clouet et al. 2018; Risbud et al. 2007; C. Liu et al. 2014; X.-C. Li et al. 2017). De plus, les cellules souches discales présentent des capacités à se différencier en adipo-, ostéo- et chondrocytes (Blanco et al. 2010; H. Wang et al. 2014, 2016; G. Feng et al. 2010). Elles seraient donc comparables à des CSM, même si aucun consensus n'a encore été établi concernant leur profil phénotypique. De manière

intéressante, des études comparatives effectuées sur ces cellules souches/progénitrices discales, isolées soit des PC, soit de l'AF ou soit du NP, ont mis en évidence la supériorité des capacités *in vitro* de migration et de différenciation chondrogénique de celles issues des PC (S. Liu et al. 2017; H. Wang et al. 2014, 2016; L. T. Liu et al. 2011). Ces cellules souches présentent *in situ*, représenteraient alors une source potentielle de cellules réparatrices endogène très prometteuse du fait de leur localisation native discale et donc de leur adaptation préétablie à l'environnement complexe du DIV. Ainsi, la mobilisation et le recrutement de ces cellules souches/progénitrices résidentes des PC vers le NP dégénéré semble donc envisageable et prometteur pour la mise en place de stratégies de réparation endogène discale, permettant ainsi de passer outre les limites de l'injection intradiscale de cellules exogènes. Le défi majeur de ces alternatives endogènes concerne le recrutement de ces cellules souches/progénitrices discales des PC vers le NP dégénéré. De manière intéressante, la mise en place d'un modèle *ex vivo* de culture d'organe a montré que la culture de DIV d'origine bovine dans des conditions dégénératives (restriction nutritive et intenses contraintes mécaniques) entraînait une augmentation de la migration de CSM (BM-MSCs), préalablementensemencées au niveau d'un des PC (Illien-Jünger et al. 2012). A la suite de cette étude, la même équipe a mis en évidence qu'une augmentation de la concentration locale en chimiokine (CCL5) avait lieu en parallèle, au sein du même modèle de DIV *ex vivo* cultivé dans des conditions dégénératives (G. Pattappa et al. 2014). Ces résultats suggèrent que des mécanismes de réparation endogène pourraient ainsi se dérouler au sein des DIV dégénérés, restant cependant trop faible pour stopper la dégénérescence et permettre une restauration naturelle complète du DIV (Ma et al. 2018). La faible vascularisation du tissu discal, limitant son oxygénation et sa nutrition, pourrait en effet restreindre ces processus de régénérescence endogène, qui pourraient en pâtir d'autant plus avec la calcification des PC se déroulant au cours de la DD (Huang, Urban, and Luk 2014). Ainsi, dans le but de pouvoir utiliser les cellules souches/progénitrices discales en tant que cellules réparatrices, l'utilisation de chimiokines et facteurs de croissance pourrait s'avérer très prometteuse afin de guider et amplifier la réparation endogène discale. De telles stratégies ont d'ores et déjà été étudiées dans d'autres domaines que celui du DIV. Des résultats positifs dans des cas de régénérescence de défauts ostéochondraux et de réparation tendineuse ont pu être démontrés (Sukegawa et al. 2012; Shen et al. 2010). Plus précisément, deux chimiokines apparaissent comme particulièrement intéressantes en vue de développer de telles thérapies endogènes : la chimiokine CXC-motif

ligand 12 (CXCL12 ou stromal derived factor 1, SDF-1) et la chimiokine CC-ligand 5 (CCL5 ou Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted, RANTES), qui sont toutes deux connues pour stimuler la migration de nombreuses cellules, notamment des CSM de la moelle osseuse qui expriment leurs récepteurs respectifs, le CXCR4 et les CCR1/3/5 (Honczarenko et al. 2006). Les cellules du DIV, quant à elles, semblent produire ces deux chimiokines de manière physiologique, tandis que l'expression de leurs récepteurs spécifiques a également été démontrée à la surface des cellules de l'AF et du NP (S. Liu et al. 2017; Z. Liu et al. 2016). De plus, l'expression du CCL5 a été observée comme augmentée au sein de modèles *ex vivo* de DIVs bovins cultivés dans des conditions dégénératives (G. Pattappa et al. 2014). Cette amplification semble être corrélée à l'augmentation de la quantité des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α qui sont surexprimées durant la DD (G. Pattappa et al. 2014; Helen E. Gruber et al. 2014; Wangler et al. 2019). Par ailleurs, l'expression de la chimiokine CCL5 au sein du DIV serait également à mettre en lien avec les douleurs ressenties par le patient d'après des études réalisées au niveau de DIV herniés (Ahn et al. 2002; Grad et al. 2016; Kepler et al. 2013). En prenant en compte l'ensemble de ces éléments, l'utilisation de ces chimiokines en vue de stimuler une réparation endogène discale semble une option particulièrement novatrice et séduisante. L'évaluation de cette stratégie dans un modèle *ex vivo* de DIV caudaux bovins, a démontré, à la suite de l'ensemencement de CSM au niveau d'un des PC, une augmentation de la migration cellulaire depuis les PC vers les NP préalablement injectés en hydrogel d'acide hyaluronique chargé en CXCL12 (Pereira et al. 2014). Ces résultats positifs confirment la présence de route de migration au sein du tissu discal reliant les différentes structures du DIV. Cependant, il est important de noter que la quantité de cellules souches/progénitrices discales diminuerait avec l'âge. De plus, la migration de ces cellules souches/progénitrices discales au sein du tissu semble compromise dans un DIV sévèrement dégénéré du fait des changements tissulaires importants qui sont alors installés. Ainsi, l'utilisation de ces cellules souches endogènes en tant que cellules réparatrices semble appropriée dans les cas de DD modérée tandis que le recours à des cellules exogènes restent à envisager chez le patient âgé ou dans les cas de DD sévère.

Facteurs anti-cataboliques

Parallèlement à ces stratégies anaboliques, l'inflammation et la dégradation matricielle étant des événements importants tout au long du processus de dégénérescence discale, la

combinaison des cellules et/ou facteurs anaboliques à des cytokines anti-inflammatoire ou anti-catabolique permettrait, comme expliquer précédemment, de modifier le microenvironnement du DIV et ainsi augmenter l'efficacité de ces étapes régénératives anaboliques. Parmi ces dernières, des molécules déjà utilisées lors du traitement de la polyarthrite rhumatoïde, l'IL-1 et le TNF α , pourraient constituer des candidates potentielles pour une utilisation au niveau discal (Poiraudau et al. 1999; Freemont 2009). Des inhibiteurs de l'apoptose (IGF-1, PDGF) ou encore de la cascade de kinase menant à l'activation de la p38 MAPK, font également l'objet d'études *in vitro* afin d'évaluer leurs bénéfices potentiels dans le traitement de la DD (H E Gruber, Norton, and Hanley 2000; Park et al. 2006; Y. J. Wang et al. 2006; Studer et al. 2008). L'inhibition des enzymes cataboliques (MMP et ADAMTS), soit par suppression directe de leur activité, soit par régulation de la synthèse de leurs médiateurs inflammatoires (IL-1 β et TNF- α) est également envisagée, notamment par l'utilisation de micro-ARN (miRNAs) ou siRNA (small interfering RNA) impliqués dans la surexpression de MMP et de cytokines pro-inflammatoire (Clouet et al. 2018; Seki et al. 2009). D'autre part, les TIMP qui sont les inhibiteurs physiologiques des MMP s'avèrent être également des candidats prometteurs en vue d'une diminution de l'activité catabolique au sein d'un DIV dégénéré (Leckie et al. 2012).

Différentes options thérapeutiques peuvent donc être proposées selon l'état de dégénérescence du DIV à régénérer. Ces différentes options font appel aux différentes stratégies de médecines régénératrices évoquées, à savoir thérapie génique, moléculaire et cellulaire (*Figure 15*). Dans le but d'obtenir une action prolongée, efficace et séquentielle la combinaison de ces facteurs, gènes ou cellules avec un biomatériau en vue de développer un système à libération séquentielle de facteurs biologiques semble essentielle. Afin de mettre en place une telle stratégie, l'évaluation de l'intégralité des approches d'ores et déjà étudiées est indispensable, ainsi que la prise en compte des critères et limites précédemment mentionnés. Ainsi, l'ensemble de ces éléments a fait l'objet d'une revue intitulée « *Lessons learned from intervertebral disc pathophysiology to guide rational design of sequential delivery systems for therapeutic biological factors* » publiée dans le journal *Advanced Drug Delivery Review*.

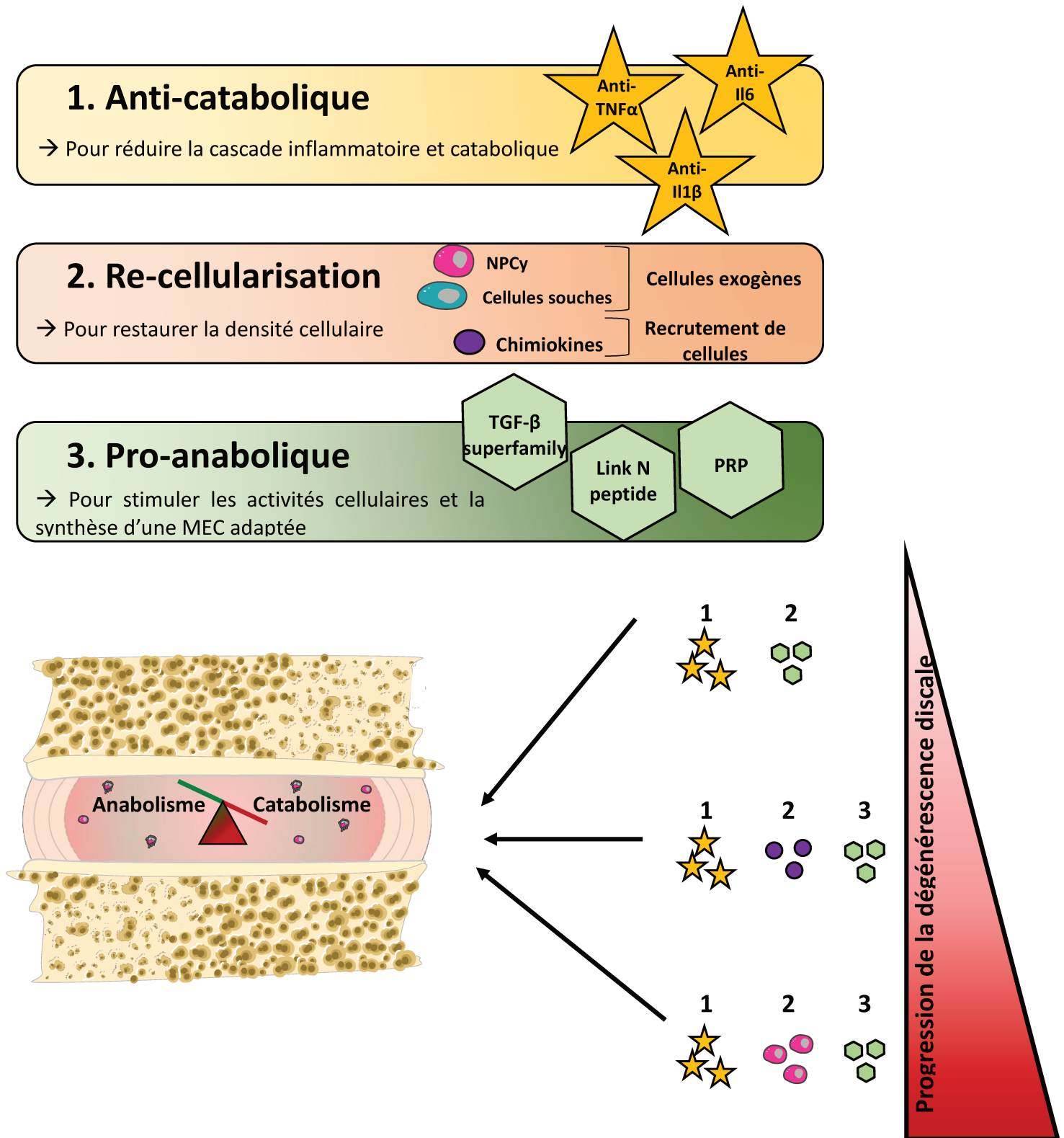


Figure 15 : Stratégies innovantes de libération séquentielle d'agents biologiques, en vue d'une régénérescence maximale des DIV.

Nous émettons l'hypothèse qu'un apport séquentiel d'agents biologiques i) qui ciblerait l'hostilité inflammatoire et catabolique du microenvironnement discal, par la libération de cytokines anti-inflammatoires ou anti-cataboliques, puis ii) augmenterait la densité cellulaire, soit par recrutement de cellules souches discales, soit par apport de cellules exogènes, et enfin iii) stimulerait la synthèse d'une MEC adaptée, par la libération de facteurs anaboliques ; constitue un défi prometteur pour traiter la dégénérescence des DIV. L'étude de la séquence des événements doit faire l'objet d'un examen attentif, notamment en ce qui concerne l'efficacité thérapeutique des facteurs anaboliques qui requièrent indéniablement la présence environnante de cellules saines afin de pouvoir stimuler leurs actions de synthèse. La progression de la maladie doit être également prise en compte lors du choix d'un traitement séquentiel. En effet, pour inverser les processus complexes impliqués dans la DD, il faut adapter la stratégie de traitement à la cascade dégénérative. Selon la gravité de la maladie, on peut envisager différents schémas séquentiels de libération, impliquant les différents facteurs biologiques et/ou cellules. Pour les disques à un stade précoce de dégénérescence, lorsque les cellules discales locales sont encore saines et disponibles, la libération de facteurs anti-cataboliques suivis des facteurs anaboliques semble appropriée. Pour les disques à un stade intermédiaire de dégénérescence, une étape supplémentaire de recrutement de cellules endogènes est nécessaire pour fournir des cibles saines aux facteurs

anaboliques. Enfin, pour les tissus présentant un stade avancé de la dégénérescence, où les cellules endogènes pourraient ne plus être disponibles, une supplémentation en cellules exogènes autologues ou allogéniques est essentielle. Abréviations : TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-1 β : Interleukin 1 β ; IL-6 : Interleukin 6 ; NP : Nucleus pulposus ; TGF- β : Transforming growth factor β ; PRP : Plasma riche en plaquettes ; NPCy : Nucleopulocytes.

E. Article de revue

Les connaissances actuelles au sujet de la physiologie discale et des processus impliqués dans la physiopathologie de la dégénérescence discale ont été à l'origine de l'émergence de nombreuses études visant à développer diverses stratégies innovatrices de restauration de l'homéostasie tissulaire et de re-cellularisation du NP. Finalement, le développement de stratégies de libération séquentielle de différents agents biologiques par le biais d'une unique injection intradiscale permettant d'agir sur les différents événements de la dégénérescence discale pourrait s'avérer prometteur. L'ensemble de ces stratégies ont fait l'objet d'une revue de la littérature publiée dans le journal « Advanced Drug Delivery Review ».

Article I: *Lessons learned from intervertebral disc pathophysiology to guide rational design of sequential delivery systems for therapeutic biological factors.* L. Frapin, J. Clouet, V. Delplace, M. Fusellier, J. Guicheux, C. Le Visage - Advanced Drug Delivery Review - 08/19



Contents lists available at ScienceDirect

Advanced Drug Delivery Reviews

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

Lessons learned from intervertebral disc pathophysiology to guide rational design of sequential delivery systems for therapeutic biological factors

Leslie Frapin^{a,b}, Johann Clouet^{a,b,c,d}, Vianney Delplace^{a,b}, Marion Fusellier^{a,e}, Jérôme Guicheux^{a,b,f,1}, Catherine Le Visage^{a,b,*,1}

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

^b Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes F-44042, France

^c CHU Nantes, Pharmacie Centrale, PHU 11, Nantes F-44093, France

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

^e Department of Diagnostic Imaging, CRIP, National Veterinary School (ONIRIS), Nantes F-44307, France

^f CHU Nantes, PHU 4, OTONN, Nantes F-44093, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 February 2019

Received in revised form 5 August 2019

Accepted 18 August 2019

Available online xxxx

Keywords:

Drug delivery systems

Degenerative disc disease

Anti-catabolic factors

Pro-anabolic factors

Cell supplementation

Endogenous repair

ABSTRACT

Intervertebral disc (IVD) degeneration has been associated with low back pain, which is a major musculoskeletal disorder and socio-economic problem that affects as many as 600 million patients worldwide. Here, we first review the current knowledge of IVD physiology and physiopathological processes in terms of homeostasis regulation and consecutive events that lead to tissue degeneration. Recent progress with IVD restoration by anti-catabolic or pro-anabolic approaches are then analyzed, as are the design of macro-, micro-, and nano-platforms to control the delivery of such therapeutic agents. Finally, we hypothesize that a sequential delivery strategy that i) firstly targets the inflammatory, pro-catabolic microenvironment with release of anti-inflammatory or anti-catabolic cytokines; ii) secondly increases cell density in the less hostile microenvironment by endogenous cell recruitment or exogenous cell injection, and finally iii) enhances cellular synthesis of extracellular matrix with release of pro-anabolic factors, would constitute an innovative yet challenging approach to IVD regeneration.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Low back pain (LBP) is a particularly common affliction in the 21st century, with 80% of the world population experiencing it at some point in their life [1,2]. It is the second most common reason for a medical consultation in industrialized countries and one of the costliest diseases for the healthcare system [3–5]. LBP consists of pain in the lumbar part of the spine that can also extend to the legs, with patients suffering from impaired mobility in the most severe cases. Thus, management of LBP patients, estimated to be 600 million worldwide, presently constitutes a major socio-economic problem [6]. It is now well established that 40% of the chronic LBP cases are due to degeneration of the intervertebral disc (IVD) [7,8], which is the fibrocartilaginous joint situated between two vertebrae. The IVD is a complex tissue composed of three distinct components that assume a unique structural organization

essential for its function as a shock absorber. A healthy IVD, which is a key requirement for spine movements, exhibits mechanical properties such as high compressive and tensile strength that are tightly linked with its complex structural organization. For reasons that are not yet fully understood, very early after skeletal maturity, the IVD can undergo a degenerative process that manifests as cell death, extracellular matrix (ECM) changes and dehydration, culminating in failure of its biomechanical properties, thereby leading to pain and disability [9]. This progressive natural aging process can be accelerated and amplified by the occurrence of various traumatic, environmental or genetic factors. Conventional treatments for degenerative disc disease (DDD) are focused only on pain or inflammatory relief, with pharmacological approaches as the first intention, followed by invasive surgical procedures as the last option for treatment of resistant and severe disease. Ultimately, none of these treatments restore disc function. Consequently, the development of innovative therapeutic strategies has become a high-priority issue in the scientific community, with the main view being that these strategies should be based on therapeutic agents that allow reversal of the degenerative processes so as to fully restore the healthy tissue physiology in terms of its structural and functional complexity. Thus,

* Corresponding author at: Inserm, UMR 1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex, France.

E-mail address: catherine.levisage@inserm.fr (C. Le Visage).

¹ These authors contributed equally.

therapeutic strategies are now focused on the mechanisms of IVD degeneration, primarily with the aim of correcting the anabolic/catabolic balance, albeit only one at a time. However, IVD degeneration occurs at different levels, with the occurrence of three main events that are intertwined and that work in a vicious circle: i) inflammation and catabolic cascades, ii) progressive loss of cells, and iii) decline in cellular functions and anabolic activities. Thus, although strategies based on rectifying only one of these events, by delivering either anti-inflammatory cytokines, growth factors, or cells, have shown promising results, they have so far not been sufficiently robust to allow for full IVD restoration.

In this review, we formulate and support the notion that all three of the main events of IVD degeneration need to be addressed in order to achieve complete reversal of DDD. Thus, we hypothesize that a combination of strategies that may have already been assessed individually is likely to stimulate the degenerated IVD microenvironment to the point where full regeneration of disc tissue may occur. Local delivery of therapeutic agents of various natures (e.g., cytokines, growth factors, nucleic acids, and cells) into a tissue constitutes a challenge, as does the need to avoid an invasive surgical procedure, as the spine is a particularly delicate entity. Thus, one of the crucial parameters for designing a drug delivery system (DDS) specifically for IVD regeneration is the requirement for an injectable biomaterial that can both protect the therapeutic agents and allow for their sustained delivery, while avoiding repeated injections as these are deleterious to the structure of the IVD. Being able to act on the different stages of disc degeneration in a consecutive and controlled manner by use of a single injection would therefore be optimal. Such a sequential DDS must allow effects on i) firstly, the inflammatory, pro-catabolic, and hostile microenvironment by the release of anti-apoptotic and anti-catabolic or anti-inflammatory cytokines; ii) secondly, on the cell density by increasing the number of cells in this healed microenvironment; and then iii) thirdly, the cellular functions, mostly the synthesis of adequate ECM, by the release of pro-anabolic factors. Nevertheless, before considering the clinical application of such sequential strategies, many design issues need to be addressed. Indeed, the optimal timing and profiles of release, as well as adequate doses of the various therapeutic agents still need to be properly determined. Further studies are needed to define these various issues before the establishment of such sequential DDS for full IVD repair.

Here, we first review the current knowledge of IVD physiology and physiopathological processes in terms of homeostasis regulation and consecutive events that lead to tissue degeneration. Recent advances to restore the IVD by anti-catabolic or pro-anabolic approaches are then analyzed, as are the design of smart macro-, micro- and nano-platform biomaterial to control the delivery of such therapeutic agents. Finally, a single-injection-based sequential regeneration strategy that aims to act in a time-dependent manner on all three of the main events of IVD degeneration is discussed.

2. IVD physiology

2.1. IVD structure

The IVD is a fibrocartilaginous tissue located between two adjacent vertebral bodies, in a ventral position with respect to the spinal cord [10]. By maintaining the stability and dynamics of the spine, this amphiarthrosis plays an important role in spinal kinematics, as it absorbs the shocks produced during movement of the entire body and it distributes mechanical loads along the spinal column [11–13]. Each IVD is composed of three distinct regions that ensure a unique internal organization while also providing elasticity and strength. At the center of the IVD, the nucleus pulposus (NP) is a gelatinous and highly-hydrated tissue; at the IVD periphery, surrounding the NP, there is the annulus fibrosus (AF), which is a highly-organized fibrous structure, while cartilage endplates (CEP) are present at the top and bottom of the vertebral bodies and they interface the IVDs with the adjacent

vertebrae. Each region represents a structural and biological entity that participates jointly in disc homeostasis.

The NP has a low cell density of approximately 3000 cells/mm³ [14,15]. Young and healthy human IVDs have been reported to have two types of cells: notochordal cells, which are large vacuolated cells that originate from the embryonic notochord, and nucleopulpoocytes (NPCy), which are small spherical cells with a singular phenotype resembling that of articular chondrocytes but that express specific markers (OVOS2, CA12, CD24, HIF- α , and cytokeratin 8/18/19, amongst others) [16–18]. NPCy synthesize the ECM, which is rich in aggrecan, type II collagen (with a 27:1 ratio vs. 2:1 for articular chondrocytes) and hyaluronic acid (HA) that retains water and contributes to the osmotic pressure responsible for NP biomechanical properties [19]. These two cell types coexist only during the first few years of life due to the gradual post-natal disappearance of notochordal cells that ultimately disappear permanently prior to skeletal maturity in humans [20]. This short-lived cohabitation of notochordal cells and NPCy appears to be fundamental for disc homeostasis and the synthesis of a functional ECM [21,22] (Fig. 1). A cellular dialogue between notochordal cells and NPCy occurs as a result of the secretion of growth factors: connective tissue growth factor (CTGF), transforming growth factor (TGF- β), and sonic hedgehog (Shh), which together limit enzymatic degradation of the ECM by both inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) production and stimulation tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) production [23,24]. This cellular dialogue also protects the NPCy from apoptosis and it prevents tissue neovascularization through inhibition of the expression of vascular endothelium growth factor (VEGF), interleukins 6 and 8 (IL-6 and IL-8). Aside from these anti-catabolic actions, notochordal cells, primarily as a result of CTGF and Shh production, stimulate the synthesis of ECM components by NPCy, which in turn secrete TGF- β 1 to stimulate CTGF synthesis by notochordal cells [23,25–27]. This molecular exchange between notochordal cells and NPCy, which is responsible for all of these anti-catabolic and pro-anabolic effects, is therefore strongly involved in the metabolic balance and matrix integrity of the tissue and is not limited to NP cells. Indeed, it has been reported that notochordal cells, through Shh, also have a beneficial effect on the proliferation and anabolic activities of AF cells and endplate chondrocytes [27–29].

While the NP is a network of randomly oriented type II collagen fibers within an amorphous matrix of glycosaminoglycans (GAGs), the AF is organized into 15–25 concentric lamellae composed essentially of type I collagen fibers [12,30]. Within the same lamella, the collagen fibers are arranged at an angle to each other and have a specific orientation of 30° relative to the transverse plane [31]. This structurally organized ECM is also composed to a lesser extent of type II collagen, proteoglycans (PGs), and elastin [32]. The AF can be divided into two parts: the outer AF, which is mainly composed of organized type I collagen fibers and exhibits a high level of resistance to tensile strength; and the inner AF, which is a transitional zone between the outer AF and the NP and is less dense and less organized [33]. The entire AF tissue contains fibroblast-like cells at a density of approximately 9000 cells/mm³ [14].

On both sides of the IVD, CEPs, which interface with the adjacent vertebral bodies, are composed of hyaline cartilage cells and chondrocytes that synthesize an ECM rich in type II collagen and PGs [14]. The diffusion of oxygen and glucose in the IVD, which is necessary for growth and nutrition of the tissue as well as for metabolite excretion, takes place through the CEPs [34], via their network of fine blood vessels [35]. This diffusion route is particularly important since the IVD is the most avascular tissue in the human body [12,36,37]. IVD cells consequently have to adapt to a hypoxic environment and thus preferentially engage in anaerobic metabolism. This adaptation of disc cells is partially due to the stabilization of the hypoxia-inducible factor- α (HIF α), which is constantly expressed by NP cells irrespective of the oxygen content [38,39]. Furthermore, it has been reported that the IVD environment is acidic, due to the anaerobic lactic acid metabolic pathway used by

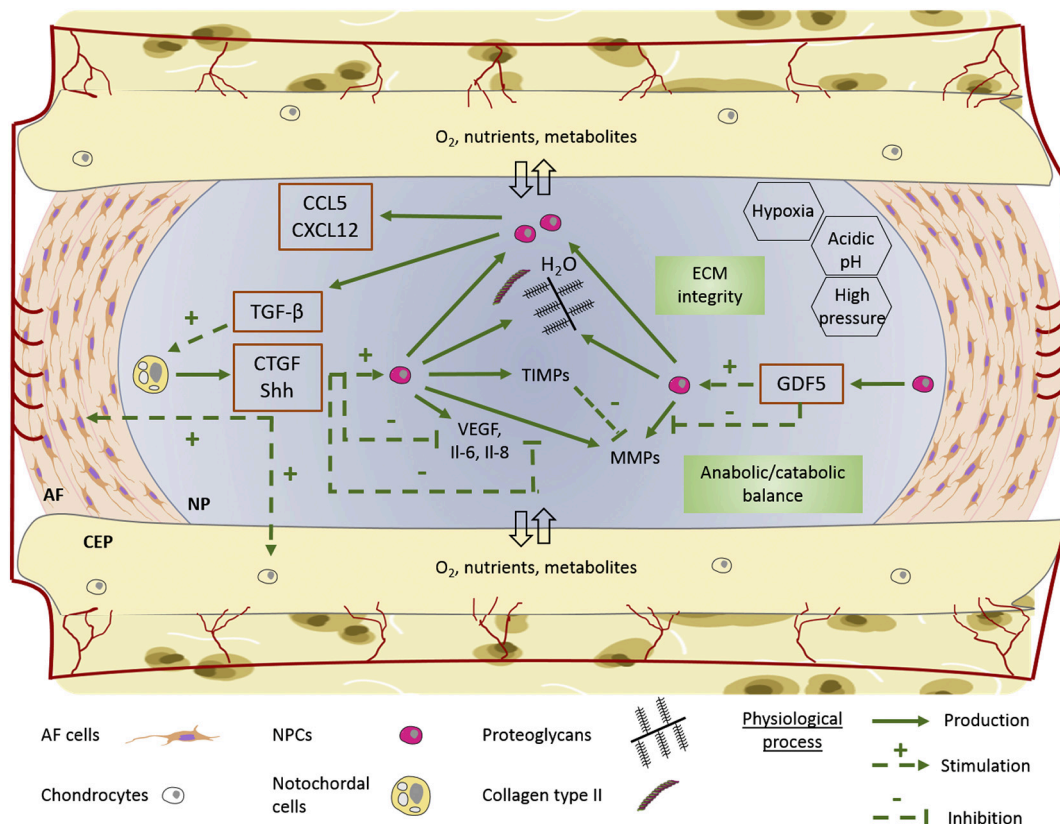


Fig. 1. Internal structure and the network of biological factors involved in homeostasis of young and healthy intervertebral discs (IVDs). The IVD is a hypovascular tissue that has three distinct components: the nucleus pulposus (NP), which is a gelatinous and hydrated structure at the center of the IVD; the annulus fibrosus (AF), which is a lamellar collagenic region that surrounds the NP; and finally two cartilaginous endplates (CEPs) that interface with the vertebral bodies. All of these components play a significant role in maintaining disc homeostasis. CEPs contain chondrocytes and enable oxygen, nutrient, and waste metabolite diffusion. The AF contains fibroblasts that are organized into a complex multilayer structure that constrains the NP and that provides the IVD with elastic properties. In the early years of human life, notochordal cells and nucleolpococytes (NPCy) communicate by secreting specific growth factors: CTGF, Shh, and TGF-β1, which regulate the anabolic/catabolic balance. Notochordal cells secrete CTGF and Shh to stimulate cell proliferation and the synthesis of ECM components such as aggrecan and type II collagen fibers. The TGF-β1 synthesized by NPCy acts in a self-regulatory loop that enhances CTGF expression by notochordal cells. Others biological factors synthesized by NPCy also play crucial roles in IVD physiology. Among them, GDF-5 boosts the proliferation and functions of the NPCy and ensures the balance of anabolic/catabolic events. **CTGF**: Connective tissue growth factor; **Shh**: Sonic hedgehog; **TGF-β**: Transforming growth factor β; **ECM**: Extracellular matrix; **CCL5**: C-C motif ligand 5, also called Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES); **CXCL12**: C-X-C motif chemokine Ligand 12, also called, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1); **VEGF**: Vascular endothelium growth factor; **IL-6 and -8**: Interleukin 6 and 8, **TIMPs**: Tissue inhibitors of metalloproteinases; **MMPs**: Metalloproteinases; **GDF5**: Growth differentiation factor-5.

cells [40]. Interestingly, NP is immune privileged, like brain, retina, testicles, and fetus. This means that the NP environment should be amenable to the introduction of foreign antigens without this necessarily causing an inflammatory immune response.

2.2. IVD extracellular matrix homeostasis

Under physiological conditions, the IVD dynamic structure is characterized by an anabolic/catabolic balance that ensures slow physiological turnover of the ECM by synthesis and degradation [41]. As mentioned above, this homeostasis is particularly dependent on a cellular dialogue between notochordal cells and the other disc cells that involves the following growth factors: CTGF, TGF-β, and Shh, as well as by other molecules such as growth factors that belong to the bone morphogenetic protein (BMP) family: BMP-2, osteogenic protein-1 (OP-1, also called BMP-7), and growth differentiation factor 5 (GDF5, also called BMP14), which promote the synthesis of ECM components and regulate MMPs production by NPCy. Catabolic factors, including MMPs and aggrecanases, a type of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin (ADAMTS) motif enzyme, participate in metabolic regulation of the tissue, along with TIMPs that regulate the action of these matrix-degrading enzymes [42].

2.3. IVD function

Physiological compressive loads applied to the spine are first distributed over the vertebral bodies and then transmitted to the IVDs along the spine. Indeed, in a healthy lumbar disc, the NP pressure varies between 91 kPa to 1300 kPa, depending on the lying, seated, or standing position [43]. As their biological and physical characteristics are highly related, the three specific regions of the IVD have complementary mechanical properties. In addition to its gelatinous aspect and hydrated nature, the NP is a highly deformable tissue that acts as a viscoelastic liquid that can absorb compression forces by variation of the osmotic pressure. This osmoregulation depends particularly on proteoglycans in the ECM and the water content that can both alter the height of the IVD [44,45]. The primary function of the AF is to contain and maintain the osmotic pressure imposed by the NP with its tensile strength. The structure of the concentric collagen lamellae of the AF provides natural resistance to flexion, torsion, and shearing [33,40]. Finally, as a result of their cartilaginous structure, the endplates provide a flexible entity that can support substantial loads and distribute the intradiscal pressure toward the adjacent vertebrae [46,47].

IVD is therefore a complex tissue with specific biological, physicochemical and mechanical properties, all possibly affected by degeneration mechanisms, making it particularly difficult to fully regenerate.

3. The pathophysiology of IVD degeneration

IVD degeneration or degenerative disc disease (DDD) is a multifactorial condition caused by aging, genetics, biomechanics, and environmental factors [48–54]. In all cases, a degenerated IVD exhibits dysregulation of its anabolic/catabolic balance and a decline in NP cell density [55,56]. Clinically, DDD is a progressive and chronic affliction, manifesting as low back and leg pains that result in a substantial degree of disability [57]. In severe cases, the DDD results in radiculopathies, stenosis, or hernia [45]. These painful symptoms are due to molecular and cellular changes in the tissue that compromise the mechanical properties of the IVD.

3.1. Cellular and molecular changes

With aging, the physiological processes of the IVD change naturally and the ability of the IVD to withstand mechanical stresses is reduced. Nevertheless, some factors accelerate these pathophysiological processes toward degeneration and drive aberrant responses in IVD cells [45].

On the one hand, several studies have highlighted the pivotal role of the disappearance of notochordal cells and the breakdown of their dialogue with NPCy in the establishment of a degenerative process, which correlates particularly with a low level of NPCy survival [23,58,59]. The NPCy undergo phenotypic changes, leading to an increase in factors that degrade the ECM and the production of pro-inflammatory cytokines, while, in parallel, there is a decrease in the level of anabolic factors and the synthesis of healthy ECM (Fig. 2) [60–62]. NPCy synthesize MMP-1, MMP-3, and ADAMTS, which inhibit aggrecan and type II collagen synthesis, thus leading to alteration of the ECM integrity [42,63,64]. Furthermore, an increase in IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 (PGE2)

synthesis by NPCy results in the stimulation of nerve growth factor (NGF) production. Combined with upregulation of VEGF in the degenerated NP, this generates abnormal nerve ingrowth and vascularization in this formerly avascular and non-innervated tissue that can lead to the generation of pain [65]. The induction of vascularization and the increase in chemokine synthesis by NP cells, particularly CCL2, 3, 4, 5, 7, and 13, CXCL10, and IL-8, stimulate the recruitment of immune cells that can populate the NP and produce IL-1 β and tumor necrosis factor α (TNF α) [65]. Together, these two major pro-inflammatory cytokines mediate catabolism and anti-anabolic metabolism inside the NP and participate greatly to the establishment and progression of the degenerative state of disc tissue [66,67]. IL-1 β and TNF α , which are synthesized by immune and IVD cells under degenerative conditions, are responsible for several metabolic impairments [68–70]. Indeed, IL-1 β and TNF α stimulate the production of MMPs and ADAMTS by NPCy and they suppress the expression of TIMPs (reviewed in [65]). In addition to these pro-catabolic actions, the alteration of matrix integrity is amplified by down-regulation of GDF-5 by IL-1 β and TNF α , thus reducing the synthesis of essential ECM components such as aggrecan and type II collagen. The decline in aggrecan and type II collagen content is associated with concomitant enhancement of the expression of type I collagen. The NP gradually loses its gelatinous and highly-hydrated aspect to become more fibrous and less elastic, thereby compromising its ability to exert its role as a hydraulic shock absorber [9,45,71,72].

On the other hand, calcification of CEPs (Fig. 2) has been observed with hypertrophy of chondrocytes, the occlusion of marrow spaces, and sclerosis, altering the energy supply/demand balance and reducing the rate of nutrient and metabolite diffusion [73–75]. The nutrient supply decreases whereas the demand increases with the recruitment of immune cells. This imbalance between demand and supply decreases the availability of nutrients to disc cells, thereby leading to adverse

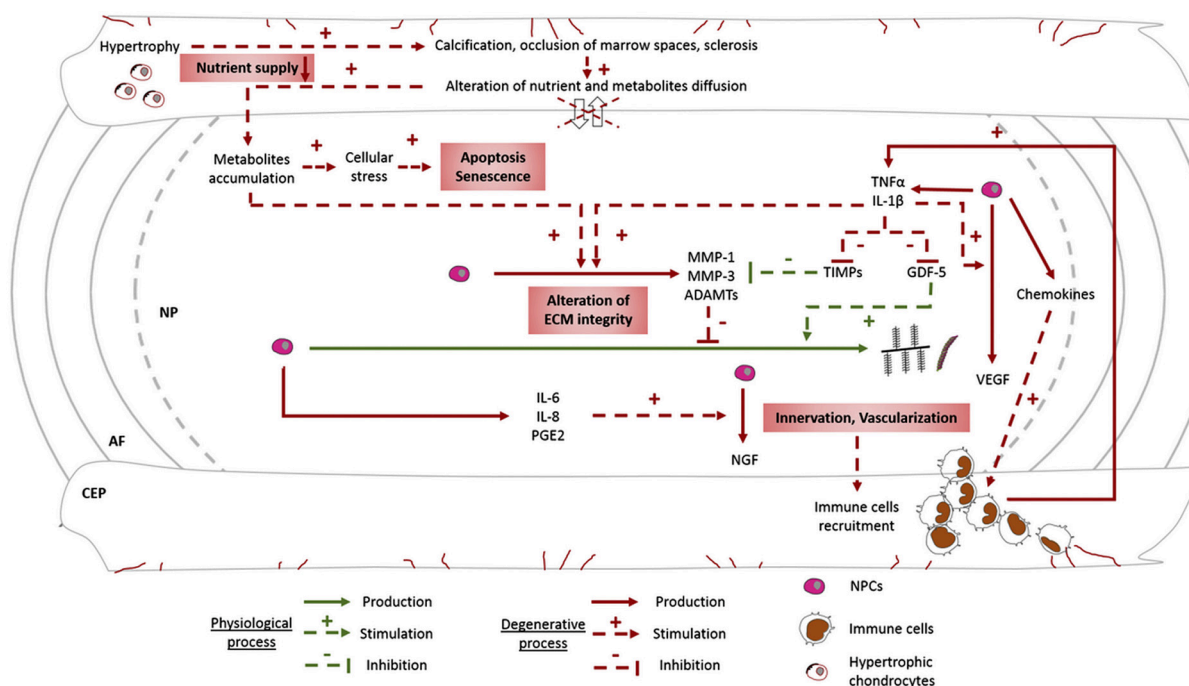


Fig. 2. Pathophysiological cascade in IVD degeneration. The dysregulation of homeostasis is a key element of IVD degeneration, with a significant decrease in the nucleolupocyte (NPCy) number combined with qualitative and quantitative changes in ECM components. Endplate calcification impedes diffusion paths, decreasing the nutrient supply to IVD cells and increasing the accumulation of metabolic waste within the tissue and it leads to NPCy phenotypic changes and ultimately senescence and apoptosis. Meanwhile, NPCy produce pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF α that boost the synthesis of MMPs and ADAMTS, which in turn inhibit the production of ECM components and drive changes in the ECM integrity. In parallel, the overexpression of IL-6, IL-8, and PGE2 by NPCy stimulates innervation and vascularization by NGF and VEGF, thereby generating IVD pain. This neo-innervation and neo-vascularization favor the recruitment of immune cells, which amplifies degeneration by stimulating the pro-inflammatory and anti-catabolic effects of TNF α and IL-1 β . The IVD degeneration processes thus amount to a self-perpetuating vicious circle that amplifies degeneration. **ECM:** Extracellular matrix; **IL-6 and IL-8:** Interleukin 6 and 8; **PGE2:** Prostaglandin 2; **MMP-1 and -3:** Metalloproteinases 1 and 3; **ADAMTS:** A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs; **NGF:** Nerve growth factor; **TIMPs:** Tissue inhibitors of metalloproteinases; **TNF- α :** Tumor necrosis factor α ; **IL-1 β :** Interleukin 1 β ; **GDF5:** Growth differentiation factor 5; **VEGF:** Vascular endothelium growth factor; **NPCy:** Nucleolupocytes.

effects on cellular activity and viability (reviewed in [76], [77]). In addition, a reduction of metabolite excretion and acidification of the IVD microenvironment occurs with the calcification of CEPs, thus resulting in cellular stress that stimulates the apoptosis and senescence of NPCy [78]. The accumulation of metabolites in the NP boosts the production of MMPs and ADAMTS, thereby further increasing the degradation of ECM components.

Eventually, the ECM of the AF also becomes weaker as collagen fibers become irregular and thinner, and disorganization of its concentric structure occurs with the possible formation of fissures. Finally, these matrix changes lead to disruption of the mechanical forces sensed by the surface mechanoreceptors of AF cells, thereby leading to their apoptosis [79,80].

3.2. Structural and mechanical changes

IVD degeneration involves cellular, molecular, and inflammatory mechanisms that lead to pronounced structural, physical, and mechanical changes that give rise to the patient's pain. Dehydration of the NP results in loss of its mechanical properties and an increase in the tensile forces exerted on the AF [81]. Consequently, the AF can tear, while in severe cases expulsion of the NP (disc herniation) can occur, which is often accompanied by significant low back and leg pain due to compression of the adjacent nerve root [78,82]. The inner AF can also suffer damage, followed by nerve ingrowth and secretion of inflammatory factors that amplify the degenerative cascade and the patient's pain. Finally, calcification of CEPs alters their mechanical characteristics and makes them less flexible [74].

3.3. Diagnosis and current treatments of discogenic LBP

The diagnosis of DDD is mainly based on the occurrence of low back pain, and is then confirmed by complementary imaging analysis (e.g., X-rays, CT scan, or magnetic resonance imaging (MRI)) to evaluate the severity of the degeneration by assignment of a score [83–85]. This scoring is based on the hydration state of the NP and the IVD height (Pfirschnig) or on the CEP aspect (Modic) [86–88]. The currently available treatments for IVD degeneration are conservative and focused on reduction of the pain by physical therapy, analgesia, or anti-inflammatory drugs and, in severe cases, by invasive surgical procedures such as spinal fusion or arthroplasty [89–94]. Despite positive effects on the patient's pain, the long-term efficacy of these pharmaceutical and surgical therapeutic strategies remains moderate and unreliable, with a high risk of vertebral body fractures and degeneration of adjacent levels [95,96]. Hence, based on recent improvements in the understanding of disc pathology, innovative therapeutic approaches have been devised with the aim to prevent, reduce the rate, or even reverse the IVD degenerative cascade.

4. Innovative bioinspired therapeutic strategies

IVD degeneration is the result of complex pathological processes involving cellular, molecular, inflammatory, structural, and mechanical mechanisms that cause dysregulation of the tissue homeostasis, as evidenced by alteration of ECM components, abnormal enzymatic activity, the production of pro-inflammatory factors, and a dramatic decrease in cell density. The ECM profoundly affects the phenotype and behavior of cells through various signaling pathways. Unhealthy cells and unhealthy ECM are interconnected, leading to a vicious circle of degeneration (reviewed in [97,98]). Thus, restoring a healthy cell-ECM dialogue appears to be paramount to reverse or reduce the rate of IVD degeneration. The main common hypothesis for innovative therapeutic strategies for regenerating IVDs is based on restoration of the homeostatic mechanism by readjustment of anabolic/catabolic events in the NP [14,99]. With this aim in mind, the regenerative potential of various minimally-invasive approaches based on the injection of specific

therapeutic agents in the NP microenvironment to counteract the degeneration have been evaluated. Almost all the studies have been performed using the trans-annular route to directly inject therapeutics into the NP, with reported issues of material leakage after needle removal, permanent AF lesions, osteophyte formation and accelerated degeneration. The transpedicular approach has been recently described as an alternative route, but long term effect on the endplate integrity has not been evaluated yet [100,101]. Anti-catabolic and/or anti-inflammatory strategies have been investigated, such as halting or minimizing the inflammation and the degradation of the ECM. Conversely, pro-anabolic treatments to repopulate the NP with specific cells and/or stimulation of the production of healthy ECM by cells have been tested, with the aim of re-establishing a healthy cell/ECM synergy.

4.1. Anti-catabolic and anti-inflammatory strategies

Inhibition of both the catabolic and the inflammatory cascades could be a promising therapeutic approach to prevent the degradation of the ECM and the alteration of resident IVD cells, thus attenuating the adverse effects of the degenerated IVD microenvironment. The regenerative effect derived from the injection of anti-catabolic or anti-inflammatory factors has been investigated by *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies, as summarized in Table 1. Inhibition of catabolic enzymes (i.e., MMPs and ADAMTS) has been carried out either by direct suppression of their activities or by regulation of their inflammatory mediators (i.e., TNF- α and IL-1 β). The use of short non-coding sequences of nucleotides that control ribonucleic acid (RNA) silencing, translation, or degradation, appears to be an attractive option for IVD regeneration as the dysregulation of many processes during IVD degeneration includes micro-RNAs (miRNAs) involved in MMPs overexpression, pro-inflammatory cytokine upregulation, and other catabolic events. However, the potential of such therapeutic small interfering RNAs (siRNAs) and miRNAs (reviewed in [102]) may be limited due to their *in vivo* degradation by endonucleases. On the other hand, suppression of the ADAMTS5 gene by injection of anti-ADAMTS5 siRNA oligonucleotide in the lumbar IVDs of a rabbit annular needle-puncture model revealed improvement of both the Thompson and histological grade scores at two months [103]. Direct injection, in a rabbit annulotomy model, of adeno-associated virus serotype 2 (AAV2) carrying the gene for TIMP-1, which is an MMPs inhibitor that is downregulated in disc disease, resulted in less MRI and histological evidence of degeneration, albeit without statistical significance, compared to the puncture group at three months, combined with a significant decrease in the degradation of type II collagen [104]. Other strategies that are focused on the inflammatory pathway have sought to reduce the expression and activity of inflammation mediators such as TNF and interleukins. Clinical studies have been performed on LBP patients with or without sciatica, radiculopathy or IVD herniation, to evaluate the role of anti-TNF α intradiscal injections, which are used clinically in polyarthritis rheumatoid treatments. Etanercept (Enbrel®, a recombinant TNF receptor), adalimumab (Humira®, a human monoclonal antibody directed against TNF α) and infliximab (Remicade®, a chimeric monoclonal antibody directed against TNF α) can neutralize the biological activity of TNF α and have been shown to reduce pain based on a reduction on visual analog scales (VAS) of intensity and Oswestry disability indexes (ODI) [105–110]. Nevertheless, no significant reduction of the need for surgical procedures has been shown to date. The antagonist of IL-1 receptor, IL-1Ra, has also been investigated due to its ability to inhibit IL-1 β inflammatory activity, and an attenuation of the degradative effects of MMPs was observed *in vitro* and by *ex vivo* analysis performed on human degenerated IVD. [111,112].

IL-6, IL-8, and PGE2 pathways are also promising targets for anti-catabolic treatment of IVD degeneration. Firstly, *in vitro* studies performed on human IVD cells cultured with anti-TNF α found that there was a decrease in IL-6, IL-8, and PGE2 expression levels, hence suggesting that therapeutic effects of anti-TNF α could be mediated by these

Table 1
Anti-catabolic/anti-inflammatory strategies for the regeneration of IVD.

	Factor	Model	Study design	Effects	Ref
Anti-cytokines	anti-TNF α : Infliximab	Human IVD cells cultured with TNF α [114] Induced IVD degeneration rat model [313]	In vitro study [114] In vivo study of 6 weeks – by intradiscal injection [313]	Reduction of IL-6, IL-8, IL-1 β expression levels [114] Decrease of pain and semi-quantitative IVD degeneration grading scale [313]	[114,313]
	anti-TNF α : Infliximab [110] Etanercept [53,105,109] Adalimumab [106,107]	Chronic discogenic low back pain patients with severe sciatic [105,110] or radicular pain [53,106,107]	Clinical study from few months [53,105,107,109,110] to 3 years [106] follow-up about 20, 50, 143 or 265 patients – by single intravenous [110], 2 or 3 subcutaneous [105–107], 1 perispinal [109] or 2 transforaminal epidural injections [53]	Reduction of patient's pain and VAS intensity [105,109] Small decrease [106,107] or no reduction of the need of surgical procedures [110]	[53,105–107, 109,110]
	Anti-IL-6 receptor: Tocilizumab	Patients with discogenic LBP [314,315] and spinal stenosis [314]	Clinical study of few month follow-up on 60 patients – by epidural infiltration into the spinal nerve [314] or intradiscal injection [315]	Reduction of LBP, leg pain and leg numbness without adverse event [314] Improvement of ODI and NRS [315]	[314,315]
Anti-proteases	anti-ADAMTS5 oligonucleotide TIMP-1	Induced IVD degeneration rabbit model Induced IVD degeneration rabbit model	In vivo study of 8 weeks – delivered by intradiscal injection In vivo study of 12 weeks – delivered by AAV vector intradiscally injected	Improvement of MRI and histologic grades Improvement of MRI grades, histological observations, serum biochemical analysis and biomechanical properties	[103] [104]
Inhibitors of signaling pathways	anti-TNF α : soluble TNF receptor type II	Human IVD cells cultured with TNF α	In vitro study	Attenuation of the inflammation Reduction of TNF α , NO and PGE2 levels	[113]
	IL-1 receptor antagonist: IL-1Ra Inhibition of p38 MAPK activity	Degenerated human IVDs from surgical patients Human degenerated NP cells cultured with IL-1 β or TNF α	Ex vivo study of 2 weeks – delivered directly or by AAV intradiscally injected In vitro study with alginate beads	Attenuation of the matrix degradation Reduction of PGE2 and IL-6 production Increase in the TIMP-1 / MMP3 ratio	[112] [316]
	Triptolide [116] Bovine lactotransferrin [317]	Human [116,317] or bovine [317] degenerated IVD cells pre-treated by IL-1 β or rabbit IVD organ model cultured with IL-1 [317]	In vitro studies [116,317] – cultured with cells in alginate beads [317] or ex vivo study [317] – by intradiscal injection	Inhibition of IL-6 [116,317], IL-8 [116], PGE2 [116], MMPs [116,317], ADAMTS [317], toll-like receptors -2 and -4 expression [116,317] Increase in PGs [317], aggrecan and collagen II [116] expression	[116,317]
	Lovastatin	Induced IVD degeneration rat model	In vivo study of 4 weeks – by intradiscal injection	Up-regulation of GAG, aggrecan, collagen type II, Sox9 and BMP-2 expression Decrease in collagen type I	[117]
	Wogonin	Rat NP cells treated with IL-1 β Induced IVD degeneration rat model	In vitro study In vivo study of 8 weeks	Suppression of iNOS, IL-6, COX2, MMPs and ADAMTS expression Up-regulation of collagen type II	[318]
	Inhibitors of NF- κ B: Nemo Binding Domain (8K-NBD) peptide	DNA repair-deficient mouse model of accelerated aging (Ercc1- Δ mice)	In vivo study of 25 months- by 3 intraperitoneal injections per week	Increase in disc cellularity and PGs synthesis	[119]

TNF α : Tumor necrosis factor α , **IL-6**: Interleukin 6, **VAS**: Visual analogue scale, **ODI**: Oswestry disability index, **NRS**: Numeric rating scale, **ADAMTS5**: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin Motifs 5, **MRI**: Magnetic resonance imaging, **TIMP-1**: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, **NO**: nitric oxide, **PGE2**: Prostaglandin E2, **IL-1Ra**: Interleukin 1 receptor antagonist, **AAV**: Adeno-associated viral vector, **MAPK**: Mitogen-activated protein kinases, **COX2**: Cyclooxygenase 2, **PGs**: Proteoglycans, **LBP**: Low back pain

cytokines [113,114]. In LBP patients, intradiscal injection of tocilizumab, which is a humanized monoclonal antibody directed against the IL-6 receptor, has been shown to result in similar effects as those observed with anti-TNF α injections, with a reduction in pain without any adverse effects. On the other hand, blocking p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) that are involved in IVD cell apoptosis appears to have potential to help reduce the vicious catabolic circle in human degenerated NP cells, including a decrease in PGE2 levels and IL-6 induction by IL-1 β and TNF α [115]. Of note, some molecular entities, such as triptolide from traditional Chinese medicines [116], lovastatin [117], and the synthetic NSAID diclofenac [118], have exhibited encouraging effects on catabolism, with down-regulation of pro-inflammatory cytokines and proteolytic enzymes, combined with a pro-anabolic action on the NP microenvironment [117,118]. Moreover, inhibition of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), which is involved in the control of cell survival and cellular responses to stress, has been reported to lead to an increase in cell density

and proteoglycan synthesis after intraperitoneal injection in a mouse model of accelerated aging [119].

Overall, these results indicate that while anti-catabolic and anti-inflammatory therapeutic approaches appear to have ample potential, they are not yet sufficiently robust to result in full regeneration of the IVD. Indeed, the reduction of catabolic events did not restore the anabolic function of the tissue, nor has rehydration or restoration of IVD height been observed. Despite the improvement in the IVD microenvironment and the decrease in tissue inflammation, resident cells failed to fully restart the disc biological machinery and synthetic activities.

4.2. Pro-anabolic strategies

4.2.1. Pro-anabolic molecules

The induction of ECM biosynthesis may also prove to be an effective strategy, as shown by studies in which the disc was supplemented with

Table 2
Pro-anabolic strategies for the regeneration of IVD.

	Factor	Model	Study design	Effects	Ref
Growth Factors from TGF β superfamily	BMP-2	Rat AF cells	In vitro studies	Increase in aggrecan [132,133], collagen type II [132,133], mRNA levels [132,133], cell number [132], Sox9 [132], osteocalcin [132], TGF- β 1 [133], OP-1 [133] and sGAG production [132]	[132,133]
	BMP-2	Induced IVD degeneration rabbit model	In vivo study of 2 months - delivered by AAV vector	Improvement of histological grades, MRI indices, serum biochemical analysis and biomechanical properties	[104]
	OP-1	Rabbit [120–122] or human [123,124] IVD cells	In vitro studies – cultured in alginate beads with IL-1 [120], chondroitinase ABC [121] or TNF α [124]	Increase in PGs and collagen production [120–124] and accumulation [123] Increase in cell number, aggrecan and collagen type II mRNA levels [121]	[120–124]
	OP-1	Healthy [125] and induced IVD degeneration rabbit model [126–128,130]	In vivo studies of 2 [127,128], 3 [125,130] or 6 [126] months on 10, 20 [125,127,128] or 90 [126] rabbits - by intradiscal injection	Blocking of the TNF α effects on activation of NF κ B, ADAMTS-4 and -5 and ECM degradation [124] Improvement of disc height [125,126,128,130] Increase in PGs [125–128] and collagen [127] production in NP Increase in DNA content in AF [128] Suppression of IL-6, 1 β and TNF- α expression in AF and NP [130]	[125–128,130]
	OP-1	Induced IVD degeneration rat model	In vivo study on 34 rats - intradiscal injection	Reduction of aggrecanases, MMP-13 and substance P	[129]
	OP-1	Spontaneous IVD degeneration canine model	In vivo study of 6 months- by intradiscal injection	No regenerative effect and extensive extradiscal bone formation	[131]
	GDF-5	GDF-5 deficient mice IVD cells [135] rabbit [136], human [136], mouse [137] and bovine [138] IVD cells	In vitro studies – directly delivered in medium [135,137,138] or by cells transfection via AAV vector [136,137]	Up-regulation of aggrecan and collagen type II protein [136,138] and gene [135,137] expression Stimulation of IVD cells growth [136–138] Decrease in MMP-3 gene expression [137]	[135–138]
	GDF-5	Spontaneous [140] or induced [138,139] IVD degeneration rabbit [138,140] or mice [139] models	In vivo studies of 2 [139], 3 [140] and 4 [138] months - by directly [138,140] or AAV vector [139] intradiscal injection	Restoration of disc height [138–140], histologic grading [138–140] and MRI [138–140]	[138–140]
	GDF-5	Patients with early lumbar disc degeneration	Clinical trials of 36 months on 30 [319–321] or 40 patients [322] - by single intradiscal injection	Safety, tolerability and efficacy studies	[319–322]
	TGF- β 1 [141,145] or 3 [142]	Rat [145], bovine [141] or porcine [142] IVD cells	In vitro studies – cultured with cells on microfibrillar PLLA scaffold [141] or porous alginate scaffold [142]	Increase in CTGF expression and cell activity via SMAD and AP1 pathways signaling [145] Sustained stimulation of ECM synthesis GAG- and collagen rich [141,142]	[141,142,145]
	TGF β 1	IVD degeneration canine [143] or rabbit [144] models	Ex vivo study of 4 days In vivo study of 1 week on 22 rabbits - by AAV/TGF- β 1 intradiscal injection	Increase in PGs synthesis by NP cells [143,144] Production of TGF- β 1 in IVD in vivo [144]	[143,144]
	IGF-1	Bovine coccygeal [146,147,149] or degenerated human [147] IVD cells Degenerated caudal IVD bovine culture organ model [148]	In vitro studies [146,147,149] Ex vivo study of 14 days - by AAV transfection of BMSCs deposited onto IVD [148]	Increase in PGs synthesis by NP cells [146,148] and DNA synthesis in quiescent IVD cells [149] Reduction of cell apoptosis [147] Stimulation of the IVD cell proliferation via the ERK and Akt signaling pathways [149]	[146–149]
	PDGF-BB	Human degenerated IVD cells	In vitro study - cultured with cells in monolayer and 3D pellet	Inhibition of cell apoptosis and increase in cell proliferation and matrix production	[150]
Transcription	CTGF	Human degenerated NP cells	In vitro study - cultured with IL-1 β or TNF α	Maintenance of ECM genes mRNA expression Suppression of the inductive effect of IL-1 β on catabolic genes (MMP-3, ADAMTS-5)	[323]
	Sox 9	Human [151] or bovine [152] degenerated IVD cells IVD degeneration rabbit model [151]	In vitro studies [151,152] In vivo study [151] of 5 weeks on 4 rabbits - by AAV cell transfection	Increase in PGs [152] and collagen type II [151,152] synthesis and accumulation Increase in cell proliferation and DNA content [152] Histological preservation of NP morphology and NP cell phenotypic appearance [151]	[151,152]
	Andrographolide	Human degenerated NP cells	In vitro study – cultured with LPS	Reversion of the inflammatory and catabolic effects, inhibition of the NF- κ B pathway and increase in GAG secretion	[324]
Synthetic biological agent	Link N peptide	Human [164] or rabbit [163] IVD cells	In vitro studies – cultured with cells on peptide nanofiber [163] or alginate scaffold with IL-1 [164]	Increase in PGs [164], aggrecan [163] and collagen type II [163] synthesis and accumulation Decrease in MMPs and ADAMTs levels [164]	[163,164]
	Link N peptide	Induced IVD degeneration rabbit model	In vivo study of 12 weeks on 28 rabbits - by intradiscal injection	Stimulation of aggrecan gene expression and downregulation of MMPs expression	[161]
Combination of GFs	NTG-101 (TGF- β 1 + CTGF)	Induced IVD degeneration rat and canine models	In vivo study of 6 or 10 weeks – by intradiscal injection	Reduction of IL-1 β , -6, -8, MMP-13, Cox-2 and PGE2 expression	[325]
	TGF- β 3 + Kartogenin	Human ASCs	In vitro study - loaded with hASCs in chitosan/HA hydrogel	Increase in aggrecan and collagen type II expression Stimulation of hASCs proliferation and differentiation into NP-like cells in hydrogel	[272]
				No synergic effect observed	

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Factor	Model	Study design	Effects	Ref
TGF- β 1 [166–168] or 3 ⁶³ + BMP-2 [166–168] + IGF-1 [166]	Rabbit [167], porcine [168] or human degenerated [166] IVD cells	In vitro studies – cultured with IVD cells on atelocollagen type II scaffold [167] with IL-1 β and TNF α [168] or on alginate beads [166]	Synergistic effects [166–168] Increase in DNA ⁵³ , synthesized PGs [166–168], aggrecan, collagen type I and II genes expression [167] Decrease in IL-1 β -mediated MMP-1 synthesis [168]	[166–168]
TGF β 3 + FGF 2	Human degenerated AF cells	In vitro study – cultured with cells in HA hydrogel	Formation of cartilaginous matrix and enhancement of MMP-13 expression	[169]
TGF- β 1 + GDF-5	Human ASCs [59] or induced IVD degeneration murine model [172]	In vitro study [59] – cultured on 3D In vivo study [172] – by intradiscal injection	Synergistic effects [59,172] Drive a robust and highly specific NP differentiation [59] Increase in protein and genic expression of NP markers and synthesis of NP-like ECM [59,172] Temporary increase in cell proliferation and DHI [172]	[59,172]
GDF-5 + CTGF	Human degenerated NP cells	In vitro study	Increase in aggrecan and collagen type II gene expression and GAGs production	[326]
OP-1 + SOX9	IVD degeneration rabbit model	In vivo study of 9 weeks - by AAV double gene co-transfection intradiscally injected	Improvement of DHI and T2-signal intensity Increase in aggrecan and collagen type II gene and protein expression	[171]
PRP	Human [154,156] and porcine [155] NP cells	In vitro study – cultured with cells in alginate beads [155] or with IL-1 β and TNF α [154,156]	Proliferation and aggregation of IVD cells [154,155] Upregulation of PGs and collagen synthesis [155] and GAG accumulation [154] Up-regulation of aggrecan [154,156], collagen type II [154,156] and Sox9 [154] mRNA expression levels Decrease of MMP-1 and COX-2 gene expression levels [156]	[154–156]
PRP	Induced IVD degeneration rabbit model	In vivo studies of 6 [158] or 8 [157] weeks - by intradiscal injection	Increase in disc height and chondrocytes-like cells number [157] Delay of degeneration process and decrease in ECM lesions [158] Increase in collagen type II expression in NP and inner AF [158]	[157,158]
PRP [160] + SVF [159]	Patients with chronic DD	Clinical trials of 12 months on 15 [159] or 47 patients [159] - by intradiscal injection	Improvement of pain, disability, quality of life and mobility of IVD No adverse effects and incidences of infection	[159,160]
Combination with cells Link N peptide + exogenous MSCs	Induced IVD degeneration bovine model	Ex vivo study of 2 weeks - by intradiscal injection	Increase in sGAG, PGs, and collagen type II production Survival, integration and distribution throughout the NP of MSCs	[165]
PRP + BM-MSCs	Induced IVD degeneration rabbit model	In vivo study of 8 weeks - by intradiscal injection	Rapid and stable improvement of MRI scores and T2 signal intensity Increase in cell density and ECM production with synthesis of collagen type II	[243]

BMP-2: Bone morphogenetic protein 2, **OP-1:** Osteogenic protein 1, **GDF5:** Growth differentiation factor 5, **TGF- β :** Transforming growth factor β , **IGF-1:** Insulin-like growth factor 1, **PDGF-BB:** Platelet-derived growth factor BB, **CTGF:** Connective tissue growth factor, **FGF-2:** Fibroblast growth factor 2, **PRP:** Platelet-rich plasma, **SVF:** Stromal vascular fraction, **MSCs:** Mesenchymal stem cells, **BM-MSCs:** Bone marrow mesenchymal stem cells, **AAV:** Adeno-associated viral vector, **PLLA:** poly(L-lactide).

anabolic agents, mostly growth factors, that regulate the survival, proliferation, and fate of cells (Table 2). Numerous in vitro studies have focused on the effect of OP-1 (BMP-7) on degenerated rabbit or human IVD cells, and they have reported a consistent increase in proteoglycans, aggrecan and type II collagen gene expression levels [120–124]. These in vitro results have been confirmed by in vivo investigations over periods of up to 6 months in various preclinical models, including induced IVD degeneration models in rabbits and rats, as indicated in Table 2 [125–130]. Partial improvement in the disc height index (DHI) has often been noted, suggesting that rehydration of the NP is probably related to the presence of more PGs in the tissue. However, after the intradiscal injection of OP-1, extradiscal bone formation has also been reported to occur, notably in a spontaneous canine early IVD degeneration model [131]. Beneficial results on in vitro ECM synthesis by rat AF cells [132,133] and improvement of MRI scores in an in vivo rabbit IVD degeneration model have also been observed upon bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) treatment [104]. Interestingly, the biomechanical properties also sometimes improved after these pro-anabolic GF injections, with significant increases in the viscous, stiffness, and elastic properties of the treated IVDs [104,127]. GDF-5, which belongs to the same BMP family, has also undergone extensive assessment for use in disc treatments. Indeed, it has been shown that GDF-5 is essential for disc development, and it occurs naturally in IVD tissue [134], which

makes it a highly suitable potential candidate for boosting a regenerative effect. In vitro treatment of IVD cells from various mammals with GDF-5 has been reported to increase the protein and gene expression levels of aggrecan and type II collagen as well as cell proliferation and the DNA content [135–138]. In vivo studies in rabbit, mice, or rat IVD degeneration models using GDF-5 injections have shown a partial restoration of IVD height with significant improvement of MRI and histological grading scores as early as 16 weeks post-injection [138–140]. Therefore, four clinical trials have taken place with patients who had at least one symptomatic lumbar level (L3/L4 to L5/S1) confirmed and who were suffering from persistent LBP with at least three months of non-surgical therapy. These clinical trials lasted 12 months, with follow-up at 36 months to evaluate the safety, tolerability, and preliminary effectiveness of a single injection of GDF-5 (0.25 mg to 2.0 mg) (NCT01158924, NCT00813813, NCT01182337, and NCT01124006 on <https://clinicaltrials.gov>). In three of these four trials, no major adverse events directly related to GDF-5 injection were observed. The patients reported moderate improvement of their pain and disability. To our knowledge, the results of these clinical trials have not yet been published. TGF- β is another essential factor for IVD development and physiology that has been assessed as a potential therapeutic factor for restoring disc biological functions. In vitro and ex vivo studies have demonstrated a similar impact of TGF- β treatment compared to

GDF-5, with an increase in PGs and collagen synthesis [141–144]. In particular, TGF- β has been shown to increase CTGF expression along with an enhancement of cellular activity via SMAD-3 and AP1 (activator protein) pathways [145]. Growth factors such as insulin-like growth factor (IGF-1) [146–149], platelet-derived growth factor (PDGF) [149,150], fibroblast growth factor (FGF) [149], and the transcription factor Sox9 [151,152] have also been investigated, and anabolic effects on ECM synthesis have been noted, along with cell proliferation and reduced apoptotic activity. In particular, Sox 9 and IGF-1 led to an increase in proteoglycan and collagen synthesis in the NP [146,151–153].

Partially beneficial outcomes on IVD matrix biosynthesis after injection of a single growth factor has led to the notion of using a concentrated form of these growth factors, such as platelet-rich plasma (PRP). PRP activates the proliferation of human and porcine NP cells and it upregulates the synthesis of aggrecan and type II collagen [154–156]. Injection of autologous PRP in an induced-IVD degeneration model in rabbit delayed the IVD degeneration and partially restored the disc height by stimulation of the synthesis of PGs, type II collagen, as well as cell proliferation [157,158]. Following these encouraging results in rabbits, clinical trials have been carried out with patients affected by moderate to severe discogenic LBP refractory to conventional treatments. Intradiscal injection of autologous PRP, with or without stromal vascular fraction (SVF), resulted in an improvement in pain relief and mobility as well as a reduction of disability [159,160].

Link-N peptide, which is an alternative bioactive entity that is less expensive as it is produced synthetically, has been shown to exert growth factor-like effects. Link-N naturally stabilizes PG aggregates in cartilaginous tissues, such as IVD, and it is expressed in vivo during tissue turnover [161,162]. Human and rabbit IVD cells treated with Link-N produced more PGs and type II collagen, and showed down-regulated MMP and ADAMTS expression compared to non-treated cells [163–165]. These encouraging results appear to confirm that combined therapies are superior to single-target approaches to achieve a higher level of restoration of disc homeostasis. Some studies have already combined different biological factors in order to simultaneously operate on different biological targets (Table 2). Thus, the aim is to enhance the therapeutic effects of these distinct biological factors by delivering them concomitantly. Of the cocktails assessed to date, BMP-2 and TGF- β 1 have undergone testing in several in vitro studies. Their synergistic effects have been shown to stimulate the synthesis of PGs by human, rabbit, and pig degenerated IVD cells, enhance gene expression of aggrecan and collagen, and increase DNA synthesis [166–168]. Moreover, association with a third growth factor, IGF-1, further enhanced the anabolic effect on PG synthesis [166]. Interestingly, BMP-2 coupled with TGF- β 1 exhibited an additional anti-catabolic effect on porcine AF cells cultured with pro-inflammatory cytokines, which was probably due to a decrease in IL-1 β and MMP-1 expression [168]. Other growth factor cocktails comprising TGF- β 1 and FGF2 [169] or GDF-5 and CTGF [170], have been shown to result in a similar in vitro enhancement of ECM synthesis by degenerated human IVD cells. An in vivo gene therapy study performed in a rabbit IVD degeneration model indicated that intradiscal injection of AAV-mediated OP1 and SOX9 double gene co-transfection had a positive therapeutic effect, with the partial restoration of IVD height and a greater T2-signal intensity due to increased aggrecan and type II collagen gene and protein expression [171]. Interestingly, a synergistic action of TGF- β 1 and GDF-5, which have been shown to drive robust differentiation of human adipose stromal cells into NPCy cells [59], has been reported to have beneficial effects, with improved cell proliferation, specific gene expression, and partial restoration of IVD height following their intradiscal injection in degenerated murine caudal discs [172].

To achieve an ad integrum biological repair of IVD, the presence of cells able to respond to pro-anabolic factors is an essential requirement. Indeed, since most approaches are based on the stimulation of cellular biological functions, the presence of healthy cells in the diseased microenvironment appears to be paramount to ensure

that these pro-anabolic strategies have a sufficient degree of efficacy. However, as previously described, during IVD degeneration there is a decline in the cell density in the NP, which becomes more pronounced as the degeneration increases in severity. Therefore, the few cells that remain are in an unfavorable environment and subject to constant biological stresses, with the consequent impairment of their synthetic capacities. These pro-anabolic approaches to restoration of IVDs are hence greatly limited by the lack of healthy cells in the NP during IVD degeneration. In light of these shortcomings, NP supplementation with functional cells has been widely recognized by the scientific community as a particularly relevant approach for the restoration of disc homeostasis.

4.2.2. Cell supplementation

4.2.2.1. Endogenous cell recruitment followed by mobilization.

Stem/progenitor cells have recently been described in healthy and degenerated IVD tissues in different mammals, including humans, rabbits, minipigs, and rats [173–177]. There is still no consensus on the phenotypic profiles of these progenitor cells, although Tie-2 and NOTCH-1 have been reported by several groups [174,178,179]. Resident stem cells are localized in several anatomical regions of the IVD (the CEP, AF, and NP). They express mesenchymal stem cell (MSC) markers, such as CD44, CD90, CD105, CD73 (reviewed in [102]), and have been shown to resemble bone marrow MSC (BM-MSCs) [173,175–177,180–182]. Stem cells from the CEP, AF, and NP have been isolated and their phenotypic profiles, capacities for differentiation into the mesenchymal lineage, and abilities to migrate have been compared [183–185]. The chondrogenic differentiation properties of CEP-MSCs were better than those of NP- or AF-derived MSCs, and they were even superior to BM-MSCs [184,186]. CEP-MSCs also exhibited greater migration and invasive properties [183]. Thus, CEP-MSCs are likely to represent a potential source of endogenous reparative cells. Endogenous repair, as an alternative to cell-based therapies, has already been reported for the regeneration of other tissues, such as cartilage, tendon, and heart [183,187–189], while it has only recently been considered for degenerated discs [190]. With the proximity of stem cell niches around the peripheral IVD (the perichondrium region and the AF border to the ligament zone) and the decreasing gradient of stem/progenitor cells from the CEP to the NP, potential migration patterns toward the degenerated NP have been suggested [173,191,192]. In order to recruit the stem/progenitor cells toward the NP tissue, the specific chemokines regulated and normal T cell expressed and secreted (RANTES), also called C-C motif ligand 5 (CCL5), and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), also called C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12), have been investigated. CCL5 is overexpressed by degenerative bovine [193] and human IVD cells [194], and it enhances the migration of BM-MSCs. In parallel, MSCs have been reported to express chemokine receptors and, more especially, human discal stem cells have been shown to express these chemokines receptors, with an increase of CXCR4 expression, which is the CXCL12 receptor, in MSCs isolated from endplates [183]. In light of the results demonstrating a superior response in terms of CEP-MSCs migration compared to AF-MSCs and NP-MSCs, recruitment followed by the mobilization of MSCs from the CEP towards the NP has been evaluated, as well as the regenerative and pro-anabolic impact. Ex vivo studies performed in a bovine nucleotomized IVD degeneration model have shown that it is possible to stimulate the migration of MSCs from the CEP toward the NP, thereby boosting ECM neosynthesis [195,196]. In summary, these resident disc stem/progenitor cells constitute a reservoir of potential reparative cells that could be an alternative to the injection of exogenous cells. They could be recruited from the vicinity of the disc toward the center of the degenerated IVD by the injection of chemokines into the NP tissue. However, their number and regenerative potency have been shown to decrease with age and DDD [178], thus limiting the use of these endogenous cells to repopulate the NP in severe cases of DDD and in elderly patients. Hence, in these cases of late IVD

degeneration, recourse to exogenous cell injections appears to be a better option.

4.2.2.2. Injection of exogenous cells. A variety of potential sources for the replacement of NP cells have been explored in the past two decades, although no consensus has been reached regarding the ideal cell population for regeneration of IVDs [197]. Cell candidates that can replace the degenerated disc cells and act as metabolically active disc cells include IVD-derived cells (healthy NPCy and AF cells), cells with an NP-like phenotype that are able to synthesize cartilaginous ECM (e.g., chondrocytes from articular cartilage), and stem/progenitor cells with the ability to differentiate into NP cells (e.g., MSCs or induced pluripotent stem cells) [99,102,197,198]. The most rational approach involves the use of native disc cells to repopulate the degenerated IVD. Autologous NP cell transplantation has been assessed in several *in vivo* studies that were performed in a number of different types of animal models. Doing so delayed the degenerative progress, sometimes promoting regeneration after injection, and the production of type II collagen (reviewed in [199]). Clinical trials have since been performed in patients undergoing spinal fusion in adjacent IVDs, and the safety and the effectiveness in terms of the decrease in the patient's pain after autologous cell injection have been described with a two-year follow-up [200–202]. Despite encouraging results, this strategy is nonetheless greatly limited by the low availability of such IVD-derived cells and the associated risk of donor site morbidity [200,202,203]. Human IVD cells have so far only been harvested from adjacent discs or from herniated discs, which were certainly degenerated and consequently compromised by a low metabolic activity [204]. To boost the biological activity of such cells, *in vitro* processing and/or co-culture with mesenchymal stem cells (MSCs) or AF cells prior to their injection have been suggested [205–207]. However, the low proliferative capacity of these cells and their tendency to undergo dedifferentiation during their *in vitro* expansion are major limitations of this strategy [204,208]. Others studies have sought to overcome the donor site morbidity by using xenogeneic IVD-derived cells, as they have been shown to survive for 6 months post-injection; however, these cells were ultimately not efficient enough to regenerate NP tissue [206,209,210]. As an alternative to IVD-derived cells, the transplantation of chondrocytes has been investigated as a means to regenerate IVDs in rabbit and porcine models [211,212]. Even though their phenotypic similarities with NPCy make them potential candidates to replace degenerated NP cells, limited chondrocyte availability, a low capacity to proliferate, the risk of dedifferentiation after *in vitro* expansion, and donor site morbidity have thus far precluded their use in disc cell therapies. Finally, MSCs, which constitute the third source of cells, have been studied the most and have been shown to have key properties for discal regeneration while allowing some of the previously mentioned limitations to be overcome. Indeed, MSCs are readily available, as they can be obtained from bone marrow, adipose tissue, skeletal muscles, synovial membranes, and umbilical cord blood with less donor site morbidity. BM-MSCs have been the most studied MSCs for disc regeneration, closely followed by adipose stromal cells [213]. Their ability to differentiate along the mesenchymal pathway, notably into chondrocyte-like cells, as well as their capacity for *in vitro* expansion without the alteration of their differentiation potential, make them promising candidates for IVD cell therapy. Consequently, several studies have investigated the differentiation of MSCs toward NPCy-like cells, with the aim of repopulating the degenerated NP following their intradiscal injection [59,214,215]. *In vitro* studies have assessed the use of a specific cocktail of growth factors to drive *in vitro* NP differentiation [216]. Growth factors of the TGF- β superfamily are very attractive candidates for initiating MSCs differentiation toward NPCy-like cells, particularly TGF- β and GDF-5 or GDF-6, which should act synergistically to stimulate the typical NP ECM synthesis and the gene expression of

distinctive markers of NPCy [59,170,217–221]. Other strategies are focused on the cell-cell and paracrine interactions between NPCy and MSCs, which could alter the differentiation of MSCs toward the NPCy phenotype. Co-culturing MSCs derived from bone marrow, adipose tissue, and skeletal muscle with NP cells has been investigated extensively in order to study the relationship between these two cell types. This has revealed synergistic effects, with an increase in PGs and type II collagen gene expression and synthesis as well as up-regulation of specific miRNAs [222–226]. In light of the crucial role of the microenvironment on the fate of MSCs, co-culture of degenerated NPCy has also been assessed [227,228]. Interestingly, the enhancement of NP cell viability and proliferation has been observed, thus indicating that collaboration between these two cell types can occur [206,229]. In keeping with these encouraging achievements, undifferentiated MSCs have been injected into degenerated IVDs to evaluate their regenerative potential as a result of communication with NPCy and their known immunomodulatory and anti-inflammatory properties [230,231]. A considerable number of such pre-clinical studies have been performed, in both small and large animal models (i.e., mice, rats, rabbits, dogs, pigs, goats, and sheep). In most cases, the restoration of IVD height, an increase in T2 signal intensity, the up-regulation of ECM component synthesis, and specific gene expression by resident IVD cells and/or transplanted MSCs have been reported (reviewed in [199]). While some authors have reported a superior regenerative effect with MSCs following disc injection, or with disc-like cells [212], most studies indicate that MSCs and chondrocyte-like cells have similar efficiencies [232,233]. Moreover, the use of more readily available allogenic or xenogenic cells has also been assessed, with comparable results and no immune reaction in light of the hypovascularity and immune privilege of the IVD [209,234–236]. Finally, a small number of clinical trials conducted in discogenic patients have confirmed the feasibility and the safety of intradiscal injection, as well as a significant decrease in pain [237] and improvements in IVD hydration and height have been observed [238–242].

While it could be more beneficial to associate simultaneous supplementation with cells and biological factors to allow for a greater degree of anabolic restoration of ECM synthesis, only a small number of studies along these lines have been reported to date (Table 2). Among these, combined intradiscal injection of Link-N peptide and MSCs in an *ex vivo* bovine induced IVD degeneration model resulted in anabolic effects on ECM synthesis and on MSC survival in the IVD microenvironment [165]. More recently, intradiscal injection of a PRP/BM-MSCs suspension in a rabbit IVD degeneration model has yielded similar results at 8 weeks post-injection, with an increase in T2 signal intensity observed after 1 week, and a continuous regenerative effect for the following 7 weeks [243].

Finally, the precise therapeutic mechanism of MSCs has not yet been elucidated. It may be mediated by direct cell-cell contact, the transfer of secreted molecules, or the transfer of extracellular vesicles (EVs) between cells. Indeed, EVs act as major mediators of intercellular communication [244] by transferring biologically active molecules such as proteins, lipids, mRNA, and miRNA from parental cells to target cells [245]. The term EVs encompasses exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies, which are 40–500 nm-sized particles that are released by cells in a constitutive or inducible manner. As a cell-free strategy, EVs may provide an alternative to cell therapy, with the advantage of having an extended shelf life [246]. However, while the therapeutic benefits of EVs have been clearly shown with skin injuries [247] and inflammation-associated degenerative diseases [248,249] (e.g., osteoarthritis), their use in IVD regeneration is still in its infancy. Only two recent *in vitro* studies have shown that human NPCy-derived exosomes induce MSCs migration and differentiation toward an NP cell-like phenotype; that human MSCs-derived exosomes boost proliferation and healthy ECM synthesis by degenerated NPCy [250]; and that porcine MSC-derived EVs exert anabolic effects on canine and human NP cells [251].

5. Sequential delivery systems for IVD regeneration

A common denominator to all of these innovative strategies aimed to the restoration of the catabolic/anabolic balance is that they rely on the injection of biological factors and/or cells into a degenerated and harsh NP microenvironment. Since anti-catabolic and pro-anabolic factors, which are known to have very short half-lives, are particularly prone to in vivo degradation, and cells are known to have very low in vivo post-injection survival, their protection within a biomaterial is highly relevant and could promote their tissue regenerative effects [252,253].

For over a decade, drug delivery systems (DDS) have been designed as macro-, micro-, and nano- platforms for specific applications and delivery routes (systemic and local). In the case of an avascular organ such as the IVD, systemic administration is not a viable option, and the recommended delivery route is minimally invasive injection directly into the damaged tissue. In light of this, IVD biomaterials should be injectable and allow the local and controlled release of biological factors and/or cells. Macro-hydrogels, microparticles, or nanoparticles appear to be the most appropriate biomaterials (reviewed in [99]). Synthetic or natural polymers have been extensively studied in the context of tissue engineering approaches, with the aim of structurally replacing the IVD and restoring its functionality. Various scaffolds able to withstand physiological loads have been reviewed in terms of their specific advantages and drawbacks for IVD regeneration [254]. Due to the high number of reviews published on the topic, we have focused this paper on the delivery of biological factors and cells. In terms of natural polymers, hyaluronic acid (HA) and collagen are particularly relevant due to their natural presence in healthy IVD tissue, their potential bioactivity, and their biodegradability in vivo. Alginate and chitosan, although not naturally present in the human body, are also of interest, given their biodegradability properties and the anti-bacterial capacities of chitosan [255,256]. In parallel, synthetic and inert polymers, such as polyethylene glycol (PEG), polyurethane (PU), polylactic/glycolic acid (PLA and PGA) and derivatives (e.g., PLGA), and poly-caprolactone (PCL) offer chemical versatility.

As detailed above, IVD degeneration involves multiple dysregulations at different levels, with co-involvement of various processes such as catabolic and inflammatory events that occur in parallel with the impairment of ECM component synthesis as well as cell senescence and apoptosis. Thus, a combination of strategies may be needed for the complete restoration of IVD tissue. Going one step further, we envision sequential delivery by a single intradiscal injection that would target i) the inflammatory, pro-catabolic, and hostile microenvironment by the release of anti-catabolic or anti-inflammatory cytokines; followed by ii) the cell density, by increasing the number of cells in this healed microenvironment either by endogenous cell mobilization or by exogenous cell injections; and finally iii) the cellular functions, mostly the synthesis of adequate ECM, by the release of pro-anabolic factors. Overall, the regenerative process (as illustrated in Fig. 3A) would be based on the release of anti-catabolic factors, to induce a more favorable microenvironment by both reduction of inflammation and down-regulation of degradative enzymes, followed by supplementation with cells and anabolic factors to encourage the neosynthesis of ECM that is essential for tissue restoration. It is worth noting that the sequence of effects needs to be given careful consideration since most of the anabolic cues undeniably require the presence of healthy cells to exert their therapeutic effects, and cell survival depends on the nature of the IVD microenvironment. The presence of cells in the damaged IVD tissue differs, along with their biological activities, according to the severity of the disease. Hence, when cells are non-functional or when the IVD cell number decreases, cell supplementation by the recruitment of endogenous cells or by exogenous cell injection is a fundamental pre-requisite for the subsequent efficacy of the released pro-anabolic factors. Thus, a hierarchical approach with sequential steps of therapeutic agent delivery would be most beneficial to counteract the various IVD degenerative processes.

Although multistage drug delivery systems that are triggered by specific tumor microenvironment stimuli have been used for cancer therapy and imaging purposes, their design is based on parameters that do not apply to IVD regeneration, such as stability during transport in the bloodstream, deep penetration into tumor tissues, and multidrug resistance issues (reviewed in [257]). In this context, a complex design is needed to be able to deliver the biological factors in a consecutive and optimal manner as a single injection. Controlled release strategies are usually based on diffusion throughout a polymeric network (reviewed in [258]), polymer cleavage (reviewed in [259]), or affinity binding [260].

5.1. Sequential delivery of biological factors

In terms of skeletal tissue regeneration, sequential delivery systems specifically designed for bone and cartilage have been extensively reviewed [261–264]. These systems are multiphasic platforms composed of various polymers and biomaterials, often associating nano- or micro-particles (e.g., spheres, capsules) with an injectable macro-scale hydrogel (Fig. 3A). Hydrogels designed at different scales can be combined to form a system for the delivery of multiple therapeutic agents (for a review on hydrogel features, see [265,266]). For example, IGF-1 has been loaded into gelatin microspheres that were then dispersed in a chitosan gel containing BMP-2. The in vitro release profiles showed that there was a slowdown of IGF-1 delivery when the loaded microspheres were embedded in a chitosan gel, compared to microspheres in suspension; and this temporally-controlled release of the two molecules was shown to enhance osteoblast differentiation in vitro [267]. Recently, the combination of three different biomaterials has also been tested as a dual delivery scaffold [268]. A calcium phosphate porous cement containing alginate microspheres loaded with BMP-2 was coated with an alginate hydrogel loaded with PDGF. Following the rapid release of the PDGF over a 5-day period, there was a burst of BMP-2, followed by sustained release of both PDGF and BMP-2 for 10 days. A recent attempt at generating a flare-responsive hydrogel, considered as a smart biomaterial, that could undergo disassembly and thereby release the encapsulated drug in response to the concentration of matrix metalloproteinase MMP-2, MMP-3, or MMP-9, has been reported [269]. This system for “on demand” drug release upon exposure to high levels of inflammation, which was designed for inflammatory arthritis treatment when arthritis-related enzyme concentration increases during flares, could be considered for stage 1 of IVD regeneration by the incorporation anti-catabolic factors.

Sequential release of IVD therapeutic factors, whether anti-catabolic and pro-anabolic entities, should be carefully designed and could be based on sustained delivery systems (Table 3). PLA pellets (i.e., micro-scaled particles) provided sustained release of the anti-catabolic factor clonidine over a three-month period in a porcine model of IVD [270]. Moreover, poly- γ -glutamic acid (PGA) and chitosan nanoparticles loaded with diclofenac exhibited anti-catabolic effects for at least 14 days in an ex vivo bovine model of degenerated IVD [118]. Two chondrogenic factors, kartogenin (KGN) and pentosan polysulphate (PPS), combined with chitosan or PEG, respectively, have been studied in association with an HA-based hydrogel [271,272]. The results revealed sustained in vitro release and a prolonged impact of these chondrogenic factors on BM-MSCs in terms of GAG and collagen synthesis. Pro-anabolic TGF- β 3 was released in vitro from photocrosslinked carboxymethylcellulose (CMC) hydrogels and was shown to have prolonged biological effects on GAG and collagen synthesis for 8 weeks [273]. However, in this study, macro-scale hydrogels might not be effective when it comes to releasing chondrocyte-inducing factors or TGF- β 3 during the last stage of the regeneration process, that is to say, long after the anti-catabolic factors and cells have been released (Fig. 3A). Lee et al. devised a combined system of PCL microspheres embedded in a pluronic F127/sodium hyaluronate hydrogel, and they confirmed that there was sustained release of this model drug in an ex vivo

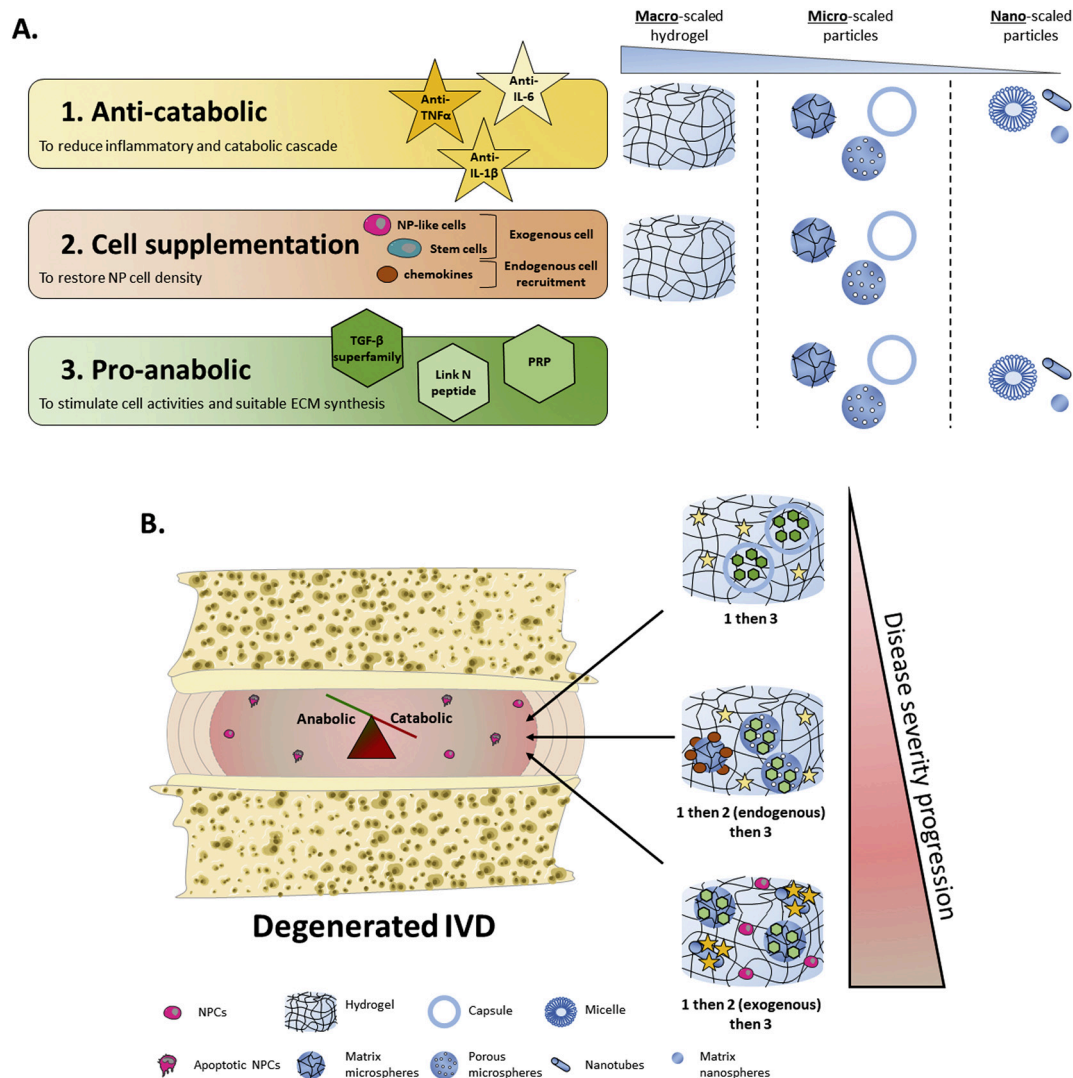


Fig. 3. Possible sequential biological agent release strategies for a maximal IVD regeneration. We hypothesize that a sequential delivery that would i) target the inflammatory, pro-catabolic, and hostile microenvironment by the release of anti-inflammatory or anti-catabolic cytokines, then ii) increase the cell density in this microenvironment, and finally iii) enhance the cellular synthesis of extracellular matrix by the release of pro-anabolic factors, constitutes an innovative yet challenging approach to treat IVD degeneration. It is worth noting that the sequence of events needs to be given careful consideration, as most of the anabolic cues undeniably require the presence of healthy cells to exert their therapeutic effects. **A.** Anti-catabolic factors can be incorporated into macro-scaled hydrogels, micro-scaled (matrix, porous, or capsules) particles, and nano-scaled particles (micelles, nanotubes, or matrix), with the aim of obtaining a sustained initial release in the hostile microenvironment. Due to the size of cells, the use of nanoparticles is not suitable for cell supplementation, and they are hence not presented in the diagrams (although nanoparticles could be used to deliver chemoattractant molecules to recruit endogenous cells). Moreover, macro-scaled hydrogels, which usually have quite fast delivery profiles for soluble molecules, are not suitable for the delivery of anabolic factors, which should occur in the final stage of regeneration, and they are hence not represented in this figure. **B.** The disease progression has to be taken into account when selecting a sequential delivery treatment. Indeed, to reverse the complex degenerative IVD process, treatment strategies that have an appropriate timing based on the degenerative cascade should be applied. According to the severity of the disease, different sequential release patterns can be envisioned, involving the use of macro-, micro-, and nano-scaled biomaterials. For discs at an early stage of degeneration, when local disc cells are still healthy and available, anti-catabolic entities followed by pro-anabolic strategies are likely to be suitable. For discs at an intermediate stage of degeneration, an additional step of endogenous cell recruitment is necessary to provide healthy targets for the pro-anabolic factors. Finally, tissue at the late stage of degeneration, whereby endogenous cells may no longer be available, would require supplementation with either autologous or allogenic exogenous cells. **TNF- α :** Tumor necrosis factor α ; **IL-1 β :** Interleukin 1 β ; **IL-6:** Interleukin 6; **NP:** Nucleus pulposus; **TGF- β :** Transforming growth factor β ; **PRP:** Platelet-rich plasma; **NPCy:** Nucleopulpcytes.

IVD model [274]. Similarly, PLGA microspheres have been shown to allow the sustained release of IL-1Ra for up to 35 days of culture of NP/agar constructs [111]. On the other hand, the sustained in vitro IGF-1 release from chitosan or PLGA microparticles was improved when PLGA microspheres were embedded in a silk fibroin porous scaffold [275,276]. Likewise, pullulan microparticles or nanofibrous silica can release TGF- β 1 and GDF5 for at least 28 days in vitro, and their release was even slower when they were embedded in a hydroxypropyl methylcellulose silanized (HPMC-Si) hydrogel [277,278]. PRP, a concentrate of GFs, could also be released in a sustained fashion from gelatin microspheres for up to 8 weeks in a rabbit induced IVD degeneration model [279,280].

An IVD-specific platform based on injectable MMP-responsive hydrogel containing MMP-responsive polyplex-micelles loaded with a specific miRNA known to suppress fibrosis was recently developed by Feng and collaborators [281]. miR-29a was complexed with 70-nm MMP-responsive polyplex micelles and then encapsulated in an MMP-responsive PEG hydrogel. Two-stage delivery of miR-29a was demonstrated in vitro, in the presence of MMP-2, and significantly attenuated fibrosis progression in IVD was obtained in two needle puncture models (rat tails and rabbit lumbar spines). However, this could not be considered to be a sequential delivery system since the same factor was released in each stage. Of note, the efficacy of any miRNA strategy undeniably requires the presence of either exogenous or endogenous

Table 3

Nano-, micro-, macro-scaled delivery platforms for IVD regeneration.

	Biomaterial	Biological factors	Study design	Effects	Ref
Nano-scaled	Chitosan/ γ -PGA nanoparticles	Diclofenac	Ex vivo study of 14 days – induced IVD degeneration bovine model – by intradiscal injection	Down-regulation of IL-6, IL-8, MMP-1, -3 and PGE2 production Up-regulation of aggrecan and collagen type II	[118]
	Silica nanofibrous	TGF- β 1 GDF-5	In vitro study – loaded on HPMC-Si hydrogel	Sustained release of bioactive TGF- β 1 and GDF-5	[278]
	Albumin/heparin nanoparticles	CXCL12	In vivo study of 8 weeks – IVD degeneration rat model – by intradiscal injection	Improvement of the regeneration of AF and NP with increase of histological grade score Increase in sox9, aggrecan and collagen type II mRNA and protein expression levels	[302]
Micro-scaled	PLA pellets	Clonidine	In vivo study of 3 months – IVD degeneration pig model – by postero-transforaminal placement	Detection of Clonidine up to 6 cm away from implantation zone Sustained local release	[270]
	PLGA microspheres	IL-1Ra [111] IGF-1 [275] GDF-5 [327]	In vitro studies – in bovine NP constructs (agarose) with IL-1 β [111] or in silk fibroin porous scaffold [275] In vivo study of 8 weeks – induced IVD degeneration rat model [327]	Release from PLGA microspheres for up 35 days [111] or 42 days [327] Increase in sustained release as compared to without silk-fibroin scaffolds [275] Restoration of disc height with increase of sGAG, DNA content and collagen type II mRNA level [327]	[111,275,327]
	Pullulan microbeads	TGF- β 1 [277] GDF-5 [277] CCL5 [328]	In vitro study [277] – loaded on HPMC-Si hydrogel In vivo study [328] – injection in mouse ischemic hindlimb model	Sustained release of bioactive TGF- β 1 [277], GDF-5 [277] and CCL5 [328]	[277,328]
	Gelatin microspheres	PRP	In vivo studies of 8 weeks [279,280] – intradiscal injection in induced IVD degeneration rabbit model	Stopping of the progression of DD [279] and decrease in cell apoptosis [280] Increase in disc height [280], PGs protein and mRNA expression [280] levels	[279,280]
Macro-scaled	Elastin-like polypeptide hydrogel	Curcumin	In vivo study of 4 days – mice model – by intramuscular injection	Rapid delivery of active curcumin, with in situ depot formation of released curcumin and anti-neuro-inflammatory effects	[329]
	Chitosan/gelatin/glycerol phosphate hydrogel	Ferulic acid	In vitro study – with NP cells cultured with H ₂ O ₂	Sustained release for 48 hours Reduction of the cellular stress, GAGs accumulation, up-regulation of aggrecan and type II collagen and down-regulation of MMP-3 mRNA expression levels	[330]
	CMC hydrogel	TGF- β 3	In vitro study – cultured with hMSCs	Increase in GAG and collagens type I and II accumulation with homogenous deposition Improvement of mechanical properties of scaffold overtime	[273]
	Chitosan/HA hydrogel	Kartogenin	In vitro study – with hASCs	In vitro sustained release for up 16 days Stimulation of hASCs proliferation and differentiation into NP-like cells in hydrogel	[272]
	PEG/HA hydrogel	PPS	In vitro study – with MSCs encapsulated in hydrogel	Increase in the synthesis and deposition of sGAG, collagen No effect of the mechanical properties of hydrogel and cell viability	[271]
	HA hydrogel	CXCL12	Ex vivo study – induced IVD degeneration bovine model with MSCs seed on one endplate – by intradiscal injection	Increase in MSCs migration number and distance from cartilage endplate to NP Enhancement of collagen type II expression	[195,331]
'Combined-scaled'	PCL microspheres in Pluronic F127/Sodium Hyaluronate hydrogel	Bupivacaine	In vitro and ex vivo studies – bovine lumbar IVD – by intradiscal injection	In vitro sustained release for 142 days Verification of delivery factors after injection in ex vivo IVD	[274]
	PGPC polyplex micelles in PEG hydrogel	miR-29a	In vivo studies of 30 days and 4 weeks – induced IVD degeneration rat and rabbit models – by intradiscal injection	Release of miR-29a/PGPC polyplex micelles from PEG hydrogel Attenuation of fibrosis progression Sustained inhibition of MMP-2	[281]
	Chitosan microparticles [276] Chitosan/ γ -PGA complexes [301]	IGF-1 [276] CXCL12 [301]	In vitro studies – with BM-MSCs [301]	Sustained release of bioactive IGF-1 [276] Continuous release of CXCL12 during 120h [301] Increase in cell migration up to 6 fold compared to without CXCL12 [301]	[276,301]
	PLGA nanoparticles in Dextran/Gelatin hydrogel Heparin/poly(L-lysine) nanoparticles loaded in PLGA microspheres	TGF- β 3 + mouse BM-MSCs FGF [299] + rat ASCs + Dexa	In vitro study – loaded in PLGA nanoparticles seeded in Dextran/Gelatin hydrogel In vivo study of 24 weeks on 96 rats – induced IVD degeneration rat model [300] – by intradiscal injection	Release of TGF and induction of NP-like cell differentiation of MSCs with specific ECM synthesis Increase in GAG/DNA ratio, aggrecan, collagen type II and versican genes expression levels [299] Improvement of DHI and PGs production and accumulation [300]	[298] [299,300]

γ -PGA: Poly- γ -glutamic acid, TGF- β : Transforming growth factor β , GDF-5: Growth differentiation factor 5, PLA: Polylactic acid, PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid), IL-1Ra: Interleukin-1 receptor antagonist, IGF-1: Insulin-like growth factor 1, PRP: Platelet-rich plasma, CMC: Carboxymethylcellulose, HA: Hyaluronic acid, PEG: Poly(ethylene glycol), PCL: Polycaprolactone, PGPC: poly(ethylene glycol)-GPLGVRG-poly[N'-(N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl)aspartamide]-cholesteryl (PEG-GPLGVRG-PAsp(DET)-Chole), BM-MSCs: Bone marrow mesenchymal stem cells, FGF: Fibroblast growth factor, ASCs: Adipose stromal cells, Dexa: Dexamethasone.

healthy cells. To our knowledge, no study to date has reported an IVD-specific sequential delivery system.

5.2. Cell and biological factors combined strategies

In terms of the cell supplementation stage, biocompatible natural or synthetic biomaterials that provide mechanical properties and that enable specific ECM synthesis have been extensively reviewed for cell delivery aiming to restore the cell density in degenerated IVDs [198,254,282]. Among these, hyaluronic acid, which is a natural component of the NP matrix, has been widely considered for cartilage and spine applications [283,284], and as an IVD cell supporting hydrogel in particular [285]. In vitro studies have shown the maintenance of the phenotype of human, bovine, and rabbit NP and AF cells for one week when cultured in an HA hydrogel [286–289], as well as mechanical properties close to those of the native tissue, which is a significant advantage for maintaining the NPC phenotype [287,289]. In some cases, an increase in the production of specific ECM components, as well as the expression of specific IVD markers have been reported [287,288]. Interestingly, alginate and chitosan hydrogels have yielded similar results in terms of the maintenance of the cellular phenotype and ECM synthesis by IVD cells from rabbits [290], pigs [291], sheep [292], cows [252,293,294], and humans [295,296]. Multiple pre-clinical studies have assessed the regenerative effects of cell supplementation strategies, combined with a macro-scaled hydrogel, after intradiscal injections in various animal models of IVD degeneration (reviewed in [199,297]).

The injection of combined exogenous cells and biological factors has also recently been investigated with the development of biphasic or even triphasic delivery systems that can be administered as a single injection. For example, PLGA nanoparticles were used to encapsulate TGF- β 3 and these nanoparticles were then loaded into a dextran/gelatin hydrogel with MSCs. The in vitro results confirmed sustained release of TGF- β 3 and induction of NP-like cell differentiation of the MSCs in this biphasic system, notably by the synthesis of suitable ECM [298]. In another study, basic fibroblast growth factor (bFGF) [299] or TGF- β 3 [300] were encapsulated in heparin/poly-L-lysine nanoparticles that were loaded into dexamethasone/PLGA microspheres, and the resulting carrier was used to intradiscally deliver allogenic BM-MSCs or allogenic adipose-derived MSCs, respectively. This led to a significantly higher expression of matrix-specific genes and enhanced ECM synthesis in vitro, an improvement in the DHI score, and an accumulation of PGs in a rat IVD degeneration model. This strategy fits the requirements for a sequential delivery system, as illustrated in Fig. 3A. Indeed, anti-catabolic dexamethasone (stage 1, microparticles), exogenous cells (stage 2, micro-scaled carriers), and pro-anabolic TGF- β 3 (stage 3, nanoparticles) are generated to ultimately allow the maximal restoration of IVD tissue. However, the sequence of events may not be optimal, as the cells are released first from the microcarriers into a harsh environment in which they may not survive. Hence, when finally released from the nanoparticles, the TGF- β 3 target, i.e., healthy cells, will not be present and there will be no beneficial anabolic effect. Incorporation of this combined micro- and nano-particle systems within a macro-scale hydrogel (Fig. 3A) may provide a degree of protection to the cells, and delay their release into what by then may have become a less inflammatory microenvironment.

Recent cell therapy strategies have relied on the recruitment of endogenous reparative cells, such as resident stem/progenitor cells, by injection of specific chemokines embedded in either micro-scaled particles or macro-scaled hydrogels (Fig. 3A). CXCL-12, also called SDF-1, can be released over a 120 h period from chitosan/ γ -PGA polyelectrolyte complexes and thus enhance migration of BM-MSCs in vitro after its release [301]. CXCL-12 released by a hyaluronic acid-based hydrogel in an ex vivo bovine IVD model after intradiscal injection has been shown to result in an increase in cell migration from the CEP to the NP in terms of both cell number and migration distance

[195]. A recent in vivo study performed in a rat IVD degeneration model has shown enhanced IVD regeneration 8 weeks after intradiscal injection of CXCL12 loaded on albumin/heparin nanoparticles [302]. The authors reported an increase in Sox9, aggrecan, and type II collagen mRNA and protein levels, which could be due to either stimulation of the resident NP cells or the recruitment of stem/progenitor cells from the vicinity of the IVD toward the NP. These recruited cells could then synthesize these specific ECM components in the NP microenvironment or stimulate resident NP cells [302].

5.3. On-demand release strategies

Although a sequential release system can be a powerful tool for the restoration of degenerated IVDs, its rational design is much more complex than that of a single-compound delivery system. Such a strategy requires the separate control of different drug releases, in space, time, and dose. This is particularly difficult to achieve in the harsh environment of a degenerated tissue, and even more so when combined with the high pressure and osmolarity of IVDs. Furthermore, while examples of DDS with simultaneous multi-release rates (i.e., fast vs. slow) have been reported [303], the feasibility of an actual sequential release in vivo, where one compound is released after another, remains to be shown. To date, most stimuli-responsive strategies for on-demand release are based on sudden changes in pH, temperature, redox potential, chemical environment, or light exposure [304]. These are mostly not compatible with single injection approaches, and they are often not practical for treatment, especially for IVDs, which are not readily accessible. Thus, being able to independently set intervals between release phases is a major roadblock that cannot be overcome with the currently available technologies; and the development of innovative in situ triggers will be required to succeed. In addition, it is worth noting that protein therapeutics are often prone to rapid unfolding and degradation, with their efficacy limited to days or weeks, thus calling for advanced stabilization techniques in protein design for further development of sequential release methods. Finally, when considering the co-delivery or in situ activation of cells, the secretion of biologically active factors must occur as a second stage mechanism, thus implying transient ways of maintaining cells in a dormant state or of blocking secretion for a certain amount of time, which adds to the complexity. Notwithstanding these challenges, tremendous progress in drug delivery and conceptual release strategies has nonetheless been made over the past 20 years, hence giving rise to innovative and promising approaches. Polymer-drug conjugates and tunable nanocarriers are becoming common tools for the controlled release of small-molecule drugs [305–307]; libraries of cleavable linkers and conjugation kits have become commercially available; and materials with programmable degradation, including self-immolating, stimuli-responsive, and supramolecular approaches, are being developed [308,309], thus paving the way for more achievable sequential release strategies. All things considered, it seems likely that new generations of DDS that are based on composite materials whereby bio-physico-chemical phenomena are controlled from the nano- to the macroscopic scale will eventually become available. This will presumably involve the convergence of innovations in drug design, biological targets, macromolecular design, and biomaterial engineering, with the cutting-edge technologies of today becoming the building blocks of tomorrow.

5.4. Sequential release strategies as a function of disease progression

Finally, in terms of the severity of disc disease, different release sequences can be considered, in association with the use of macro-, micro- and nanoplateforms (Fig. 3B). For discs at an early stage of degeneration, when not all of the local disc cells have already died, anti-catabolic factors followed by pro-anabolic strategies may be a suitable approach. For discs at an intermediate stage of degeneration, an additional step involving endogenous cell recruitment is necessary to

provide healthy cell targets for the pro-anabolic factors. Finally, tissues at a late stage of degeneration, and thus when the endogenous cells may no longer be available, would require either autologous or allogenic exogenous cells being added to the anti-catabolic and pro-anabolic factors. The difficulties in implementing these strategies are, however, multiple. Clinically, the assessment of early DDD, which is mostly asymptomatic, and the consequent establishment of preventive treatments to reverse the IVD degeneration processes before the appearance of pain and disability, constitute a real challenge. An imaging technique such as T1 ρ -weighted MRI, which correlates with the PG concentration [310], appears to be a promising way to detect early asymptomatic DDD that is superior to the T2-weighted MRI in athletes [311] and in an ex vivo model of lumbar caprine IVD [312]. Indeed, the quantitative T1 ρ values of weightlifters were significantly lower than those of sedentary matched control patients [311] and they displayed a strong positive correlation with the disc mechanical behavior, IVD histology, and water and GAG content of an ex vivo early IVD degeneration caprine model [312], with higher differences than with T2-weighted images compared to IVDs that have not undergone degeneration. Loss of diffusion routes is another parameter that needs to be considered when implementing these strategies based on the severity of the disease. Indeed, calcification of CEPs during IVD degeneration decreases oxygen, nutrient, and waste metabolite diffusion, which places stress on the IVD microenvironment. The restoration of transport thus appears to be paramount for the effectiveness of biological approaches. This is particularly the case for the restoration of nutrient supply, which is an essential prerequisite for the therapeutic effect of endogenous or exogenous cells [76].

6. Conclusion

The process of IVD degeneration is complex and multifactorial, with dysregulation of multiple processes, including the overexpression of degradative enzymes, the up-regulation of pro-inflammatory cytokines, the loss of healthy cells, and decreased matrix synthesis. While approaches based on biological factors or cell therapy, sometimes in association with biomaterials, have yielded promising results, it seems reasonable to speculate that effective strategies for the full biological and mechanical healing of the tissue will likely require advanced strategies based on multiscale delivery systems of biological factors. We hypothesize that sequential delivery systems, aiming to target the three main stages of IVD degeneration, can restore the IVD machinery and regenerate all of the tissue components, both structurally and functionally. It should be stressed, however, that the sequence of biological factor release needs to be given careful consideration. To our knowledge, no IVD-specific sequential delivery system has been reported to date. Although a sequential delivery system could constitute a powerful tool for restoring degenerated IVDs, its rational design is much more difficult than that of a single-component system. Among the limitations that could stymie such development, the precise control of temporal release, both in terms of the timing and the degree of the release, is difficult to engineer, in light of the harsh environment of a degenerated IVD, combined with the high local pressure and osmolarity. There is nonetheless ample reason to believe that the recent developments of more complex delivery systems, based on macro, micro-, and nano-objects will pave the way to innovative and effective regenerative strategies.

Acknowledgments

The authors acknowledge having received financial support from the Inserm, the Région Pays de la Loire (Paris Scientifique BIO2 #2015-10762), the Agence Nationale pour la Recherche (REMEDIV #ANR-14-CE16-0017, JC/JC STIMUDISC #ANR-16-CE18-0008), and the Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée (AP-RMA-2015-018 and BO-RMA-15-001). L. Frapin was supported by a fellowship from Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (France). We thank Dr. A. Camus for critical suggestions and discussions

regarding the manuscript, and S. Domingues for English language editing services.

References

- [1] D. Borenstein, Mechanical low back pain - a rheumatologist's view, *Nat. Rev. Rheumatol.* (2013) <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.133>.
- [2] A.A. Abajobir, K.H. Abate, C. Abbafati, K.M. Abbas, F. Abd-Allah, R.S. Abdulkader, A.M. Abdulle, T.A. Abebo, S.F. Abera, V. Aboyans, L.J. Abu-Raddad, I.N. Ackerman, I.A. Adedeji, O. Adetokunboh, A. Afshin, R. Aggarwal, S. Agrawal, A. Agrawal, M.B. Ahmed, M.T.E. Aichour, A.N. Aichour, I. Aichour, S. Aiyar, T.F. Akinyemiju, N. Akseer, F.H. Al Lami, F. Alahdab, Z. Al-Aly, K. Alam, N. Alam, T. Alam, D. Alasfoor, K.A. Alene, R. Ali, R. Alizadeh-Navaei, J.M. Alkaabi, A. Alkerwi, F. Alla, P. Allebeck, C. Allen, F. Al-Maskari, M.A.A. AlMazroa, R. Al-Raddadi, U. Alsharif, S. Alsowaidi, B.M. Althouse, K.A. Altirkawi, N. Alvis-Guzman, A.T. Amare, E. Amini, W. Ammar, Y.A. Amoako, M.G. Ansha, C.A.T. Antonio, P. Anwar, J. Ärnlöv, M. Arora, A. Artaman, K.K. Aryal, S.W. Asgedom, T.M. Atey, N.T. Atnaful, L. Avila-Burgos, E.F.G.A. Avokpaho, A. Awasthi, S. Awasthi, M.R. Azarpazhooh, P. Azzopardi, T.K. Babalola, U. Bacha, A. Badawi, K. Balakrishnan, M.S. Bannick, A. Barac, S.L. Barker-Collo, T. Barnighausen, S. Barquera, L.H. Barrero, S. Basu, R. Battista, K.E. Battle, B.T. Baune, S. Bazargan-Hejazi, J. Beardsley, N. Bedi, Y. Béjot, B.B. Bekele, M.L. Bell, D.A. Bennett, J.R. Bennett, I.M. Bensenor, J. Benson, A. Berhane, D.F. Berhe, E. Bernabé, B.D. Betsu, M. Beuran, A.S. Beyene, A. Bhansali, S. Bhatt, Z.A. Bhutta, S. Biadgilign, B.K. Bicer, K. Bienhoff, B. Bikbov, C. Birungi, S. Biryukov, D. Bisanzio, H.M. Bizuayehu, F.M. Blyth, D. Boneya, D. Bose, I.R. Bou-Orm, R.R.A. Bourne, M. Brainin, C. Brayne, A. Brazinova, N.J.K. Breitborde, P.S. Briant, G. Britton, T.S. Brugha, R. Buchbinder, L.N.B. Bulto, B.R. Bumgarner, Z.A. Butt, L. Cahuana-Hurtado, E. Cameron, I.R. Campos-Nonato, H. Carabin, R. Cárdenas, D.O. Carpenter, J.J. Carrero, A. Carter, F. Carvalho, D. Casey, C.A. Castañeda-Orjuela, C.D. Castle, F. Catalá-López, J.C. Chang, F.J. Charlson, P. Chaturvedi, H. Chen, M. Chibalabala, C.E. Chibueze, V.H. Chisumpa, A.A. Chitheer, R. Chowdhury, D.J. Christopher, L.G. Cioabun, M. Cirillo, D. Colombari, L.T. Cooper, C. Cooper, P.A. Cortesi, M. Cortinovis, M.H. Criqui, E.A. Cromwell, M. Cross, J.A. Crump, A.F. Dadi, K. Dalal, A. Damasceno, L. Dandona, R. Dandona, J. das Neves, D.V. Davitoiu, K. Davletov, B. de Courten, D. De Leo, H. De Steur, B.K. Defo, L. Degenhardt, S. Deiparine, R.P. Dellavalle, K. Deribe, A. Deribew, D.C. Des Jarlais, S. Dey, S.D. Dharmaratne, P.K. Dhillon, D. Dicker, S. Djalalinia, H.P. Do, K. Dokova, D.T. Doku, E.R. Dorsey, K.P.B. dos Santos, T.R. Driscoll, M. Dubey, B.B. Duncan, B.E. Ebel, M. Echko, Z.Z. El-Khatib, A. Enayati, A.Y. Endries, S.P. Ermakov, H.E. Erskine, S. Eshetie, B. Eshtrati, A. Esteghamati, K. Estep, F.B.B. Fanuel, T. Farag, C.S.E. Farinha, A. Faro, F. Farzadfar, M.S. Fazeli, V.L. Feigin, A.B. Feigl, S.M. Fereshtehnejad, J.C. Fernandes, A.J. Ferrari, T.R. Feyissa, I. Filip, F. Fischer, C. Fitzmaurice, A.D. Flaxman, N. Foigt, K.J. Foreman, R.C. Franklin, J.J. Frostad, N. Fullman, T. Fürst, J.M. Furtado, N.D. Futran, E. Gakidou, A.L. Garcia-Basteiro, T. Gebre, G.B. Gebregers, T.T. Gebrehiwot, J.M. Geleijnse, A. Geleto, B.L. Gemchu, H.A. Gesesew, P.W. Gething, A. Ghajjar, K.B. Gibney, R.F. Gillum, I.A.M. Ginawi, M.D. Gishu, G. Giussani, W.W. Godwin, K. Goel, S. Goenka, E.M. Goldberg, P.N. Gona, A. Goodridge, S.V. Gopalani, R.A. Gosselin, C.C. Gotay, A. Goto, A.C. Goulart, N. Graetz, H.C. Guagnani, P.C. Gupta, R. Gupta, T. Gupta, V. Gupta, R. Gupta, R.A. Gutiérrez, V. Hachinski, N. Hafezi-Nejad, A.D. Hailu, G.B. Hailu, R.R. Hamadeh, S. Hamidi, M. Hammami, A.J. Handal, G.J. Hankey, Y. Hao, H.L. Harb, H.A. Hareri, J.M. Haro, K.M. Harun, J. Harvey, M.S. Hassanvand, R. Havmoeller, S.I. Hay, R.J. Hay, M.T. Hedayati, D. Hendrie, N.J. Henry, I.B. Heredia-Pi, P. Heydarpour, H.W. Hoek, H.J. Hoffman, M. Horino, N. Horita, H.D. Hosgood, S. Hostiuc, P.J. Hotez, C.G. Hoy, A.S. Htet, G. Hu, J.J. Huang, C. Huynh, K.M. Iburg, E.U. Igumbor, C. Ikeda, D.M.S. Irvine, S.M.S. Islam, K.H. Jacobsen, N. Jahanmehr, M.B. Jakovljevic, P. James, S.K. Jassal, M. Javanbakht, S.P. Jayaraman, P. Jeemon, P.N. Jensen, V. Jha, G. Jiang, D. John, C.O. Johnson, S.C. Johnson, J.B. Jonas, M. Jürisson, Z. Kabir, R. Kadel, A. Kahsay, R. Kamal, C. Kar, N.E. Karam, A. Karch, C.K. Karema, S.M. Karimi, C. Karimkhani, A. Kasaean, G.M. Kassa, N.A. Kassaw, N.J. Kassebaum, A. Kastor, S.V. Katikireddi, A. Kaul, N. Kawakami, P.N. Keiyoro, L. Kemmer, A.P. Kengne, A. Keren, C.N. Kesavachandran, Y.S. Khader, I.A. Khalil, E.A. Khan, Y.H. Khang, A.T. Khoja, A. Khosravi, J. Khubchandani, A.A. Kiadali, C. Kieling, Y.J. Kim, D. Kim, R.W. Kimokoti, Y. Kinfu, A. Kisa, K.A. Kissimova-Skarbek, N. Kissoon, M. Kivimäki, A.K. Knudsen, Y. Kokubo, D. Kolte, J.A. Kopec, S. Kosen, G.A. Kotsakis, P.A. Koul, A. Koyanagi, M. Kravchenko, K.J. Krohn, G.A. Kumar, P. Kumar, H.H. Kyu, A.C.J. Lager, D.K. Lal, R. Lalloo, T. Lallukka, N. Lambert, Q. Lan, V.C. Lansingh, A. Larsson, J.L. Leasher, P.H. Lee, J. Leigh, C.T. Leshargie, J. Leung, R. Leung, M. Levi, Y. Li, Y. Li, X. Liang, M.L. Liben, S.S. Lim, S. Linn, P.Y. Liu, A. Liu, S. Liu, Y. Liu, R. Lodha, G. Logroscino, K.J. Looker, A.D. Lopez, S. Lorkowski, P.A. Lotufo, R. Lozano, T.C.D. Lucas, R. Lunevicius, R.A. Lyons, E.R.K. Macarayan, E.R. Maddison, H.M.A. Magdy Abd El Razek, M. Magdy Abd El Razek, C. Magis-Rodriguez, M. Mahdavi, M. Majdan, R. Majdzadeh, A. Majeed, R. Malekzadeh, R. Malhotra, D.C. Malta, A.A. Mamun, H. Manguer, T. Manhertz, L.G. Mantovani, C.C. Mapoma, L.M. March, L.B. Marczak, J. Martinez-Raga, P.H.V. Martins, F.R. Martins-Melo, I. Martopullo, W. März, M.R. Mathur, M. Mazidi, C. McAlinden, M. McGaughey, J.J. McGrath, M. McKee, S. Mehata, T. Meier, K.G. Meles, P. Memiah, Z.A. Memish, W. Mendoza, M.M. Mengesha, M.A. Mengistie, D.T. Mengistu, G.A. Mensah, T.J. Meretoja, A. Meretoja, H.B. Mezgebe, R. Micha, A. Millea, T.R. Miller, S. Minnig, M. Mirrezaei, E.M. Mirzakhani, A. Misganaw, S.R. Mishra, P.B. Mitchell, K.A. Mohammad, A. Mohammadi, M.S.K. Mohammed, K.E. Mohammed, S. Mohammed, M.B.V. Mohan, A.H. Mokdad, S.K. Mollenkopf, L. Monasta, J.C. Montañez Hernandez, M. Montico, M. Moradi-Lakeh, P. Moraga, L. Morawska, R. Mori, S.D. Morrison, M. Moses, C. Mountjoy-Venning, K.B. Mruts, U.O. Mueller, K. Muller, M.E. Murdoch, C.J.L. Murray, G.V.S. Murthy, S. Murthy, K.I. Musa, J.B. Nachega, G. Nagel, M. Naghavi, A. Naheed, K.S. Naidoo, V. Nangia, J.T. Nasher, G. Natarajan, D.E. Negasa, R.I. Negoi, I. Negoi, C.R. Newton,

- J.W. Ngunjiri, C.T. Nguyen, Q. Le Nguyen, T.H. Nguyen, G. Nguyen, M. Nguyen, E. Nichols, D.N.A. Ningrum, V.M. Nong, O.F. Norheim, B. Norrving, J.J.N. Noubiap, A. Nyandwi, C.M. Obermeyer, M.J. O'Donnell, F.A. Ogbo, I.H. Oh, A. Okoro, O. Oladimeji, A.T. Olagunju, T.O. Olagunju, H.E. Olsen, B.O. Olusanya, J.O. Olusanya, K. Ong, J.N. Opio, E. Oren, A. Ortiz, R.H. Osborne, A. Osgood-Zimmerman, M. Osman, E. Ota, M.O. Owolabi, M. PA, R.E. Pacella, B.K. Panda, J.D. Pandian, C. Papachristou, E.K. Park, C.D. Parry, M. Parsaeian, S.T. Patil, S.B. Patten, G.C. Patton, D. Paudel, K. Paulson, N. Pearce, D.M. Pereira, K.M. Perez, N. Perico, K. Pesudovs, C.B. Peterson, W.A. Petri, M. Petzold, M.R. Phillips, G. Phipps, D.M. Pigott, J.D. Pillay, C. Pinho, M.A. Piradov, D. Plass, M.A. Pletcher, S. Popova, R.G. Poulton, F. Pourmalek, D. Prabhakaran, N. Prasad, C. Purcell, M. Purwar, M. Qorbani, B.P.A. Quintanilla, R.H.S. Rabiee, A. Radfar, A. Rafay, K. Rahimi, A. Rahimi-Movaghar, V. Rahimi-Movaghar, M.H.U. Rahman, M.A. Rahman, M. Rahman, R.K. Rai, S. Rajic, U. Ram, C.L. Ranabhat, T. Rangaswamy, Z. Rankin, P.V. Rao, P.C. Rao, S. Rawaf, S.E. Ray, R.C. Reiner, N. Reinig, M. Reitsma, G. Remuzzi, A.M.N. Renzaho, S. Resnikoff, S. Rezaei, A.L. Ribeiro, J.C. Rivas, H.S. Roba, S.R. Robinson, D. Rojas-Rueda, M.B. Rokni, L. Ronfani, G. Roshandel, G.A. Roth, D. Rothenbacher, A. Roy, E. Rubagotti, G.M. Ruhago, S. Saadat, M. Saffarian, S. Safiri, R. Sagar, R. Sahathevan, M.A. Sahraian, J. Salama, M.M. Saleh, J.A. Salomon, S.S. Salvi, A.M. Samy, J.R. Sanabria, M.D. Sanchez-Niño, D. Santomauro, J.V. Santos, I.S. Santos, M.M. Santric Milicevic, B. Sartorius, M. Satpathy, M. Sawhney, S. Saxena, K. Schelonka, M.I. Schmidt, I.J.C. Schneider, B. Schöttker, A.E. Schutte, D.C. Schwebel, F. Schwendicke, S. Seedat, S.G. Sepanlou, E.E. Servan-Mori, A. Shaheen, M.A. Shaikh, M. Shamsipour, R. Sharma, J. Sharma, J. She, P. Shi, K. Shibuya, C. Shields, G.T. Shifa, M.S. Shiferaw, S. Shigematsu, R. Shiri, R. Shirkoobi, S. Shirude, K. Shishani, H. Shoman, S. Siabani, A.M. Sibai, I.D. Sigfusdottir, D.H. Silberberg, D.A.S. Silva, J.P. Silva, D.G.A. Silveira, J.A. Singh, O.P. Singh, N.P. Singh, V. Singh, D.N. Sinha, E. Skiadas, E.I. Slepak, D.L. Smith, M. Smith, B.H.A. Sobaih, E. Sobngwi, M. Soljak, R.J.D. Sorensen, T.C.M. Sousa, L.A. Sposato, C.T. Sreeramareddy, V. Srinivasan, J.D. Stanaway, V. Stathopoulou, N. Steel, D.J. Stein, C. Steiner, S. Steinke, M.A. Stokes, L.J. Stovner, B. Strub, M. Subart, M.B. Sufyan, B.F. Sungguy, P.J. Sur, S. Swaminathan, B.L. Sykes, D. Sylte, C.E.I. Szeke, R. Tabarés-Seisdedos, S.K. Tadakamadla, G.R. Taffere, J.S. Takala, N. Tandon, D. Tanne, Y.L. Tarekgn, M. Tavakkoli, N. Taveira, H.R. Taylor, T.K. Tegegne, A. Tehrani-Banihashemi, T. Tekelab, A.S. Terkawi, D.J. Tesfaye, B. Tessaema, J.S. Thakur, O. Thamsuwan, A.M. Theadom, A.M. Theis, K.E. Thomas, N. Thomas, R. Thompson, A.G. Thrift, R. Tobe-Gai, M. Tobollik, M. Tonelli, R. Topor-Madry, M. Tortajada, M. Touvier, J. Traebert, B.K. Tran, C. Troeger, T. Truelsen, D. Tsoi, E.M. Tuzcu, H. Tymeson, S. Tyrovolas, K.N. Ukwaja, E.A. Undurraga, C.J. Uneke, R. Updike, O.A. Uthman, B.S.C. Uzochukwu, J.F.M. van Boven, S. Varughese, T. Vasankari, L.J. Veerman, S. Venkatesh, N. Venkatesubramanian, R. Vidavalur, L. Vijayakumar, F.S. Violante, A. Vishnu, S.K. Vladimirov, V.V. Vlassov, S.E. Vollset, T. Vos, F. Wadilo, T. Wakayo, M.T. Wallin, Y.P. Wang, S. Weichenthal, E. Weiderpass, R.G. Weintraub, D.J. Weiss, A. Werdecker, R. Westerman, H.A. Whiteford, T. Wijeratne, H.C. Williams, C.S. Wiyongse, B.G. Woldeyes, C.D.A. Wolfe, R. Woodbrook, A.D. Woolf, A. Workicho, D. Xavier, G. Xu, S. Yadgir, M. Yaghoubi, B. Yakob, L.L. Yan, Y. Yano, P. Ye, M.K. Yihdego, H.H. Yimam, P. Yip, N. Yonemoto, S.J. Yoon, M. Yotebieng, M.Z. Younis, C. Yu, Z. Zaidi, M.E.S. Zaki, E.A. Zegeye, Z.M. Zenebe, X. Zhang, Y. Zheng, M. Zhou, B. Zipkin, S. Zodpey, L. Zoeckler, L.J. Zuhlke, Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, *Lancet*. (2017) [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32130-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32130-X).
- [3] L. Manchikanti, V. Singh, S. Datta, S.P. Cohen, J.A. Hirsch, Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain, *Pain Physician* 12 (4) (2009) <https://doi.org/10.1016/j.jmpt.2008.08.003> E35–70.
- [4] W.J. Wang, X.H. Yu, C. Wang, W. Yang, W.S. He, S.J. Zhang, Y.G. Yan, J. Zhang, MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration, *Clin. Chim. Acta* 448 (2015) 238–246, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.06.023>.
- [5] D. Hoy, P. Brooks, F. Blyth, R. Buchbinder, The Epidemiology of low back pain, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 24 (2010) 769–781, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2010.10.002>.
- [6] L. March, E.U.R. Smith, D.G. Hoy, M.J. Cross, L. Sanchez-Riera, F. Blyth, R. Buchbinder, T. Vos, A.D. Woolf, Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* (2014) <https://doi.org/10.1016/j.berh.2014.08.002>.
- [7] K.M.C. Cheung, J. Karppinen, D. Chan, D.W.H. Ho, Y.-Q. Song, P. Sham, K.S.E. Cheah, J.C.Y. Leong, K.D.K. Luk, Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals, *Spine (Phila. Pa. 1976)* 34 (2009) 934–940, <https://doi.org/10.1097/BR5.0b013e3181a01b3f>.
- [8] G.B.J. Andersson, Epidemiological features of chronic low-back pain, *Lancet*. 354 (1999) 581–585, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01312-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01312-4).
- [9] J.P.G. Urban, S. Roberts, Degeneration of the intervertebral disc, *Arthritis Res. Ther.* 5 (2003) 120–130, <https://doi.org/10.1186/ar629>.
- [10] S.K. Mirza, A.A. White, Anatomy of intervertebral disc and pathophysiology of herniated disc disease, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 13 (1995) 131–142, <https://doi.org/10.1089/clm.1995.13.131>.
- [11] Z. Zhou, M. Gao, F. Wei, J. Liang, W. Deng, X. Dai, G. Zhou, X. Zou, Shock absorbing function study on denuded intervertebral disc with or without hydrogel injection through static and dynamic biomechanical tests in vitro, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) <https://doi.org/10.1155/2014/461724>.
- [12] B.R. Whitley, X. Wen, Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration, *Mater. Sci. Eng. C* 32 (2012) 61–77, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.10.011>.
- [13] L.A. Setton, J. Chen, Cell mechanics and mechanobiology in the intervertebral disc, *Spine* 29 (2004) (1976) 2710–2723, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146050.57722.2a>.
- [14] G. Fontana, E. See, A. Pandit, Current trends in biologics delivery to restore intervertebral disc anabolism, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 84 (2015) 146–158, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.008>.
- [15] A. Maroudas, R.A. Stockwell, A. Nachemson, J. Urban, Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro, *J. Anat.* 120 (1975) 113–130, <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=1184452&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- [16] J.J. Trout, J.A. Buckwalter, K.C. Moore, et al., *Anat. Rec.* 204 (1982) 307–314, <https://doi.org/10.1002/ar.1092040403>.
- [17] J. Chen, W. Yan, L.A. Setton, et al., *Eur. Cells Mater.* (2005) <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0088-x> p. 16.
- [18] P. Colombier, A. Camus, L. Lescaudron, J. Clouet, J. Guicheux, Intervertebral disc regeneration: A great challenge for tissue engineers, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 433–435, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.006>.
- [19] X. Yang, X. Li, Nucleus pulposus tissue engineering: a brief review, *Eur. Spine J.* 18 (2009) 1564–1572, <https://doi.org/10.1007/s00586-009-1092-8>.
- [20] C.J. Hunter, J.R. Matyas, N.A. Duncan, The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering, *Tissue Eng.* 9 (2003) 667–677, <https://doi.org/10.1089/107632703768247368>.
- [21] P. Colombier, J. Clouet, O. Hamel, L. Lescaudron, J. Guicheux, The lumbar intervertebral disc: from embryonic development to degeneration, *Jt. Bone Spine* 81 (2014) 125–129, <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.07.012>.
- [22] C.J. Hunter, J.R. Matyas, N.A. Duncan, The functional significance of cell clusters in the notochordal nucleus pulposus: survival and signaling in the canine intervertebral disc, *Spine (Phila Pa 1976)* 29 (2004) 1099–1104 (doi:00007632-200405150-00010 [pii]).
- [23] W.M. Erwin, K. Ashman, P. O'Donnel, R.D. Inman, Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes, *Arthritis Rheum.* 54 (2006) 3859–3867, <https://doi.org/10.1002/art.22258>.
- [24] W.M. Erwin, The Notochord, Notochordal cell and CTGF/CCN-2: ongoing activity from development through maturation, *J. Cell Commun. Signal.* 2 (2008) 59–65, <https://doi.org/10.1007/s12079-008-0031-5>.
- [25] J.G. Abreu, N.I. Ketpura, B. Reversade, E.M. De Robertis, Connective-tissue growth factor (ctgf) modulates cell signalling by bmp and TGF- β , *Nat. Cell Biol.* (2002) <https://doi.org/10.1038/ncb826>.
- [26] T. Winkler, E.J. Mahoney, D. Sinner, C.C. Wylie, C.L. Dahia, Wnt signaling activates Shh signaling in early postnatal intervertebral discs, and re-activates Shh signaling in old discs in the mouse, *PLoS One* (2014) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098444>.
- [27] C.L. Dahia, E. Mahoney, C. Wylie, Shh signaling from the nucleus pulposus is required for the postnatal growth and differentiation of the mouse intervertebral disc, *PLoS One* (2012) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035944>.
- [28] C.L. Dahia, E.J. Mahoney, A.A. Durrani, C. Wylie, Intercellular signaling pathways active during intervertebral disc growth, differentiation, and aging, *Spine (Phila. Pa. 1976)* (2009) <https://doi.org/10.1097/BR5.0b013e3181913e98>.
- [29] A.J. Hayes, J.R. Ralphs, The response of foetal annulus fibrosus cells to growth factors: modulation of matrix synthesis by TGF- β 1 and IGF-1, *Histochem. Cell Biol.* (2011) <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0835-x>.
- [30] C.C. Guterl, E.Y. See, S.B.G. Blanquer, A. Pandit, S.J. Ferguson, L.M. Benneker, D.W. Grijpma, D. Sakai, D. Eglin, M. Alini, J.C. Iatridis, S. Grad, Challenges and strategies in the repair of ruptured annulus fibrosus, *Eur. Cell. Mater.* 25 (2013) 1–21, <https://doi.org/10.1016/j.jbsmb.2011.07.002> Identification.
- [31] F. Marchand, A.M. Ahmed, et al., *Spine (Phila Pa 1976)* 15 (1990) 402–410, <https://doi.org/10.1097/00007632-199005000-00011>.
- [32] J. Yu, Elastic tissues of the intervertebral disc, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 848–852, <https://doi.org/10.1042/bst0300848>.
- [33] P.P. Raj, Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment, *Pain Pract.* (2008) <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x>.
- [34] J. Antoniou, T. Steffen, F. Nelson, N. Winterbottom, A.P. Hollander, R.A. Poole, M. Aebi, M. Alini, The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 996–1003, <https://doi.org/10.1172/JCI118884>.
- [35] J.C. Lotz, A.J. Fields, E.C. Liebenberg, The role of the vertebral end plate in low back pain, *Glob. Spine J.* 3 (2013) 153–163, <https://doi.org/10.1055/s-0033-1347298>.
- [36] E.M. Bartels, J.C. Fairbank, C.P. Winlove, J.P. Urban, Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain, *Spine (Phila Pa 1976)* 23 (1998) 1–7, discussion 8 <https://doi.org/10.1097/00007632-199801010-00002>.
- [37] T. Grunhagen, A. Shirazi-Adl, J.C.T. Fairbank, J.P.G. Urban, Intervertebral disc nutrition: a review of factors influencing concentrations of nutrients and metabolites, *Orthop. Clin. North Am.* 42 (2011) 465–477, <https://doi.org/10.1016/j.jocl.2011.07.010>.
- [38] R. Rajpurohit, M.V. Risbud, P. Ducheyne, E.J. Vresilovic, I.M. Shapiro, Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: Expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2, *Cell Tissue Res.* 308 (2002) 401–407, <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0563-6>.
- [39] M.V. Risbud, A. Guttapalli, D.G. Stokes, D. Hawkins, K.G. Danielson, T.P. Schaer, T.J. Albert, I.M. Shapiro, Nucleus pulposus cells express HIF-1 alpha under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment, *J. Cell. Biochem.* 98 (2006) 152–159, <https://doi.org/10.1002/jcb.20765>.

- [40] N. Kalsion, S. Richardson, J. Hoyland, Strategies for regeneration of the intervertebral disc, *Regen. Med.* 3 (2008) 717–729, <https://doi.org/10.2217/17460751.3.5.717>.
- [41] A. Struglics, M. Hansson, MMP proteolysis of the human extracellular matrix protein aggrecan is mainly a process of normal turnover, *Biochem. J.* 446 (2012) 213–223, <https://doi.org/10.1042/BJ20120274>.
- [42] A.J. Pockert, S.M. Richardson, C.L. Le Maitre, M. Lyon, J.A. Deakin, D.J. Buttle, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration, *Arthritis Rheum.* 60 (2009) 482–491, <https://doi.org/10.1002/art.24291>.
- [43] H.J. Wilke, P. Neef, M. Caimi, T. Hoogland, L.E. Claes, New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life, *Spine (Phila Pa 1976)* 24 (8) (1999) 755–762, <https://doi.org/10.1097/00007632-199904150-00005>.
- [44] B. Johnstone, J.P. Urban, S. Roberts, J. Menage, The fluid content of the human intervertebral disc. Comparison between fluid content and swelling pressure profiles of discs removed at surgery and those taken postmortem, *Spine* 17 (1992) (1976) 412–416, <https://doi.org/10.1097/00007632-199204000-00006>.
- [45] M.A. Adams, P.J. Roughley, What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* 31 (2006) (1976) 2151–2161, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c>.
- [46] P. Brinckmann, W. Frobin, E. Hierholzer, M. Horst, Deformation of the vertebral end-plate under axial loading of the spine, *Spine* 8 (1983) 851–856, <https://doi.org/10.1097/00007632-198311000-00007>.
- [47] N. Yoganandan, D.J. Maiman, F. Pintar, G. Ray, J.B. Myklebust, A. Sances, S.J. Larson, Microtrauma in the lumbar spine: a cause of low back pain, *Neurosurgery* 23 (1988) 162–168, <https://doi.org/10.1227/00006123-198808000-00006>.
- [48] S. Roberts, Disc morphology in health and disease, *Biochem. Soc. Trans.* (2002) <https://doi.org/10.1042/bst0300864>.
- [49] M.C. Battié, T. Videman, E. Levalahti, K. Gill, J. Kaprio, Heritability of low back pain and the role of disc degeneration, *Pain* (2007) <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.01.010>.
- [50] L. Kalichman, D.J. Hunter, The genetics of intervertebral disc degeneration. Associated genes, *Joint. Bone. Spine* 75 (2008) 388–396, <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.11.002>.
- [51] A.G. Hadjipavlou, M.N. Tzermianian, N. Bogduk, M.R. Zindrick, The pathophysiology of disc degeneration: a critical review, *J. Bone Jt. Surg. - Br. Vol.* 90-B (2008) 1261–1270, <https://doi.org/10.1302/0301-620X.90B10.20910>.
- [52] R. Shiri, J. Karppinen, P. Leino-Arjas, S. Solovieva, E. Viikari-Juntura, The association between obesity and low back pain: a meta-analysis, *Am. J. Epidemiol.* (2010) <https://doi.org/10.1093/aje/kwp356>.
- [53] L. Manchikanti, V. Singh, S. Datta, S.P. Cohen, J.A. Hirsch, Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain, *Pain Phys.* 12 (2009) E35–E70, <https://doi.org/10.1016/j.jmppt.2008.08.003>.
- [54] S. Elmasry, S. Asfour, J.P. De Rivero Vaccari, F. Travascio, Effects of tobacco smoking on the degeneration of the intervertebral disc: a finite element study, *PLoS One* (2015) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136137>.
- [55] A.J. Freemont, The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain, *Rheumatology* 48 (2009) 5–10, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken396>.
- [56] L.J. Smith, N.L. Nerurkar, K.-S. Choi, B.D. Harfe, D.M. Elliott, Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development, *Dis. Model. Mech.* (2011) <https://doi.org/10.1242/dmm.006403>.
- [57] K. Luoma, H. Riihimäki, R. Luukkainen, R. Raininko, E. Viikari-Juntura, A. Lamminen, Low back pain in relation to lumbar disc degeneration, *Spine (Phila Pa 1976)* 25 (2000) 487–492, <https://doi.org/10.1097/00007632-200002150-00016>.
- [58] W. Erwin, D. Islam, R.D. Inman, M.G. Fehlings, F.W. Tsui, Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration, *Arthritis Res. Ther.* 13 (2011) R215, <https://doi.org/10.1186/ar3548>.
- [59] P. Colombier, J. Clouet, C. Boyer, M. Ruel, G. Bonin, J. Lesoeur, A. Moreau, B.H. Fellah, P. Weiss, L. Lescaudron, A. Camus, J. Guicheux, TGF- β 1 and GDF5 act synergistically to drive the differentiation of human adipose stromal cells toward nucleus pulposus-like cells, *Stem Cells* 34 (2016) 653–667, <https://doi.org/10.1002/stem.2249>.
- [60] J.A. Maier, B.D. Harfe, Nuclei pulposi formation from the embryonic notochord occurs normally in GDF-5-deficient mice, *Spine* 36 (2011) (1976) E1555–E1561, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318210e0c4>.
- [61] H.E. Gruber, G.L. Hoelscher, J.A. Ingram, S. Bethea, E.N.J. Hanley, Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) in the human intervertebral annulus cells and its modulation by IL-1 α and TNF- α in vitro, *Exp. Mol. Pathol.* 96 (2014) 225–229, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.02.005>.
- [62] C. Feng, H. Liu, Y. Yang, B. Huang, Y. Zhou, Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc, *Cell. Physiol. Biochem.* 35 (2015) 1–16, <https://doi.org/10.1159/000369670>.
- [63] C. Weiler, A. Nerlich, J. Zipperer, B. Bachmeier, N. Boos, 2002 SSE award competition in basic science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption, *Eur. Spine J.* 11 (2002) 308–320, <https://doi.org/10.1007/s00586-002-0472-0>.
- [64] B.E. Bachmeier, A. Nerlich, N. Mittermaier, C. Weiler, K. Lumenta, K. Wuerzt, N. Boos, Matrix metalloproteinase expression levels suggest distinct enzyme roles during lumbar disc herniation and degeneration, *Eur. Spine J.* (2009) <https://doi.org/10.1007/s00586-009-1031-8>.
- [65] M.V. Risbud, I.M. Shapiro, Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content, *Nat. Rev. Rheumatol.* 10 (2014) 44–56, <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.160>.
- [66] T. Ohba, H. Haro, T. Ando, M. Wako, F. Suenaga, Y. Aso, K. Koyama, Y. Hamada, A. Nakao, TNF- α -induced NF- κ B signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues, *J. Orthop. Res.* 27 (2009) 229–235, <https://doi.org/10.1002/jor.20727>.
- [67] J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, O. Hamel, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux, The intervertebral disc: From pathophysiology to tissue engineering, *Jt. Bone Spine* 76 (2009) 614–618, <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.07.002>.
- [68] C.A. Séguin, R.M. Pilliar, P.J. Roughley, R.A. Kandel, Tumor necrosis factor- α modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue, *Spine (Phila Pa 1976)* 30 (17) (2005) 1940–1948 (doi:00007632-200509010-00006 [pii]).
- [69] C.L. Le Maitre, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration, *Arthritis Res. Ther.* (2005) <https://doi.org/10.1186/ar1732>.
- [70] C.L. Le Maitre, J.A. Hoyland, A.J. Freemont, Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1 β and TNF α expression profile, *Arthritis Res. Ther.* (2007) <https://doi.org/10.1186/ar2275>.
- [71] S. Roberts, H. Evans, J. Trivedi, J. Menage, Histology and pathology of the human intervertebral disc, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* (2006) <https://doi.org/10.1021/bi060673f>.
- [72] N. Henry, P. Colombier, L. Lescaudron, O. Hamel, J. Le Bideau, J. Guicheux, J. Clouet, Regenerative medicine of the intervertebral disc: from pathophysiology to clinical application, *Med. Sci. (Paris)* 30 (2014) 1091–1100, <https://doi.org/10.1051/medsci/20143012012>.
- [73] T. Aigner, K.R. Gresk-otter, J.C. Fairbank, K. von der Mark, J.P. Urban, Variation with age in the pattern of type X collagen expression in normal and scoliotic human intervertebral discs, *Calcif. Tissue Int.* 63 (1998) 263–268, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701632>.
- [74] H.T. Hee, Y.J. Chuah, B.H.M. Tan, T. Setiobudi, H.K. Wong, Vascularization and morphological changes of the endplate after axial compression and distraction of the intervertebral disc, *Spine* 36 (2011) (1976) 505–511, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181d32410>.
- [75] R.C. Paletta, R.L. Burger, V.L. Ferguson, Mineralization and collagen orientation throughout aging at the vertebral endplate in the human lumbar spine, *J. Struct. Biol.* 184 (2013) 310–320, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.08.011>.
- [76] Y.C. Huang, J.P.G. Urban, K.D.K. Luk, Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014 <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.91>.
- [77] H.A. Horner, J.P. Urban, 2001 Volvo award winner in basic science studies: effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc, *Spine (Phila Pa 1976)* 26 (2001) 2543–2549, <https://doi.org/10.1097/00007632-200112010-00006>.
- [78] C.K. Kepler, D.G. Anderson, C. Tannoury, R.K. Ponnappan, Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments, *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* (2011) <https://doi.org/10.5435/00124635-201109000-00005>.
- [79] V.Y.L. Leung, W.C.W. Chan, S.-C. Hung, K.M.C. Cheung, D. Chan, Matrix remodeling during intervertebral disc growth and degeneration detected by multichromatic FAST Staining, *J. Histochem. Cytochem.* 57 (2009) 249–256, <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952184>.
- [80] F. Rannou, T.-S. Lee, R.-H. Zhou, J. Chin, J.C. Lotz, M.-A. Mayoux-Benhamou, J.P. Barbet, A. Chevrot, J.Y.-J. Shyy, Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload, *Am. J. Pathol.* 164 (2004) 915–924, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63179-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63179-3).
- [81] F. Heuer, H. Schmidt, H.J. Wilke, The relation between intervertebral disc bulging and annular fiber associated strains for simple and complex loading, *J. Biomech.* (2008) <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.11.019>.
- [82] M.A. Adams, P. Lama, U. Zehra, P. Dolan, Why do some intervertebral discs degenerate, when others (in the same spine) do not? *Clin. Anat.* (2015) <https://doi.org/10.1002/ca.22404>.
- [83] N. Schwarz, Retrospective and concurrent self-reports: the rationale for real-time data capture, *Sci. Real-Time Data Capture Self-Reports Heal. Res.* (2007) 11–26.
- [84] A. Kongsted, C. Leboeuf-Yde, The Nordic back pain subpopulation program - individual patterns of low back pain established by means of text messaging: a longitudinal pilot study, *Chiropr. Osteopat.* 27 (2009) 493–502, <https://doi.org/10.1016/j.jmppt.2004.08.001>.
- [85] C. Maher, M. Underwood, R. Buchbinder, Non-specific low back pain, *Lancet.* 389 (2017) 736–747, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30970-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30970-9).
- [86] M.T. Modic, P.M. Steinberg, J.S. Ross, T.J. Masaryk, J.R. Carter, Degenerative disk disease: detection of changes in vertebral body marrow with MR imaging, *Radiology.* 166 (1988) 193–199, <https://doi.org/10.1148/radiology.166.1.3336678>.
- [87] C.W.A. Pfirrmann, A. Metzendorf, M. Zanetti, J. Hodler, N. Boos, Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration, *Spine* 26 (2001) (1976) 1873–1878, <https://doi.org/10.1097/00007632-200109010-00011>.
- [88] D.G. Anderson, C. Tannoury, Molecular pathogenic factors in symptomatic disc degeneration, *Spine J.* 5 (2005) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2005.02.010>.
- [89] A. Durocher, S. Laversin, Diagnostic, prise en charge et suivi des malades atteints de lombalgie chronique, *Www.Has-Sante.Fr.* 2000 [https://doi.org/10.1016/S1169-8330\(02\)00303-4](https://doi.org/10.1016/S1169-8330(02)00303-4).
- [90] R. Chou, A. Qaseem, V. Snow, D. Casey, T.J. Cross, P. Shekelle, D.K. Owens, 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 (2007) 478–491, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-147-7-200710020-00006>.
- [91] M.A. Stafford, P. Peng, D.A. Hill, Sciatica: a review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management, *Br. J. Anaesth.* 99 (2007) 461–473, <https://doi.org/10.1093/bja/aem238>.
- [92] L. Kuritzky, G.P. Samraj, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of low back pain, *J. Pain Res.* 5 (2012) 579–590, <https://doi.org/10.2147/JPR.S6775>.

- [93] B.I. Martin, R.A. Deyo, S.K. Mirza, J.A. Turner, B.A. Comstock, W. Hollingworth, S.D. Sullivan, Expenditures and health status among adults with back and neck problems, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 299 (2008) 656–664, <https://doi.org/10.1001/jama.299.6.656>.
- [94] C.M. Bono, S.R. Garfin, History and evolution of disc replacement, *Spine J.* 4 (2004) 1455–1505, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2004.07.005>.
- [95] K.D. Van Den Eerenbeemt, R.W. Ostelo, B.J. Van Royen, W.C. Peul, M.W. Van Tulder, Total disc replacement surgery for symptomatic degenerative lumbar disc disease: a systematic review of the literature, *Eur. Spine J.* 19 (2010) 1262–1280, <https://doi.org/10.1007/s00586-010-1445-3>.
- [96] R.A. Deyo, S.K. Mirza, Trends and variations in the use of spine surgery, *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2006) 139–146, <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000198726.62514.75>.
- [97] P.P.A. Vergroesen, I. Kingma, K.S. Emanuel, R.J.W. Hoogendoorn, T.J. Welting, B.J. van Royen, J.H. van Dieën, T.H. Smit, Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle, *Osteoarthritis. Cartil.* 23 (2015) 1057–1070, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.028>.
- [98] D.J. Buttle, Factors controlling matrix turnover in health and disease, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 643–646, <https://doi.org/10.1042/BST0350643>.
- [99] N. Henry, J. Clouet, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux, Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: from cell therapies to multiscale delivery systems, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 281–294, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.009>.
- [100] G. Vadalà, F. Russo, G. Pattappa, D. Schiuma, M. Peroglio, L.M. Benneker, S. Grad, M. Alini, V. Denaro, The transpedicular approach as an alternative route for intervertebral disc regeneration, *Spine* 2013 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318285bc4a>.
- [101] L. Le Fournier, M. Fusellier, B. Halgand, J. Lesoeur, O. Gauthier, P. Menei, C. Montero-Menei, J. Guicheux, J. Clouet, The transpedicular surgical approach for the development of intervertebral disc targeting regenerative strategies in an ovine model, *Eur. Spine J.* 26 (8) (2017) 2072–2083, <https://doi.org/10.1007/s00586-017-5199-z>.
- [102] J. Clouet, M. Fusellier, A. Camus, C. Le Visage, J. Guicheux, Intervertebral disc regeneration: from cell therapy to the development of novel bioinspired endogenous repair strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018) <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.017>.
- [103] S. Seki, Y. Asanuma-Abe, K. Masuda, Y. Kawaguchi, K. Asanuma, C. Muehleman, A. Iwai, T. Kimura, Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMT55 on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular needle-puncture model, *Arthritis Res. Ther.* (2009) <https://doi.org/10.1186/ar2851>.
- [104] S.K. Leckie, B.P. Bechara, R.A. Hartman, G.A. Sowa, B.I. Woods, J.P. Coelho, W.T. Witt, Q.D. Dong, B.W. Bowman, K.M. Bell, N.V. Vo, B. Wang, J.D. Kang, Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model, *Spine J.* (2012) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2011.09.011>.
- [105] S. Genevay, S. Stingelin, C. Gabay, Efficacy of etanercept in the treatment of acute, severe sciatica: a pilot study, *Ann. Rheum. Dis.* (2004) <https://doi.org/10.1136/ard.2003.016451>.
- [106] S. Genevay, A. Finckh, P. Zufferey, S. Viatte, F. Balagué, C. Gabay, Adalimumab in acute sciatica reduces the long-term need for surgery: a 3-year follow-up of a randomised double-blind placebo-controlled trial, *Ann. Rheum. Dis.* (2012) <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200373>.
- [107] S. Genevay, S. Viatte, A. Finckh, P. Zufferey, F. Balagué, C. Gabay, Adalimumab in severe and acute sciatica: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum.* (2010) <https://doi.org/10.1002/art.27499>.
- [108] S.P. Cohen, N. Bogduk, A. Dragovich, C.C. Buckenmaier, S. Griffith, C. Kurihara, J.L. Raymond, P.J. Richter, N. Williams, T.L. Yaksh, Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response, and predelinical safety study of transforaminal epidural etanercept for the treatment of sciatica, *Anesthesiology.* (2009) <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181a05aa0>.
- [109] E. Tobinick, S. Davoodifar, Efficacy of etanercept delivered by perispinal administration for chronic back and/or neck disc-related pain: a study of clinical observations in 143 patients, *Curr. Med. Res. Opin.* (2004) <https://doi.org/10.1185/030079903125004286>.
- [110] T. Korhonen, J. Karppinen, L. Paimela, A. Malmivaara, K.-A. Lindgren, C. Bowman, A. Hammond, B. Kirkham, S. Järvinen, J. Niinimäki, N. Veeger, M. Haapea, M. Torkki, O. Tervonen, S. Seitsalo, H. Hurri, The treatment of disc-herniation-induced sciatica with infliximab: one-year follow-up results of FIRST II, a randomized controlled trial, *Spine (Phila. Pa. 1976)* (2006) <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000245873.23876.1e>.
- [111] D.J. Gorth, R.L. Mauck, J.A. Chiaro, B. Mohanraj, N.M. Hebel, G.R. Dodge, D.M. Elliott, L.J. Smith, IL-1 α delivered from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres attenuates IL-1 β -mediated degradation of nucleus pulposus in vitro, *Arthritis Res. Ther.* (2012) <https://doi.org/10.1186/ar3932>.
- [112] C.L. Le Maitre, J.A. Hoyland, A.J. Freemont, 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.* (2007) <https://doi.org/10.1186/ar28282>.
- [113] S.M. Sinclair, M.F. Shamji, J. Chen, L. Jing, W.J. Richardson, C.R. Brown, R.D. Fitch, L.A. Setton, Attenuation of inflammatory events in human intervertebral disc cells with a tumor necrosis factor antagonist, *Spine* 2011 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181ebdb43>.
- [114] B.A. Walter, D. Purmessur, M. Likhitanichkul, A. Weinberg, S.K. Cho, S.A. Qureshi, A.C. Hecht, J.C. Iatridis, Inflammatory kinetics and efficacy of anti-inflammatory treatments on human nucleus pulposus cells, *Spine* 2015 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000000932>.
- [115] R.K. Studer, L.G. Gilbertson, H. Georgescu, G. Sowa, N. Vo, J.D. Kang, p38 MAPK inhibition modulates rabbit nucleus pulposus cell response to IL-1, *J. Orthop. Res.* 26 (2008) 991–998, <https://doi.org/10.1002/jor.20604>.
- [116] M. Klawitter, L. Quero, J. Klase, T. Liebscher, A. Nerlich, N. Boos, K. Wuertz, Triptolide exhibits anti-inflammatory, anti-catabolic as well as anabolic effects and suppresses TLR expression and MAPK activity in IL-1 β treated human intervertebral disc cells, *Eur. Spine J.* (2012) <https://doi.org/10.1007/s00586-011-1919-y>.
- [117] M.H. Hu, K.C. Yang, Y.J. Chen, Y.H. Sun, S.H. Yang, Lovastatin prevents discography-associated degeneration and maintains the functional morphology of intervertebral discs, *Spine J.* (2014) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2014.03.050>.
- [118] G.Q. Teixeira, C. Leite Pereira, F. Castro, J.R. Ferreira, M. Gomez-Lazaro, P. Aguiar, M.A. Barbosa, C. Neidlinger-Wilke, R.M. Goncalves, Anti-inflammatory Chitosan/Poly- γ -glutamic acid nanoparticles control inflammation while remodeling extracellular matrix in degenerated intervertebral disc, *Acta Biomater.* (2016) <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.013>.
- [119] L.A. Nasto, H.Y. Seo, A.R. Robinson, J.S. Tilstra, C.L. Clauson, G.A. Sowa, K. Ngo, Q. Dong, E. Pola, J.Y. Lee, L.J. Niedernhofer, J.D. Kang, P.D. Robbins, N.V. Vo, ISSLS prize winner: Inhibition of NF- κ B activity ameliorates age-associated disc degeneration in a mouse model of accelerated aging, *Spine* 2012 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31824ee8f7>.
- [120] K. Takegami, E.J.M.A. Thonar, H.S. An, H. Kamada, K. Masuda, Osteogenic protein-1 enhances matrix replenishment by intervertebral disc cells previously exposed to interleukin-1, *Spine (Phila Pa 1976)* (2002) <https://doi.org/10.1097/00007632-200206150-00014>.
- [121] K. Masuda, K. Takegami, H. An, F. Kumano, K. Chiba, G.B.J. Andersson, T. Schmid, E. Thonar, Recombinant osteogenic protein-1 upregulates extracellular matrix metabolism by rabbit annulus fibrosus and nucleus pulposus cells cultured in alginate beads, *J. Orthop. Res.* (2003) [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(03\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(03)00037-8).
- [122] K. Takegami, H.S. An, F. Kumano, K. Chiba, E.J. Thonar, K. Singh, K. Masuda, 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.* (2005) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2004.11.001>.
- [123] Y. Imai, K. Miyamoto, H.S. An, E.J.M.A. Thonar, G.B.J. Andersson, K. Masuda, Recombinant human osteogenic protein-1 upregulates proteoglycan metabolism of human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells, *Spine* 2007 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3180593238>.
- [124] Z. Wang, W.C. Hutton, S.T. Yoon, Bone morphogenetic protein-7 antagonizes tumor necrosis factor- α -induced activation of nuclear factor κ b and up-regulation of the ADAMTS, leading to decreased degradation of disc matrix macromolecules aggrecan and collagen II, *Spine J.* (2014) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.08.016>.
- [125] Y. Imai, H. An, C. Nguyen, C. Muehleman, E. Thonar, G. Anderson, K. Masuda, Chondroitinase ABC-induced intervertebral disc degeneration is minimized when the enzyme is co-injected with osteogenic protein-1, *Spine J.* (2002) [https://doi.org/10.1016/S1529-9430\(02\)00231-0](https://doi.org/10.1016/S1529-9430(02)00231-0).
- [126] K. Masuda, Y. Imai, M. Okuma, C. Muehleman, K. Nakagawa, K. Akeida, E. Thonar, G. Andersson, H.S. An, Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model, *Spine* 2006 (1976) <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000206358.66412.7b>.
- [127] K. Miyamoto, K. Masuda, J.G. Kim, N. Inoue, K. Akeida, G.B.J. Andersson, H.S. An, Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs, *Spine J.* (2006) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2006.04.014>.
- [128] H.S. An, K. Takegami, H. Kamada, C.M. Nguyen, E.J.M.A. Thonar, K. Singh, G.B. Andersson, K. Masuda, Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal a, *Spine* 2005 (1976) <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000148002.68656.4d>.
- [129] S. Chubinskaya, M. Kawakami, L. Rappoport, T. Matsumoto, N. Migita, D.C. Rueger, Anti-catabolic effect of OP-1 in chronically compressed intervertebral discs, *J. Orthop. Res.* (2007) <https://doi.org/10.1002/jor.20339>.
- [130] M.K. Pichika, H. An, K. Asanuma, H. Tonomura, M. Lenz, Intradiscal injection of recombinant human bone morphogenetic protein-7 significantly suppressed the expression of cytokines and catabolic enzymes in the rabbit anular puncture model, *Ortho. Res. Soc. Trans.* 33 (2008) 1289, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318158dea6>.
- [131] N. Willems, F.C. Bach, S.G.M. Plomp, M.H.P. van Rijen, J. Wolfswinkel, G.C.M. Grinwis, C. Bos, G.J. Strijkers, W.J.A. Dhert, B.P. Meij, L.B. Creemers, M.A. Tryfonidou, Intradiscal application of rhBMP-7 does not induce regeneration in a canine model of spontaneous intervertebral disc degeneration, *Arthritis Res. Ther.* (2015) <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0625-2>.
- [132] S.T. Yoon, K.S. Kim, J. Li, J.S. Park, T. Akamaru, W.A. Elmer, W.C. Hutton, The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells in vitro, *Spine* 2003 (1976) <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000083204.44190.34>.
- [133] J. Li, S.T. Yoon, W.C. Hutton, Effect of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on matrix production, other BMPs, and BMP receptors in rat intervertebral disc cells, *J. Spinal Disord. Tech.* (2004) <https://doi.org/10.1097/01.bsd.0000112084.85112.5d>.
- [134] C. Feng, H. Liu, Y. Yang, B. Huang, Y. Zhou, Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc, *Cell. Physiol. Biochem.* 35 (2015) 1–16, <https://doi.org/10.1159/000369670>.
- [135] X. Li, B.M. Leo, G. Beck, G. Balian, D.G. Anderson, Collagen and proteoglycan abnormalities in the GDF-5-deficient mice and molecular changes when treating disk cells with recombinant growth factor, *Spine* 2004 (1976) <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000142427.82605.fb>.

- [136] H. Wang, M. Kroeber, M. Hanke, R. Ries, C. Schmid, W. Poller, W. Richter, Release of active and depot GDF-5 after adenovirus-mediated overexpression stimulates rabbit and human intervertebral disc cells, *J. Mol. Med.* (2004) <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0507-y>.
- [137] M. Cui, Y. Wan, D.G. Anderson, F.H. Shen, B.M. Leo, C.T. Laurencin, G. Balian, X. Li, Mouse growth and differentiation factor-5 protein and DNA therapy potentiates intervertebral disc cell aggregation and chondrogenic gene expression, *Spine J.* (2008) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2007.05.012>.
- [138] T. Chujo, H.S. An, K. Akeda, K. Miyamoto, C. Muehleman, M. Attawia, G. Andersson, K. Masuda, Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc - In vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study, *Spine* 31 (2006) 2909–2917, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000248428.22823.86>.
- [139] H. Liang, S.Y. Ma, G. Feng, F.H. Shen, X. Joshua Li, Therapeutic effects of adenovirus-mediated growth and differentiation factor-5 in a mice disc degeneration model induced by annulus needle puncture, *Spine J.* (2010) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2009.10.006>.
- [140] T. Chujo, H.S. An, R. Takatori, N. Inoue, M. Attawia, C.-K. Lee, C. Muehleman, K. Masuda, Single injection of recombinant human GDF-5 effectively restores mature rabbit of intervertebral discs degenerated by annular puncture, *Trans Orthop Res Soc.* 267 (2007).
- [141] G. Vadalà, P. Mozetich, A. Rainer, M. Centola, M. Loppini, M. Trombetta, V. Denaro, Bioactive electropun scaffold for annulus fibrosus repair and regeneration, *Eur. Spine J.* (2012) <https://doi.org/10.1007/s00586-012-2235-x>.
- [142] O. Guillaume, A. Daly, K. Lennon, J. Gansau, S.F. Buckley, C.T. Buckley, Shape-memory porous alginate scaffolds for regeneration of the annulus fibrosus: effect of TGF- β 3 supplementation and oxygen culture conditions, *Acta Biomater.* (2014) <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.037>.
- [143] J.P. THOMPSON, T.R. OEGEMA, D. BRADFORD, Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors, *Spine* 1991 (1976) <https://doi.org/10.1097/00007632-199103000-00001>.
- [144] K. Nishida, J.D. Kang, J.K. Suh, P.D. Robbins, C.H. Evans, L.G. Gilbertson, Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration, *Spine (Phila Pa 1976)* 23 (1998) 2437–2442, <https://doi.org/10.1097/00007632-199811150-00016>.
- [145] C.M. Tran, D. Markova, H.E. Smith, B. Susarla, R.K. Ponnappan, D.G. Anderson, A. Symes, I.M. Shapiro, M.V. Risbud, Regulation of CCN2/connective tissue growth factor expression in the nucleus pulposus of the intervertebral disc: Role of smad and activator protein 1 signaling, *Arthritis Rheum.* (2010) <https://doi.org/10.1002/art.27445>.
- [146] R. Osada, H. Ohshima, H. Ishihara, K. Yudoh, K. Sakai, H. Matsui, H. Tsuji, Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs, *J. Orthop. Res.* (1996) <https://doi.org/10.1002/jor.1100140503>.
- [147] H.E. Gruber, H.J. Norton, E.N. Hanley, Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro, *Spine (Phila Pa 1976)* 25 (2000) 2153–2157, <https://doi.org/10.1097/00007632-200009010-00002>.
- [148] S. Illien-Jünger, G. Pattappa, M. Peroglio, L.M. Benneker, M.J. Stoddart, D. Sakai, J. Mochida, S. Grad, M. Alini, Homing of mesenchymal stem cells in induced degenerative intervertebral discs in a whole organ culture system, *Spine (Phila Pa 1976)* (2012) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182544a8a>.
- [149] H. Pratsinis, D. Kleitas, PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways, *Eur. Spine J.* (2007) <https://doi.org/10.1007/s00586-007-0408-9>.
- [150] S.M. Presciutti, D.N. Paglia, T. Karukonda, D.Y. Soung, R. Guzzo, H. Drissi, I.L. Moss, PDGF-BB inhibits intervertebral disc cell apoptosis in vitro, *J. Orthop. Res.* (2014) <https://doi.org/10.1002/jor.22638>.
- [151] R. Paul, R.C. Haydon, H. Cheng, A. Ishikawa, N. Nenadovich, W. Jiang, L. Zhou, B. Breyer, T. Feng, P. Gupta, T.C. He, F.M. Phillips, Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease, *Spine* 2003 (1976) <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000058946.64222.92>.
- [152] Y. Zhang, H.S. An, E.J.M.A. Thonar, S. Chubinskaya, T.C. He, F.M. Phillips, Comparative effects of bone morphogenetic proteins and Sox9 overexpression on extracellular matrix metabolism of bovine nucleus pulposus cells, *Spine* 2006 (1976) <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000232792.66632.d8>.
- [153] S. Illien-Jünger, G. Pattappa, M. Peroglio, L.M. Benneker, M.J. Stoddart, D. Sakai, J. Mochida, S. Grad, M. Alini, Homing of mesenchymal stem cells in induced degenerative intervertebral discs in a whole organ culture system, *Spine (Phila Pa 1976)* 37 (2012) 1865–1873, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182544a8a>.
- [154] W.-H. Chen, W.-C. Lo, J.-J. Lee, C.-H. Su, C.-T. Lin, H.-Y. Liu, T.-W. Lin, W.-C. Lin, T.-Y. Huang, W.-P. Deng, Tissue-engineered intervertebral disc and chondrogenesis using human nucleus pulposus regulated through TGF- β 1 in platelet-rich plasma, *J. Cell. Physiol.* (2006) <https://doi.org/10.1002/jcp.20765>.
- [155] K. Akeda, H.S. An, R. Pichika, M. Attawia, E.J.M.A. Thonar, M.E. Lenz, A. Uchida, K. Masuda, Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and annulus fibrosus cells cultured in alginate beads, *Spine (Phila Pa 1976)* (2006) <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000214942.78119.24>.
- [156] H.-J. Kim, J.S. Yeom, Y.-G. Koh, J.-E. Yeo, K.-T. Kang, Y.-M. Kang, B.-S. Chang, C.-K. Lee, Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1, *J. Orthop. Res.* (2014) <https://doi.org/10.1002/jor.22532>.
- [157] S. Obata, K. Akeda, T. Imanishi, K. Masuda, W. Bae, R. Morimoto, Y. Asanuma, Y. Kasai, A. Uchida, A. Sudo, Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit annular puncture model: a preclinical study, *Arthritis Res. Ther.* (2012) <https://doi.org/10.1186/ar4084>.
- [158] I.D. Gelalis, G. Christoforou, A. Charchanti, I. Gkiatas, E. Pakos, D. Papadopoulos, A. Ploumis, A. Koromplias, Autologous platelet-rich plasma (PRP) effect on intervertebral disc restoration: an experimental rabbit model, *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* (2018) <https://doi.org/10.1007/s00590-018-2337-1>.
- [159] K. Comella, S. Robert, P. Michelle, Effects of the intradiscal implantation of stromal vascular fraction plus platelet rich plasma in patients with degenerative disc disease, *J. Transl. Med.* (2017) <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1109-0>.
- [160] Y.A. Tuakli-Wosornu, A. Terry, K. Boachie-Adjei, J.R. Harrison, C.K. Gribbin, E.E. LaSalle, J.T. Nguyen, J.L. Solomon, G.E. Lutz, Lumbar intradiscal platelet-rich plasma (PRP) injections: a prospective, double-blind, randomized controlled study, *PM&R* (2016) <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2015.08.010>.
- [161] F. Mwale, K. Masuda, R. Pichika, L.M. Epure, T. Yoshikawa, A. Hemmad, P.J. Roughley, J. Antoniou, The efficacy of Link N as a mediator of repair in a rabbit model of intervertebral disc degeneration, *Arthritis Res. Ther.* (2011) <https://doi.org/10.1186/ar3423>.
- [162] E.S. Vasiladis, S.G. Pneumaticos, D.S. Evangelopoulos, A.G. Papavassiliou, Biologic treatment of mild and moderate intervertebral disc degeneration, *Mol. Med.* 18 (20) (2014) 400–409, <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00145>.
- [163] K. Ma, Y. Wu, B. Wang, S. Yang, Y. Wei, Z. Shao, Effect of a synthetic link N peptide nanofiber scaffold on the matrix deposition of aggrecan and type II collagen in rabbit notochordal cells, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2013) <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4811-3>.
- [164] R. Gawri, J. Antoniou, J. Ouellet, W. Awwad, T. Steffen, P. Roughley, L. Haglund, F. Mwale, Best paper NASS 2013: link-N can stimulate proteoglycan synthesis in the degenerated human intervertebral discs, *Eur. Cells Mater.* (2013) <https://doi.org/10.22203/ECM.v026a08>.
- [165] F. Mwale, H.T. Wang, P. Roughley, J. Antoniou, L. Haglund, Link N and mesenchymal stem cells can induce regeneration of the early degenerate intervertebral disc, *Tissue Eng. Part A* (2014) <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0749>.
- [166] S.-H. Moon, K. Nishida, L.G. Gilbertson, H.-M. Lee, H. Kim, R.A. Hall, P.D. Robbins, J.D. Kang, Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail, *Spine (Phila Pa 1976)* 2008 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31817e1cd7>.
- [167] K. Il Lee, S.H. Moon, H. Kim, U.H. Kwon, H.J. Kim, S.N. Park, H. Suh, H.M. Lee, H.S. Kim, H.J. Chun, I.K. Kwon, J.W. Jang, Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured nucleus pulposus cells using atelocollagen scaffold and growth factors, *Spine (Phila Pa 1976)* (2012) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31823c8603>.
- [168] H. Cho, S. Lee, S.-H. Park, J. Huang, K.A. Hasty, S.-J. Kim, Synergistic effect of combined growth factors in porcine intervertebral disc degeneration, *Connect. Tissue Res.* (2013) <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.775258>.
- [169] A.A. Hegewald, S. Zouhair, M. Endres, M. Cabrera, C. Woiciechowsky, C. Thomé, K. Kaps, Towards biological annulus repair: TGF- β 3, FGF-2 and human serum support matrix formation by human annulus fibrosus cells, *Tissue Cell* (2013) <https://doi.org/10.1016/j.tice.2012.09.011>.
- [170] C.L. Le Maitre, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, Expression of cartilage-derived morphogenetic protein in human intervertebral discs and its effect on matrix synthesis in degenerate human nucleus pulposus cells, *Arthritis Res. Ther.* 11 (2009) R137, <https://doi.org/10.1186/ar2808>.
- [171] S. Ren, Y.J. Liu, J. Ma, Z. Diao, D. Yang, X. Zhang, Y. Xi, Y. Hu, Treatment of rabbit intervertebral disc degeneration with co-transfection by adeno-associated virus-mediated SOX9 and osteogenic protein-1 double genes in vivo, *Int. J. Mol. Med.* (2013) <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1497>.
- [172] A.J.L. Walsh, D.S. Bradford, J.C. Lotz, In Vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs, *Spine (Phila Pa 1976)* (2004) <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000107231.67854.9F>.
- [173] H. Henriksson, M. Thornemo, C. Karlsson, O. Hägg, K. Junevik, A. Lindahl, H. Brisby, Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and a potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species, *Spine (Phila Pa 1976)* 34 (2009) 2278–2287, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181a95ad2>.
- [174] H. Brisby, N. Papadimitriou, C. Brantsing, P. Bergh, A. Lindahl, H. Barreto Henriksson, The Presence of Local Mesenchymal Progenitor Cells in Human Degenerated Intervertebral Discs and Possibilities to Influence These In Vitro: A Descriptive Study in Humans, *Stem Cells Dev.* 22 (2013) 804–814, <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0179>.
- [175] J.F. Blanco, I.F. Graciani, F.M. Sanchez-Guijo, S. Muntión, P. Hernandez-Campo, C. Santamaria, S. Carrancio, M.-V. Barbado, G. Cruz, S. Gutierrez-Cosío, C. Herrero, J.F. San Miguel, J.G. Briñon, M.-C. del Cañizo, Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects, *Spine (Phila Pa 1976)* 35 (2010) 2259–2265, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181cb8828>.
- [176] M.V. Risbud, A. Guttapalli, T.-T. Tsai, J.Y. Lee, K.G. Danielson, A.R. Vaccaro, T.J. Albert, Z. Gazit, D. Gazit, I.M. Shapiro, Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc, *Spine (Phila Pa 1976)* 32 (2007) 2537–2544, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318158dea6>.
- [177] C. Liu, Q. Guo, J. Li, S. Wang, Y. Wang, B. Li, H. Yang, Identification of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells, *PLoS One* 9 (2014) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108239>.
- [178] D. Sakai, Y. Nakamura, T. Nakai, T. Mishima, S. Kato, S. Grad, M. Alini, M.V. Risbud, D. Chan, K.S.E. Cheah, K. Yamamura, K. Masuda, H. Okano, K. Ando, J. Mochida, Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1264, <https://doi.org/10.1038/ncomms2226>.
- [179] S. Turner, B. Balain, B. Caterson, C. Morgan, S. Roberts, Viability, growth kinetics and stem cell markers of single and clustered cells in human intervertebral discs: implications for regenerative therapies, *Eur. Spine J.* 23 (2014) 2462–2472, <https://doi.org/10.1007/s00586-014-3500-y>.

- [180] X.-C. Li, Y. Tang, J.-H. Wu, P.-S. Yang, D.-L. Wang, D.-K. Ruan, Characteristics and potentials of stem cells derived from human degenerated nucleus pulposus: potential for regeneration of the intervertebral disc, *BMC Musculoskelet. Disord.* 18 (2017) 242, <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1567-4>.
- [181] G. Feng, X. Yang, H. Shang, I.W. Marks, F.H. Shen, A. Katz, V. Arlet, C.T. Laurencin, X. Li, Multipotential differentiation of human annulus fibrosus cells, *J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol.* 92 (2010) 675–685, <https://doi.org/10.2106/JBJS.H.01672>.
- [182] H.E. Gruber, F.E. Riley, G.L. Hoelscher, J.A. Ingram, L. Bullock, E.N. Hanley, Human annulus progenitor cells: analyses of this viable endogenous cell population, *J. Orthop. Res.* 34 (2016) 1351–1360, <https://doi.org/10.1002/jor.23319>.
- [183] S. Liu, H. Liang, S.M. Lee, Z. Li, J. Zhang, Q. Fei, Isolation and identification of stem cells from degenerated human intervertebral discs and their migration characteristics, *Acta Biochim. Biophys. Sin. Shanghai* (2017) <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw121>.
- [184] H. Wang, Y. Zhou, T.W. Chu, C.Q. Li, J. Wang, Z.F. Zhang, B. Huang, Distinguishing characteristics of stem cells derived from different anatomical regions of human degenerated intervertebral discs, *Eur. Spine J.* 25 (2016) 2691–2704, <https://doi.org/10.1007/s00586-016-4522-4>.
- [185] H. Wang, Y. Zhou, B. Huang, L.-T. Liu, M.-H. Liu, J. Wang, C.-Q. Li, Z.-F. Zhang, T.-W. Chu, C.-J. Xiong, Utilization of stem cells in alginate for nucleus pulposus tissue engineering, *Tissue Eng. Part A* 20 (2014) 908–920, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0703>.
- [186] L.T. Liu, B. Huang, C.Q. Li, Y. Zhuang, J. Wang, Y. Zhou, Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate, *PLoS One* 6 (2011) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026285>.
- [187] J. Lu, X. Shen, X. Sun, H. Yin, S. Yang, C. Lu, Y. Wang, Y. Liu, Y. Huang, Z. Yang, X. Dong, C. Wang, Q. Gui, L. Zhao, X. Sun, S. Lu, A. Mikos, J. Peng, X. Wang, Increased recruitment of endogenous stem cells and chondrogenic differentiation by a composite scaffold containing bone marrow homing peptide for cartilage regeneration, *Theranostics* 8 (2018) 5039–5058.
- [188] S. Bolini, A. Smits, C. Balbi, E. Lazzarini, P. Ameri, Triggering endogenous cardiac repair and regeneration via extracellular vesicle-mediated communication, *Front. Physiol.* 9 (2018) 1497.
- [189] C.H. Lee, F.Y. Lee, S. Tarafder, K. Kao, Y. Jun, G. Yang, J.J. Mao, Harnessing endogenous stem/progenitor cells for tendon regeneration, *J. Clin. Invest.* (2015) <https://doi.org/10.1172/JCI81589>.
- [190] K. Ma, S. Chen, Z. Li, X. Deng, D. Huang, L. Xiong, Z. Shao, Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration, *Osteoarthritis Cartil.* (2018) <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.08.021>.
- [191] H.B. Henriksson, E. Svala, E. Skoldbrand, A. Lindahl, H. Brisby, Support of concept that migrating progenitor cells from stem cell niches contribute to normal regeneration of the adult mammal intervertebral disc, *Spine (Phila Pa 1976)* 37 (2012) 722–732, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318231c217>.
- [192] H.B. Henriksson, N. Papadimitriou, S. Tschernitz, E. Svala, E. Skoldbrand, S. Windahl, K. Junevik, H. Brisby, Indications of that migration of stem cells is influenced by the extra cellular matrix architecture in the mammalian intervertebral disk region, *Tissue Cell* 47 (2015) 439–455, <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.08.001>.
- [193] G. Pattappa, M. Peroglio, D. Sakai, J. Mochida, L.M. Benneker, M. Alini, S. Grad, CCL5/rantes is a key chemoattractant released by degenerative intervertebral discs in organ culture, *Eur. Cells Mater.* (2014) <https://doi.org/10.22203/eCM.v027a10>.
- [194] C.K. Kepler, D.Z. Markova, F. Dibra, S. Yadla, A.R. Vaccaro, M.V. Risbud, T.J. Albert, D.G. Anderson, Expression and relationship of proinflammatory chemokine RANTES/CCL5 and cytokine IL-1 β in painful human intervertebral discs, *Spine (Phila Pa 1976)* 2013 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318285ae08>.
- [195] C.L. Pereira, R.M. Gonçalves, M. Peroglio, G. Pattappa, M. D'Este, D. Eglin, M.A. Barbosa, M. Alini, S. Grad, The effect of hyaluronan-based delivery of stromal cell-derived factor-1 on the recruitment of MSCs in degenerating intervertebral discs, *Biomaterials* 35 (2014) 8144–8153, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.017>.
- [196] C.L. Pereira, G.Q. Teixeira, C. Ribeiro-Machado, J. Caldeira, M. Costa, F. Figueiredo, R. Fernandes, P. Aguiar, S. Grad, M.A. Barbosa, R.M. Gonçalves, Mesenchymal stem/stromal cells seeded on cartilaginous endplates promote intervertebral disc regeneration through extracellular matrix remodeling, *Sci. Rep.* 6 (2016) 33836, <https://doi.org/10.1038/srep33836>.
- [197] G. Vadalà, F. Russo, L. Ambrosio, M. Loppini, V. Denaro, Stem cells sources for intervertebral disc regeneration, *World J. Stem Cells.* (2016) <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i5.185>.
- [198] S.B.G. Blanquer, D.W. Grijpma, A.A. Poort, Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 84 (2015) 172–187, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.024>.
- [199] D. Sakai, G.B.J. Andersson, Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions, *Nat. Rev. Rheumatol.* (2015) <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.13>.
- [200] C. Hohaus, T.M. Ganey, Y. Minkus, H.J. Meisel, Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease, *Eur. Spine J.* (2008) <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0750-6>.
- [201] H.J. Meisel, V. Siodla, T. Ganey, Y. Minkus, W.C. Hutton, O.J. Alasevic, Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation. A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc, *Biomol. Eng.* 24 (2007) 5–21, <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.07.002>.
- [202] H.J. Meisel, T. Ganey, W.C. Hutton, J. Libera, Y. Minkus, O. Alasevic, Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome, *Eur. Spine J.* (2006) <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0169-x>.
- [203] G. Paesold, A.G. Nerlich, N. Boos, Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings, *Eur. Spine J.* (2007) <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0220-y>.
- [204] A.A. Hegewald, M. Endres, A. Abbushi, M. Cabraja, C. Woiciechowsky, K. Schmieder, C. Kaps, C. Thomé, Adequacy of herniated disc tissue as a cell source for nucleus pulposus regeneration, *J. Neurosurg. Spine.* (2011) <https://doi.org/10.3171/2010.10.SPINE.10223>.
- [205] T. Watanabe, D. Sakai, Y. Yamamoto, T. Iwashina, K. Serigano, F. Tamura, J. Mochida, Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a co-culture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells, *J. Orthop. Res.* (2010) <https://doi.org/10.1002/jor.21036>.
- [206] Y. Yamamoto, J. Mochida, D. Sakai, T. Nakai, K. Nishimura, H. Kawada, T. Hotta, Up-regulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system, *Spine (Phila Pa 1976)* 2004 (1976) <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000131416.90906.20>.
- [207] M. Okuma, J. Mochida, K. Nishimura, K. Sakabe, K. Seiki, Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study, *J. Orthop. Res.* (2000) <https://doi.org/10.1002/jor.1100180620>.
- [208] S.M. Richardson, N. Hughes, J.A. Hunt, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels, *Biomaterials* 29 (2008) 85–93, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.018>.
- [209] H.B. Henriksson, T. Svanvik, M. Jonsson, M. Hagman, M. Horn, A. Lindahl, H. Brisby, Transplantation of human mesenchymal stem cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model, *Spine (Phila Pa 1976)* 34 (2009) (1976) 141–148, <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31818f8c20>.
- [210] K. Serigano, D. Sakai, A. Hiayama, F. Tamura, M. Tanaka, J. Mochida, Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model, *J. Orthop. Res.* (2010) <https://doi.org/10.1002/jor.21147>.
- [211] M. Gorensek, C. Jakšimović, N. Kregar-Velikonja, M. Gorensek, M. Knezevic, M. Jeras, V. Pavlovic, A. Cör, Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9 (2004) 363–378 (doi: papers3://publication/uuid/877D2C6B-3DBF-45C0-9572-01EA0CA8A122).
- [212] F.L. Acosta, L. Metz, H.D. Adkisson, J. Liu, E. Caruthers-Liebenberg, C. Milliman, M. Maloney, J.C. Lotz, Porcine intervertebral disc repair using allogeneic juvenile articular chondrocytes or mesenchymal stem cells, *Tissue Eng. Part A* (2011) <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0229>.
- [213] M.B. Murphy, K. Moncivais, A.I. Caplan, Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine, *Exp. Mol. Med.* (2013) <https://doi.org/10.1038/emmm.2013.94>.
- [214] J.V. Stoyanov, B. Gantenbein-Ritter, A. Bertolo, N. Aebli, M. Baur, M. Alini, S. Grad, Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells, *Eur. Cells Mater.* 21 (2011) 533–547, <https://doi.org/10.22203/eCM.v021a40>.
- [215] K. Xia, J. Zhu, J. Hua, Z. Gong, C. Yu, X. Zhou, J. Wang, X. Huang, W. Yu, L. Li, J. Gao, Q. Chen, F. Li, C. Liang, Intradiscal injection of induced pluripotent stem cell-derived nucleus pulposus-like cell-seeded polymeric microspheres promotes rat disc regeneration, *Stem Cells Int.* (2019) <https://doi.org/10.1155/2019/6806540>.
- [216] M.V. Risbud, T.J. Albert, A. Guttapalli, E.J. Vresilovic, A.S. Hillbrand, A.R. Vaccaro, I.M. Shapiro, Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy, *Spine (Phila Pa 1976)* 29 (2004) 2627–2632, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146462.92171.7f>.
- [217] C. Merceron, S. Portron, C. Vignes-Colombeix, E. Rederstorff, M. Masson, J. Lesoeur, S. Sourice, C. Sinquin, S. Collic-Jouault, P. Weiss, C. Vinatier, J. Guicheux, Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine, *Stem Cells* (2012) <https://doi.org/10.1002/stem.1686>.
- [218] S. Portron, C. Merceron, O. Gauthier, J. Lesoeur, S. Sourice, M. Masson, B.H. Fellah, O. Geffroy, E. Lallemand, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier, 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* (2013) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062368>.
- [219] B. Gantenbein-Ritter, L.M. Benneker, M. Alini, S. Grad, Differential response of human bone marrow stromal cells to either TGF- β (1) or rhGDF-5, *Eur. Spine J.* 20 (2011) 962–971, <https://doi.org/10.1007/s00586-010-1619-z>.
- [220] J.V. Stoyanov, B. Gantenbein-Ritter, A. Bertolo, N. Aebli, M. Baur, M. Alini, S. Grad, Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells, *Eur. Cells Mater.* (2011) <https://doi.org/10.22203/eCM.v021a40>.
- [221] L.E. Clarke, J.C. McConnell, M.J. Sherratt, B. Derby, S.M. Richardson, J.A. Hoyland, Growth differentiation factor 6 and transforming growth factor- β differentially mediate mesenchymal stem cell differentiation, composition, and micromechanical properties of nucleus pulposus constructs, *Arthritis Res. Ther.* 16 (2014) R67, <https://doi.org/10.1186/ar4505>.
- [222] S. Sobajima, G. Vadalà, A. Shimer, J.S. Kim, L.G. Gilbertson, J.D. Kang, Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration, *Spine J.* (2008) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2007.09.011>.
- [223] G. Vadalà, S. Sobajima, J.Y. Lee, J. Huard, V. Denaro, J.D. Kang, L.G. Gilbertson, In vitro interaction between muscle-derived stem cells and nucleus pulposus cells, *Spine J.* (2008) <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2007.07.394>.
- [224] S.M. Richardson, R.V. Walker, S. Parker, N.P. Rhodes, J.A. Hunt, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation, *Stem Cells* 24 (2006) 707–716, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0205>.

- [225] C. Le Visage, S.W. Kim, K. Taten, A.N. Sieber, J.P. Kostuik, K.W. Leong, Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: Changes in extracellular matrix biosynthesis, *Spine (Phila Pa 1976)* (2006) <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000231442.05245.87>.
- [226] Z. Han, J. Wang, L. Gao, Q. Wang, J. Wu, Aberrantly expressed messenger RNAs and long noncoding RNAs in degenerative nucleus pulposus cells co-cultured with adipose-derived mesenchymal stem cells, *Arthritis Res. Ther.* (2018) <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1677-x>.
- [227] M.F. Pittenger, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science (80-.)* (1999) <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- [228] G. Vadalà, R.K. Studer, G. Sowa, F. Spiezia, C. Iucu, V. Denaro, L.G. Gilbertson, J.D. Kang, Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion, *Spine (Phila Pa 1976)* (2008) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31816b4619>.
- [229] Z.F. Lu, B. Zandieh Doulabi, P.I. Wuisman, R.A. Bank, M.N. Helder, Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: Configuration effect, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007) <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.002>.
- [230] A. Uccelli, L. Moretta, V. Pistoia, Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells, *Eur. J. Immunol.* (2006) <https://doi.org/10.1002/eji.200636416>.
- [231] F. Gao, S.M. Chiu, D.A.L. Motan, Z. Zhang, L. Chen, H.-L. Ji, H.-F. Tse, Q.-L. Fu, Q. Lian, Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects, *Cell Death Dis.* (2016) <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>.
- [232] G. Feng, X. Zhao, H. Liu, H. Zhang, X. Chen, R. Shi, X. Liu, X. Zhao, W. Zhang, B. Wang, Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration, *J. Neurosurg. Spine.* (2011) <https://doi.org/10.3171/2010.11.SPINE10285>.
- [233] H.B. Henriksson, M. Hagman, M. Horn, A. Lindahl, H. Brisby, Investigation of different cell types and gel carriers for cell-based intervertebral disc therapy, in vitro and in vivo studies, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2012) <https://doi.org/10.1002/term.480>.
- [234] J.D. Prologo, A. Pirasteh, N. Tenley, L. Yuan, D. Corn, D. Hart, Z. Love, H.M. Lazarus, Z. Lee, Percutaneous image-guided delivery for the transplantation of mesenchymal stem cells in the setting of degenerated intervertebral discs, *J. Vasc. Interv. Radiol.* (2012) <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2012.04.032>.
- [235] Y.-G. Zhang, X. Guo, P. Xu, L.-L. Kang, J. Li, Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans, *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2005) <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000146534.31120.cf>.
- [236] C.-J. Ma, X. Liu, L. Che, Z.-H. Liu, D. Samartzis, H.-Q. Wang, Stem cell therapies for intervertebral disc degeneration: immune privilege reinforcement by Fas/FasL regulating machinery, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* (2015) <https://doi.org/10.2174/1574888X10666150416114027>.
- [237] C. Elabd, C.J. Centeno, J.R. Schultz, G. Lutz, T. Ichim, F.J. Silva, Intra-discal injection of autologous, hypoxic cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in five patients with chronic lower back pain: A long-term safety and feasibility study, *J. Transl. Med.* (2016) <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1015-5>.
- [238] T. Yoshikawa, Y. Ueda, K. Miyazaki, M. Koizumi, Y. Takakura, Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: A report of two case studies, *Spine (Phila Pa 1976)* (2010) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318182dcf4>.
- [239] L. Orozco, R. Soler, C. Morera, M. Alberca, A. Sánchez, J. García-Sancho, Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study, *Transplantation* 92 (2011) 822–828, <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182298a15>.
- [240] Y. Sun, V. Leung, K. Cheung, Clinical trials of intervertebral disc regeneration: current status and future developments, *Int. Orthop.* 43 (4) (2018) 1003–1010.
- [241] K. Pettine, R. Suzuki, T. Sand, M. Murphy, Treatment of discogenic back pain with autologous bone marrow concentrate injection with minimum two year follow-up, *Int. Orthop.* (2016) <https://doi.org/10.1007/s00264-015-2886-4>.
- [242] K.A. Pettine, R.K. Suzuki, T.T. Sand, M.B. Murphy, Autologous bone marrow concentrate intradiscal injection for the treatment of degenerative disc disease with three-year follow-up, *Int. Orthop.* (2017) <https://doi.org/10.1007/s00264-017-3560-9>.
- [243] S.Z. Wang, J.Y. Jin, Y.D. Guo, L.Y. Ma, Q. Chang, X.G. Peng, F.F. Guo, H.X. Zhang, X.F. Hu, C. Wang, Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma-containing bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a preliminary investigation, *Mol. Med. Rep.* (2016) <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4983>.
- [244] M. Tkach, C. Thery, Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go, *Cell* (2016) <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>.
- [245] J. Malda, J. Boere, C.H.A. Van De Lest, P.R. Van Weeren, M.H.M. Wauben, Extracellular vesicles - new tool for joint repair and regeneration, *Nat. Rev. Rheumatol.* (2016) <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.170>.
- [246] A.M. Silva, J.H. Teixeira, M.I. Almeida, R.M. Gonçalves, M.A. Barbosa, S.G. Santos, Extracellular Vesicles: immunomodulatory messengers in the context of tissue repair/regeneration, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2017) <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.017>.
- [247] B. Zhang, M. Wang, A. Gong, X. Zhang, X. Wu, Y. Zhu, H. Shi, L. Wu, W. Zhu, H. Qian, W. Xu, HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing, *Stem Cells* (2015) <https://doi.org/10.1002/stem.1771>.
- [248] M. Tofiño-Vian, M.I. Guillén, M.D. Pérez Del Caz, A. Silvestre, M.J. Alcaraz, Microvesicles from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new protective strategy in osteoarthritic chondrocytes, *Cell. Physiol. Biochem.* (2018) <https://doi.org/10.1159/000489739>.
- [249] W.S. Toh, R.C. Lai, J.H.P. Hui, S.K. Lim, MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: implications for osteoarthritis treatment, *Semin. Cell Dev. Biol.* (2017) <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.11.008>.
- [250] K. Lu, H. Yin Li, K. Yang, J. Long Wu, X. Wei Cai, Y. Zhou, C. Qing Li, Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells, *Stem Cell Res Ther* (2017) <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0563-9>.
- [251] F. Bach, S. Libregts, L. Creemers, B. Meij, K. Ito, M. Wauben, M. Tryfonidou, Notochordal-cell derived extracellular vesicles exert regenerative effects on canine and human nucleus pulposus cells, *Oncotarget*. (2017) <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21483>.
- [252] A.I. Chou, S.O. Akintoye, S.B. Nicoll, Photo-crosslinked alginate hydrogels support enhanced matrix accumulation by nucleus pulposus cells in vivo, *Osteoarthr. Cartil.* 17 (10) (2009) 1377–1384, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.04.012>.
- [253] M.S. Gupta, E.S. Cooper, S.B. Nicoll, Transforming growth factor-beta 3 stimulates cartilage matrix elaboration by human marrow-derived stromal cells encapsulated in photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels: potential for nucleus pulposus replacement, *Tissue Eng. Part A* 17 (23–24) (2011) 2903–2910, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0152>.
- [254] E.M. Schutgens, M.A. Tryfonidou, T.H. Smit, F. Cumhur Öner, A. Krouwels, K. Ito, L.B. Creemers, Biomaterials for intervertebral disc regeneration: past performance and possible future strategies, *Eur. Cells Mater.* (2015) <https://doi.org/10.22203/eCM.v030a15>.
- [255] A. Di Martino, M. Sittinger, M.V. Risbud, Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, *Biomaterials.* (2005) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.016>.
- [256] T. Dai, M. Tanaka, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* (2011) <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>.
- [257] B. Chen, W. Dai, B. He, H. Zhang, X. Wang, Y. Wang, Q. Zhang, Current multistage drug delivery systems based on the tumor microenvironment, *Theranostics*. (2017) <https://doi.org/10.7150/tno.16684>.
- [258] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release, *Chem. Rev.* (2016) <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.
- [259] E. Mauri, S. Papa, M. Masi, P. Veglianesi, F. Rossi, Novel functionalization strategies to improve drug delivery from polymers, *Expert Opin. Drug Deliv.* (2017) <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1285280>.
- [260] V. Delplace, J. Obermeyer, M.S. Shoichet, Local affinity release, *ACS Nano* (2016) <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04308>.
- [261] V.E. Santo, M.E. Gomes, J.F. Mano, R.L. Reis, Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering—Part II: challenges on the evolution from single to multiple bioactive factor delivery, *Tissue Eng. Part B Rev.* (2013) [https://doi.org/10.1016/0167-6911\(87\)90067-3](https://doi.org/10.1016/0167-6911(87)90067-3).
- [262] V.E. Santo, M. Gomes, J. Mano, R.L. Reis, Controlled release strategies for bone, cartilage and osteochondral engineering - Part I: recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems, *Tissue Eng. Part B* (2012) <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0138>.
- [263] J. Lam, S. Lu, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Strategies for controlled delivery of biologics for cartilage repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2015) <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.006>.
- [264] M. Mehta, K. Schmidt-Bleek, G.N. Duda, D.J. Mooney, Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012) <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.006>.
- [265] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.* (2016) <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.
- [266] K. Flégleau, R. Pace, H. Gautier, G. Rethore, J. Guicheux, C. Le Visage, P. Weiss, Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 247 (2017) 589–609, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.012>.
- [267] S. Kim, Y. Kang, C.A. Krueger, M. Sen, J.B. Holcomb, D. Chen, J.C. Wenke, Y. Yang, Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation, *Acta Biomater.* (2012) <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.009>.
- [268] E.A. Bayer, J. Jordan, A. Roy, R. Gottardi, M.V. Fedorchak, P.N. Kumta, S.R. Little, Programmed platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 delivery from a hybrid calcium phosphate/alginate scaffold, *Tissue Eng. Part A* (2017) <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0027>.
- [269] N. Joshi, J. Yan, S. Levy, S. Bhagchandani, K.V. Slaughter, N.E. Sherman, J. Amirault, Y. Wang, L. Riegel, X. He, T.S. Rui, M. Valic, P.K. Vemula, O.R. Miranda, O. Levy, E.M. Gravalles, A.O. Aliprantis, J. Ermann, J.M. Karp, Towards an arthritis flare-responsive drug delivery system, *Nat. Commun.* (2018) <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03691-1>.
- [270] D. Beall, T.R. Deer, J. Wilsey, A. Walsh, J.H. Block, W. McKay, J.M. Zanella, B.P. Parsons, C.C. Carson, Tissue distribution of clonidine following intraforaminal implantation of biodegradable pellets: potential alternative to epidural steroid for radiculopathy, *J. Vasc. Interv. Radiol.* (2013) <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2013.01.271>.
- [271] J.E. Frith, D.J. Menzies, A.R. Cameron, P. Ghosh, D.L. Whitehead, S. Gronthos, A.C.W. Zannettino, J.J. Cooper-White, Effects of bound versus soluble pentosan polysulphate in PEG/HA-based hydrogels tailored for intervertebral disc regeneration, *Biomaterials.* (2014) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.056>.
- [272] Y. Zhu, J. Tan, H. Zhu, G. Lin, F. Yin, L. Wang, K. Song, Y. Wang, G. Zhou, W. Yi, Development of kartogenin-conjugated chitosan-hyaluronic acid hydrogel for nucleus pulposus regeneration, *Biomater. Sci.* (2017) <https://doi.org/10.1039/c7bm00001d>.

- [273] M.S. Gupta, S.B. Nicoll, Duration of TGF- β 3 exposure impacts the chondrogenic maturation of human MSCs in photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels, *Ann. Biomed. Eng.* (2015) <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1179-1>.
- [274] J.W. Lee, T.H. Lim, J.B. Park, Intradiscal drug delivery system for the treatment of low back pain, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* (2010) <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32377>.
- [275] E. Wenk, A.J. Meinel, S. Wildy, H.P. Merkle, L. Meinel, Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering, *Biomaterials*. (2009) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.073>.
- [276] V.P. Mantripragada, A.C. Jayasuriya, IGF-1 release kinetics from chitosan microparticles fabricated using environmentally benign conditions, *Mater. Sci. Eng. C* (2014) <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.068>.
- [277] N. Henry, J. Clouet, A. Fragale, L. Griveau, C. Chédeville, J. Véziers, P. Weiss, J. Le Bideau, J. Guicheux, C. Le Visage, Pullulan microbeads/Si-HPMC hydrogel injectable system for the sustained delivery of GDF-5 and TGF- β 1: new insight into intervertebral disc regenerative medicine, *Drug Deliv.* 24 (2017) 999–1010, <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1340362>.
- [278] N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, P. Weiss, E. Gautron, D. Renard, T. Cordonnier, F. Boury, B. Humbert, H. Terrisse, J. Guicheux, Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of the protein-silica interactions, *J. Mater. Chem. B* (2017) <https://doi.org/10.1039/c7tb00332c>.
- [279] M. Nagae, T. Ikeda, Y. Mikami, H. Hase, H. Ozawa, K.-I. Matsuda, H. Sakamoto, Y. Tabata, M. Kawata, T. Kubo, Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres, *Tissue Eng.* (2007) <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0042>.
- [280] K. Sawamura, T. Ikeda, M. Nagae, S. Okamoto, Y. Mikami, H. Hase, K. Ikoma, T. Yamada, H. Sakamoto, K. Matsuda, Y. Tabata, M. Kawata, T. Kubo, Characterization of *in vivo* effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres on degenerated intervertebral discs, *Tissue Eng. Part A*. (2009) <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0697>.
- [281] G. Feng, Z. Zha, Y. Huang, J. Li, Y. Wang, W. Ke, H. Chen, L. Liu, Y. Song, Z. Ge, Sustained and bioresponsive two-stage delivery of therapeutic miRNA via polyplex Micelle-loaded injectable hydrogels for inhibition of intervertebral disc fibrosis, *Adv. Healthc. Mater.* (2018) 1–14.
- [282] J. Schol, D. Sakai, Cell therapy for intervertebral disc herniation and degenerative disc disease: clinical trials, *Int. Orthop.* 43 (4) (2018) 1011–1025.
- [283] M.N. Collins, C. Birkinshaw, Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - a review, *Carbohydr. Polym.* (2013) <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
- [284] I.L. Kim, R.L. Mauck, J.A. Burdick, Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid, *Biomaterials*. (2011) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.073>.
- [285] H. Kumar, D.H. Ha, E.J. Lee, J.H. Park, J.H. Shim, T.K. Ahn, K.T. Kim, A.E. Ropper, S. Sohn, C.H. Kim, D.K. Thakor, S.H. Lee, I.B. Han, Safety and tolerability of intradiscal implantation of combined autologous adipose-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid in patients with chronic discogenic low back pain: 1-year follow-up of a phase I study, *Stem Cell Res Ther* (2017) <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0710-3>.
- [286] E.C. Collin, S. Grad, D.I. Zeugolis, C.S. Vinatier, J.R. Clouet, J.J. Guicheux, P. Weiss, M. Alini, A.S. Pandit, An injectable vehicle for nucleus pulposus cell-based therapy, *Biomaterials*. 32 (2011) 2862–2870, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.018>.
- [287] Y.C. Chen, W.Y. Su, S.H. Yang, A. Gefen, F.H. Lin, In situ forming hydrogels composed of oxidized high molecular weight hyaluronic acid and gelatin for nucleus pulposus regeneration, *Acta Biomater.* (2013) <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.039>.
- [288] M. Peroglio, D. Eglin, L.M. Benneker, M. Alini, S. Grad, Thermoreversible hyaluronan-based hydrogel supports *in vitro* and *ex vivo* disc-like differentiation of human mesenchymal stem cells, *Spine J.* 13 (2013) 1627–1639, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.05.029>.
- [289] I.L. Moss, L. Gordon, K.A. Woodhouse, C.M. Whyne, A.J.M. Yee, A novel thiol-modified hyaluronan and elastin-like polypeptide composite material for tissue engineering of the nucleus pulposus of the intervertebral disc, *Spine (Phila Pa 1976)* 2011 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181e7b705>.
- [290] K. Chiba, G.B.J. Andersson, K. Masuda, E.J.M.A. Thonar, Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate, *Spine (Phila Pa 1976)* 1997 (1976) <https://doi.org/10.1097/00007632-199712150-00011>.
- [291] A.E. Baer, J.Y. Wang, V.B. Kraus, L.A. Setton, Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures, *J. Orthop. Res.* (2001) [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(00\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(00)00003-6).
- [292] H. Mizuno, A.K. Roy, C.A. Vacanti, K. Kojima, M. Ueda, L.J. Bonassar, Tissue-engineered composites of anulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement, *Spine (Phila Pa 1976)* (2004) <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000128264.46510.27>.
- [293] D. Bosnakovski, M. Mizuno, G. Kim, S. Takagi, M. Okumura, T. Fujinaga, Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis, *Biotechnol. Bioeng.* (2006) <https://doi.org/10.1002/bit.20828>.
- [294] P. Roughley, C. Hoemann, E. Desrosiers, F. Mwale, J. Antoniou, M. Alini, The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation, *Biomaterials*. (2006) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.037>.
- [295] F. Mwale, M. Jordanova, C.N. Demers, T. Steffen, P. Roughley, J. Antoniou, Biological evaluation of chitosan salts cross-linked to genipin as a cell scaffold for disk tissue engineering, *Tissue Eng.* (2005) <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.130>.
- [296] S.M. Richardson, N. Hughes, J.A. Hunt, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels, *Biomaterials*. (2008) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.018>.
- [297] W. Tong, Z. Lu, L. Qin, R.L. Mauck, H.E. Smith, L.J. Smith, N.R. Malhotra, M.F. Heyworth, F. Caldera, M. Enomoto-Iwamoto, Y. Zhang, Cell therapy for the degenerating intervertebral disc, *Transl. Res.* (2017) <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.11.008>.
- [298] Y. Gan, S. Li, P. Li, Y. Xu, L. Wang, C. Zhao, B. Ouyang, B. Tu, C. Zhang, L. Luo, X. Luo, X. Mo, Q. Zhou, A. Controlled Release, Codelivery system of MSCs encapsulated in dextran/gelatin hydrogel with TGF- β 3-loaded nanoparticles for nucleus pulposus regeneration, *Stem Cells Int.* (2016) <https://doi.org/10.1155/2016/9042019>.
- [299] C.Z. Liang, H. Li, Y.Q. Tao, X.P. Zhou, Z.R. Yang, Y.X. Xiao, F.C. Li, B. Han, Q.X. Chen, Dual delivery for stem cell differentiation using dexamethasone and bFGF in/on polymeric microspheres as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2012) <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4563-0>.
- [300] C.Z. Liang, H. Li, Y.Q. Tao, L.H. Peng, J.Q. Gao, J. Wu, F.C. Li, J.M. Hua, Q.X. Chen, Dual release of dexamethasone and TGF- β 3 from polymeric microspheres for stem cell matrix accumulation in a rat disc degeneration model, *Acta Biomater.* (2013) <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.019>.
- [301] R.M. Gonçalves, J.C. Antunes, M.A. Barbosa, Mesenchymal stem cell recruitment by stromal derived factor-1-delivery systems based on chitosan/poly(γ -glutamic acid) polyelectrolyte complexes, *Eur. Cells. Mater.* (2012) <https://doi.org/10.22203/eCM.v023a19>.
- [302] H. Zhang, S. Yu, X. Zhao, Z. Mao, C. Gao, Stromal cell-derived factor-1 α -encapsulated albumin/heparin nanoparticles for induced stem cell migration and intervertebral disc regeneration *in vivo*, *Acta Biomater.* (2018) <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.032>.
- [303] I. Freeman, S. Cohen, The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization, *Biomaterials*. (2009) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.057>.
- [304] M. Wei, Y. Gao, X. Li, M.J. Serpe, Stimuli-responsive polymers and their applications, *Polym. Chem.* (2017) <https://doi.org/10.1039/c6py01585a>.
- [305] F. Seidi, R. Jenjob, D. Crespy, Designing smart polymer conjugates for controlled release of payloads, *Chem. Rev.* (2018) <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00006>.
- [306] W. Xu, P.A. Ledin, Z. Iatridi, C. Tsitsilianis, V. Tsukruk, Multicompartmental microcapsules with orthogonal programmable two-way sequencing of hydrophobic and hydrophilic cargo release, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2016) <https://doi.org/10.1002/anie.201600383>.
- [307] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.* (2013) <https://doi.org/10.1038/nmat3776>.
- [308] S.J. Bryant, F.J. Vernerey, Programmable hydrogels for cell encapsulation and neo-tissue growth to enable personalized tissue engineering, *Adv. Healthc. Mater.* (2018) <https://doi.org/10.1002/adhm.201700605>.
- [309] J. Hoque, N. Sangaj, S. Varghese, Stimuli-responsive supramolecular hydrogels and their applications in regenerative medicine, *Macromol. Biosci.* 19 (1) (2019) e1800259.
- [310] K.R. Mulligan, C.E. Ferland, R. Gawri, A. Borthakur, L. Haglund, J.A. Ouellet, Axial T1 ρ MRI as a diagnostic imaging modality to quantify proteoglycan concentration in degenerative disc disease, *Eur. Spine J.* (2014) <https://doi.org/10.1007/s00586-014-3582-6>.
- [311] G. Vadalà, F. Russo, S. Battisti, L. Stellato, F. Martina, R. Del Vescovo, A. Giacalone, A. Borthakur, B.B. Zobel, V. Denaro, Early intervertebral disc degeneration changes in asymptomatic weightlifters assessed by T1 ρ -magnetic resonance imaging, *Spine (Phila Pa 1976)* (2014) <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000000554>.
- [312] C.P.L. Paul, T.H. Smit, M. de Graaf, R.M. Holeywijn, A. Bisschop, P.M. van de Ven, M.G. Mullender, N. Helder, G.J. Strijkers, Quantitative MRI in early intervertebral disc degeneration: T1 ρ correlates better than T2 and ADC with biomechanics, histology and matrix content, *PLoS One* (2018) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191442>.
- [313] T.W. Evashwick-Rogier, A. Lai, H. Watanabe, J.M. Salandra, B.A. Winkelstein, S.K. Cho, A.C. Hecht, J.C. Iatridis, Inhibiting tumor necrosis factor- α at time of induced intervertebral disc injury limits long-term pain and degeneration in a rat model, *JOR Spine.* 1 (2018).
- [314] S. Ohtori, M. Miyagi, Y. Eguchi, G. Inoue, S. Orita, N. Ochiai, S. Kishida, K. Kuniyoshi, J. Nakamura, Y. Aoki, T. Ishikawa, G. Arai, H. Kamoda, M. Suzuki, M. Takaso, T. Furuya, G. Kubota, Y. Sakuma, Y. Oikawa, T. Toyone, K. Takahashi, Efficacy of epidural administration of anti-interleukin-6 receptor antibody onto spinal nerve for treatment of sciatica, *Eur. Spine J.* (2012) <https://doi.org/10.1007/s00586-012-2183-5>.
- [315] T. Sainoh, S. Orita, M. Miyagi, G. Inoue, K. Yamauchi, M. Suzuki, Y. Sakuma, G. Kubota, Y. Oikawa, K. Inage, J. Sato, Y. Nakata, Y. Aoki, K. Takahashi, S. Ohtori, Single intradiscal injection of the interleukin-6 receptor antibody tocilizumab provides short-term relief of discogenic low back pain: prospective comparative cohort study, *J. Orthop. Sci.* (2016) <https://doi.org/10.1016/j.jos.2015.10.005>.
- [316] R.K. Studer, A.M. Aboka, L.G. Gilbertson, H. Georgescu, G. Sowa, N. Vo, J.D. Kang, p38 MAPK inhibition in nucleus pulposus cells: A potential target for treating intervertebral disc degeneration, *Spine (Phila Pa 1976)* 2007 (1976) <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31815b757a>.
- [317] J.S. Kim, M.B. Ellman, D. Yan, H.S. An, R. Kc, X. Li, D. Chen, G. Xiao, G. Cs-Szabo, D.W. Hoskin, D.D. Buechter, A.J. Van Wijnen, H.J. Im, Lactoferricin mediates anti-inflammatory and anti-catabolic effects via inhibition of IL-1 and LPS activity in the intervertebral disc, *J. Cell. Physiol.* (2013) <https://doi.org/10.1002/jcp.24350>.
- [318] W. Fang, X. Zhou, J. Wang, L. Xu, L. Zhou, W. Yu, Y. Tao, J. Zhu, B. Hu, C. Liang, F. Li, J. Hua, Q. Chen, Wogonin mitigates intervertebral disc degeneration through the

- Nrf2/ARE and MAPK signaling pathways, *Int. Immunopharmacol.* (2018) <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.024>.
- [319] *ClinicalTrials.gov*, NCT00813813, (2016).
- [320] *ClinicalTrials.gov*, NCT01182337, (2016).
- [321] *ClinicalTrials.gov*, NCT01124006, (2016).
- [322] *ClinicalTrials.gov*, NCT01158924, (2016).
- [323] C.M. Tran, Z.R. Schoepflin, D.Z. Markova, C.K. Kepler, D.G. Anderson, I.M. Shapiro, M.V. Risbud, CCN2 suppresses catabolic effects of interleukin-1 β through α 5 β 1 and α V β 3 integrins in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 7374–7387, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.526111>.
- [324] Liu Jianwei, Jiang Tongmeng, He Mingwei, Fang Depeng, Shen Chong, He Molin Le Yiguan, Zhao Jinmin, Zheng Li, Andrographolide prevents human nucleus pulposus cells against degeneration by inhibiting the NF- κ B pathway, *J. Cell. Physiol.* 234 (6) (2018) 9631–9639.
- [325] A. Matta, M.Z. Karim, D.E. Isenman, W.M. Erwin, Molecular therapy for degenerative disc disease: clues from secretome analysis of the notochordal cell-rich nucleus pulposus, *Sci. Rep.* (2017) <https://doi.org/10.1038/srep45623>.
- [326] C.L. Le Maitre, P. Baird, A.J. Freemont, J.A. Hoyland, An in vitro study investigating the survival and phenotype of mesenchymal stem cells following injection into nucleus pulposus tissue, *Arthritis Res. Ther.* 11 (2009) R20, <https://doi.org/10.1186/ar2611>.
- [327] J. Yan, S. Yang, H. Sun, D. Guo, B. Wu, F. Ji, D. Zhou, Effects of releasing recombinant human growth and differentiation factor-5 from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for repair of the rat degenerated intervertebral disc, *J. Biomater. Appl.* (2014) <https://doi.org/10.1177/0885328213515034>.
- [328] N. Suffee, C. Le Visage, H. Hlawaty, R. Aid-Launais, V. Vanneaux, J. Larghero, O. Haddad, O. Oudar, N. Charnaux, A. Sutton, Pro-Angiogenic effect of RANTES-loaded polysaccharide-based microparticles for a mouse ischemia therapy, *Sci. Rep.* (2017) <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13444-7>.
- [329] S.M. Sinclair, J. Bhattacharyya, J.R. McDaniel, D.M. Gooden, R. Gopalaswamy, A. Chilkoti, L.A. Setton, A genetically engineered thermally responsive sustained release curcumin depot to treat neuroinflammation, *J. Control. Release* (2013) <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.032>.
- [330] Y.H. Cheng, S.H. Yang, F.H. Lin, Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogel as a controlled release system of ferulic acid for nucleus pulposus regeneration, *Biomaterials*. (2011) <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.065>.
- [331] C. Pereira, G. Quelhas Teixeira, J. Rita Ferreira, M. D'Este, D. Eglín, M. Alini, S. Grad, M.A. Barbosa, R.M. Gonçalves, Stromal cell derived factor-1-mediated migration of mesenchymal stem cells enhances collagen type II expression in intervertebral disc, *Tissue Eng. Part A*. (2018) <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0131>.

F. Objectifs de la thèse

L'ensemble des données et l'article de revue présentés ci-dessus a permis de mettre en évidence la nécessité de développer une stratégie robuste et complète de régénérescence discale. La prise en compte des différents éléments impliqués dans les processus de dégénérescence discale, ainsi que le stade de progression de celle-ci nous semblent essentielle à l'élaboration d'une telle stratégie. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à mettre en place une stratégie de réparation endogène du DIV par développement de systèmes à libération séquentielle de facteurs biologiques. L'approche globale est d'utiliser les cellules souches/progénitrices discales en tant que cellules réparatrices afin de stimuler la réparation endogène du NP dégénéré. Cette stratégie se déroulerait en deux étapes successives essentielles. La première consiste à recruter et mobiliser les cellules souches/progénitrices discales des plateaux cartilagineux vers le NP dégénéré. La deuxième étape permettrait de stimuler l'anabolisme de ces cellules recrutées et induire la synthèse d'une matrice extracellulaire saine de type nucléopulpogénique. Pour ce faire quatre facteurs biologiques ont été étudiés dans cette thèse : deux facteurs chimioattractants, le CXCL12 et le CCL5, et deux facteurs de croissance, le TGF- β 1 et le GDF-5. Le recours à des cellules endogènes et non pas exogènes, permettent alors de s'affranchir des limites liées à la thérapie cellulaire, préalablement évoquées. De plus, l'utilisation des cellules endogènes, déjà adaptées au microenvironnement complexe du DIV, permet ainsi d'augmenter leur chance de survie au sein du milieu hostile du NP dégénéré. Cependant, la diminution décrite du nombre de ces cellules souches/progénitrices discales avec l'âge et les potentielles difficultés de migration cellulaire au sein de DIV sévèrement dégénérés et très fibreux, limitent ces stratégies. C'est donc dans un contexte de DIV précocement à modérément dégénéré chez un patient jeune, que nous envisageons cette approche.

De plus, afin de mettre en place une telle stratégie d'action séquentielle dans le cas d'une application discale, le recours à un système à libération séquentielle, comme préalablement expliqué, est requis. Le système à libération séquentielle a pour objectifs de protéger les facteurs biologiques, de prolonger leurs effets thérapeutiques *in vivo*, mais aussi de mettre en place deux profils de libération. En effet, une libération rapide des chimiokines afin de recruter les cellules endogènes des plateaux cartilagineux vers le NP, suivie d'une libération prolongée des facteurs de croissance est ici recherchée, afin de stimuler les activités anaboliques des cellules souches/progénitrices recrutées. Pour ce faire, dans cette étude nous nous sommes

tournés sur l'utilisation de microparticules polysaccharidiques. Ces mêmes microparticules polysaccharidiques ont d'ores et déjà fait l'objet d'une précédente étude au laboratoire, évaluant leur aptitude à adsorber et libérer les facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5. Les résultats avaient alors démontré une efficacité d'adsorption de 100% et des profils de libération prolongée sur 21 jours pour ces deux facteurs. Le maintien de la capacité de ces facteurs à phosphoryler les voies SMAD, impliquées dans les processus d'induction de la synthèse d'une MEC de type nucléopulpogénique, après libération des microparticules avait également été vérifié. Dans ce travail de thèse, nous avons dans un premier temps évalué l'adsorption et la libération des chimiokines associées aux microparticules polysaccharidiques, celles des facteurs de croissance ayant déjà été réalisées. Nous avons ensuite analysé la bioactivité des différents facteurs biologiques (CXCL12, CCL5, TGF- β 1 et GDF-5) après libération des microparticules polysaccharidiques. Puis, nous avons évalué notre système à libération séquentielle de facteurs biologiques au sein d'un modèle *ex vivo* de DIV ovin spontanément dégénéré, que nous avons préalablement mis en place au laboratoire. Ce modèle *ex vivo* de culture d'organe a été inspiré du modèle *ex vivo* de DIV caudaux bovins développé à l'AO Foundation. Ce travail a fait l'objet des sujets d'étude de Constantin Moraru et Edouard Samarut, tous 2 internes en neurochirurgie, lors de leur Master 2. Ce projet de thèse fait l'objet d'un financement « Paris scientifiques » de la Région Pays de la Loire et d'une ANR JCJC, portés par Johann Clouet.

PARTIE II : DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES A
LIBERATION SEQUENTIELLE DE FACTEURS
BIOLOGIQUES POUR LA REGENERESCENCE
ENDOGENE DU DISQUE INTERVERTEBRAL

A. Rationnel de l'étude

Les stratégies de réparation endogène occupent aujourd'hui une place grandissante au sein de la communauté scientifique et leur évaluation en vue d'une application discale apparaît comme une option particulièrement attractive. Comme nous l'avons précédemment détaillé, il apparaît essentiel de stimuler la synthèse d'une nouvelle MEC saine au niveau du NP dégénéré. Pour ce faire, le repeuplement du NP par des cellules souches, combiné à l'activation de leurs activités anaboliques afin de stimuler la synthèse d'une MEC saine de type nucléopulpogénique est aujourd'hui bien établi comme étant une approche prometteuse. Le recours à des facteurs biologiques impliqués dans les processus physiologiques discaux dans le but de stopper la progression des processus dégénératifs, voire engager une régénérescence du tissu discal, présente un intérêt majeur. Parallèlement, la découverte et la caractérisation récente des cellules souches/progénitrices discales offre une séduisante alternative à la thérapie cellulaire exogène et à ses limites, en vue d'une re-cellularisation endogène du NP. Le premier défi de ces stratégies réside dans la capacité de recruter ces cellules souches/progénitrices endogènes vers le NP dégénéré, celles-ci se trouvant en quantité plus abondante au niveau des plateaux cartilagineux (PC). Dans cet objectif, des cytokines aux propriétés chimioattractantes, nommées chimiokines, représentent des candidates très intéressantes. Parmi celles-ci, nous avons choisis dans cette étude d'évaluer deux chimiokines spécifiques (CXCL12 et CCL5). Comme précédemment évoqué, ces chimiokines ont d'ores et déjà été analysées en vue d'une application discale. En effet, leur présence physiologique dans le tissu discal ainsi que leurs propriétés chimioattractantes, largement décrites, pour le recrutement de cellules de type souches mésenchymateuses, en font des facteurs très intéressants pour la mise en place d'une telle stratégie de réparation endogène du DIV. Ainsi, une surexpression du CCL5 a été démontrée au sein d'un modèle *ex vivo* de DIV cultivé dans des conditions dégénératives, ainsi que dans des cas de DIV herniés douloureux (G. Pattappa et al. 2014; Ahn et al. 2002). Tandis que le CXCL12 a démontré une capacité de recrutement des CSM humaines au sein du microenvironnement discal (Pereira et al. 2014, 2016, 2018).

Une fois les cellules recrutées au sein du NP, la stimulation de leurs activités anaboliques de synthèse en vue d'une production de MEC riche en agrécane et collagène de type II constitue la deuxième étape de ce projet. Le recours aux facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5 a ainsi été évalué. Ces deux facteurs spécifiques ont d'ores et déjà démontré une action synergique

in vitro dans l'analyse d'un protocole de différenciation nucléopogénique de cellules souches de type mésenchymateuse (Colombier et al. 2016). En effet, en plus de leur importante implication dans les processus homéostatiques physiologiques discaux, ces deux facteurs de croissance, lorsqu'ils sont combinés, permettent de stimuler la synthèse, par des CSM, d'une MEC riche en agrécan et collagène de type II. Ils stimulent aussi l'expression de certains marqueurs spécifiques des NPCy au niveau génique et protéique (PAX1, OVOS2, CD24). Cependant, comme nous l'avons préalablement discuté, les facteurs biologiques présentent une courte demi-vie *in vivo* et sont particulièrement sujets à la dégradation enzymatique *in situ*. Ainsi, afin de les protéger d'une dégradation durant et après l'injection intradiscale, mais aussi de prolonger leurs effets thérapeutiques, le recours à un système microparticulaire polysaccharidique a été étudié. De plus, la libération séquentielle de ces facteurs biologiques est un élément clé pour la mise en place d'une telle stratégie. L'objectif est de libérer en premier les chimiokines, afin de recruter les cellules au niveau du NP ; puis en deuxième les facteurs de croissance afin de stimuler les activités anaboliques des cellules recrutées et éventuellement induire leur différenciation *in vivo*. Dans cette thèse, nous avons étudié l'association de microparticules de pullulane (PMBs) avec ces différents facteurs (CXCL12, CCL5, TGF- β 1 et GDF-5) afin de développer un système à libération séquentielle de facteurs biologiques pour la régénérescence endogène du DIV. Le pullulane est un polysaccharide naturel qui a d'ores et déjà été étudié en tant que support pour la libération prolongée de plusieurs facteurs biologiques, dont le CCL-5, dans le cadre d'études *in vitro* d'ingénierie tissulaire vasculaire et musculaire (Suffee et al. 2017; Purnama et al. 2015). De plus, les mêmes microbilles de pullulane (PMBs) ont fait l'objet d'une précédente thèse au laboratoire et l'objet d'un article scientifique publié dans '*Drug Delivery*' en 2017, étudiant le chargement des microbilles de pullulane avec les facteurs TGF- β 1 et GDF-5 en vue d'une application discale. Ainsi dans le cadre de cette thèse nous avons formulé des PMBs selon le même procédé d'émulsion/réticulation eau dans huile (Henry et al. 2017).

Dans ce chapitre, après une brève présentation du pullulane, une partie des résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse, sous forme d'un article, seront exposés. Puis les résultats supplémentaires obtenus non publiés, seront décrits dans la 3^{ème} partie de ce manuscrit (Partie III : Discussion et perspectives).

Le pullulane

Les polysaccharides sont des polymères carbohydrates, liés par des liaisons glycosidiques, retrouvés abondamment dans la nature et dans les organismes vivants. Ils sont très présents chez l'homme, notamment dans la composition de la MEC, et constituent ainsi une bonne alternative aux matériaux synthétiques pour toute application en interaction avec le vivant. Dans cette étude, nous avons plus précisément travaillé avec un polysaccharide naturel, biocompatible, biorésorbable et d'origine fongique, le pullulane, dont l'utilisation est validée par l'autorité européenne de sécurité des aliments. Le pullulane est un polymère de glucose synthétisé par le champignon *Aureobasidium pullulans*, à partir de l'amidon. Ses chaînes sont constituées d'une succession d'unités maltotriose connectées entre elles par des liaisons osidiques alpha 1-6. Un maltotriose est un groupement de 3 unités de glucoses liées par des liaisons osidiques alpha 1-4 (*Figure 16*). Le pullulane est commercialisé dans le domaine agroalimentaire (épaississant) et l'industrie pharmaceutique (Plantcaps®, Capsugel®).

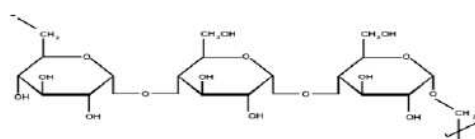


Figure 16 : Représentation des unités de base constituant le pullulane

De précédents travaux ont montré qu'il était possible de réticuler les chaînes de pullulane entre elles avec du trimétaphosphate de sodium (STMP), qui est largement utilisé dans l'industrie alimentaire car non toxique pour l'homme (Lack et al. 2004; Woo and Seib 1997). La réticulation se fait en deux étapes : la première consiste en l'ouverture du cycle STMP en milieu basique et la deuxième étape en l'addition d'une chaîne de polymère et au relargage d'un pyrophosphate (PPi). La réticulation forme des liaisons phosphoesters au niveau des groupes hydroxyles des chaînes des polysaccharides, permettant ainsi d'obtenir un réseau hydraté, ou hydrogel (*Figure 17*).

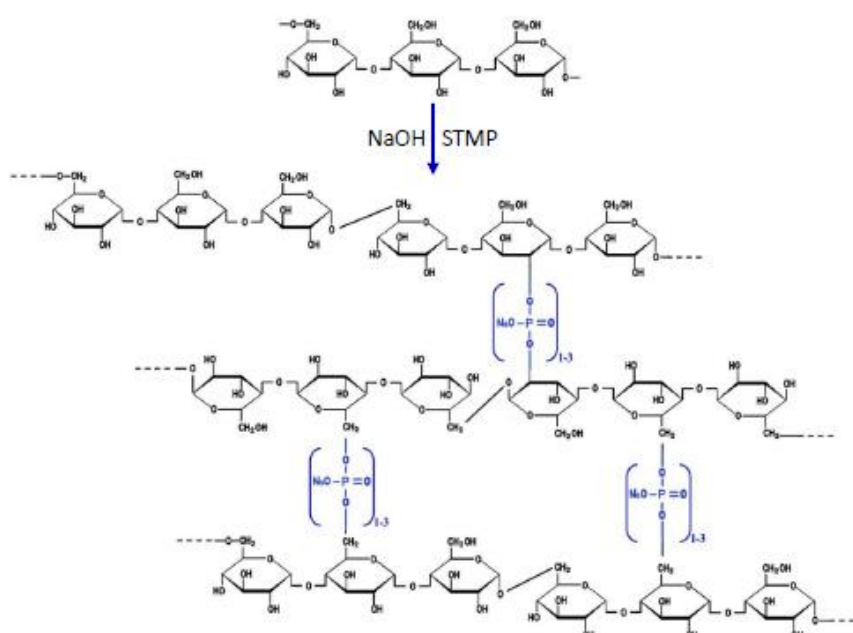


Figure 17 : Représentation chimique du processus de réticulation polysaccharidique par le STMP en milieu basique.

B. Résultats expérimentaux

Ce projet de thèse se divise en 4 tâches principales qui sont : i) la mise en place du système à libération séquentielle de facteurs biologiques, composé des microbilles de pullulane (PMBs), des chimiokines CXCL12 et CCL5 ainsi que des facteurs de croissance GDF-5 et TGF- β 1; ii) la validation des capacités de mobilisation et recrutement de cellules souches par le CXCL12 et le CCL5 après libération des PMBs; iii) l'évaluation de la capacité du GDF-5 et du TGF- β 1 à stimuler la synthèse, par les cellules souches, d'une MEC de type nucléopulpegénique, après libération des PMBs; et iv) la preuve de concept dans un modèle *ex vivo* de culture d'organe de DIV ovin, de la migration cellulaire et de la restauration du tissu discal par cette approche.

La première tâche du projet, a porté sur la production et la caractérisation des microbilles de pullulane, puis l'analyse de l'adsorption et de la libération des chimiokines (CCL5 décrit dans l'article expérimental et CXCL12 dans la 3^{ème} partie de ce manuscrit). L'étude de l'adsorption et de la libération des facteurs de croissance associés aux PMBs a déjà été réalisée lors d'une précédente étude et avait mis en évidence une efficacité d'adsorption de 100% et une libération prolongée dans le temps de ces deux facteurs de croissance durant 21 jours (Henry et al. 2017). Deux profils de libération avaient été observés, avec une libération de 100% du GDF-5 adsorbé pour les 3 concentrations initiales testées (1, 2 et 4 μ g/ml), tandis que

seulement 27% du TGF- β 1 était libéré à 21 jours. Dans le cadre de cette étude nous nous sommes basés sur les mêmes paramètres d'études que ceux évalués pour les facteurs de croissance, et avons ainsi étudié l'adsorption et la libération du CXCL12 et du CCL5 pour les 3 mêmes concentrations initiales (1, 2 et 4 μ g/ml). Pour la mise en place des tests de migration *in vitro*, et en raison des difficultés de recueil de tissu discaux humains, et donc de cellules souches discales, nous avons choisi de recourir à des cellules modèles. Les cellules souches discales ont fait l'objet de diverses études de caractérisations. Ces dernières ont mis en évidence leurs similitudes phénotypiques avec les cellules souches mésenchymateuses (Risbud et al. 2007; Blanco et al. 2010; Gruber et al. 2016). Leur capacité à se différencier dans la voie mésenchymateuse a également été confirmée. Pour toutes ces raisons, le choix d'utiliser des CSM représente un bon compromis. C'est également pour des raisons de facilité d'isolement et de quantité de cellules disponibles que nous nous sommes tournés vers l'utilisation de CSM provenant du tissu adipeux (CSA) afin de mimer les cellules souches discales. En effet, les CSM de la moelle osseuse sont les CSM classiquement utilisés, cependant leur nombre est estimé autour de 0.01%, tandis qu'il est estimé à 2% au sein du tissu adipeux (Kern et al. 2006). De plus la morbidité au site donneur est nettement plus faible concernant les cellules souches adipeuses (CSA) humaines par rapport au CSM issues de la moelle osseuse. Ainsi, durant toute cette étude, les expérimentations ont été effectuées sur des CSA humaines isolées de prélèvement adipeux fournis par la Clinique Bretéché à Nantes.

C. Article expérimental

Une partie des résultats a fait l'objet d'une publication soumise dans *EBioMedicine*. Ainsi le manuscrit disponible ci-après exposera les analyses suivantes :

- étude de l'adsorption et de la libération de la chimiokine CCL5 associée aux microbilles de Pullulane (PMBs),
- évaluation *in vitro* de ce système CCL5/PMBs sur la migration de CSA humaines,
- mise en place du modèle *ex vivo* de culture de DIV lombaires ovins au long terme, et évaluation de l'injection intradiscale de PMBs,
- évaluation *ex vivo* des systèmes CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs au sein d'un modèle *ex vivo* de culture de DIV lombaires ovins naturellement dégénérés.

Article II

Controlled release of biological factors for endogenous progenitor cells migration and intervertebral disc extracellular matrix remodeling

Problématique : Comme décrit dans la partie introductive, le développement d'approches innovantes permettant une régénérescence robuste du disque intervertébral (DIV) est aujourd'hui une nécessité. La découverte récente de cellules souches / progénitrices au sein du tissu discal ouvre la voie à de nouvelles stratégies de réparation endogène du DIV, constituant des alternatives aux approches de thérapie cellulaire. Dans cette étude, des systèmes à libération séquentielle de facteurs biologiques composés de microbilles de pullulane (PMBs) chargées avec la chimiokine CCL5 et les facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5 sont développés. L'objectif est de recruter les cellules souches discales vers le NP dégénéré, par le CCL5, puis de stimuler les activités anaboliques de ces cellules recrutées par les facteurs TGF- β 1 et GDF-5, afin de re-cellulariser le NP dégénéré et booster la synthèse d'une nouvelle MEC saine.

Matériels et Méthodes : Les PMBs ont été préparées selon un protocole de réticulation/émulsion simultanée. Les PMBs ont été incubées avec des solutions de CCL5 (1, 2 et 4 μ g/ml) pendant 24h à 4°C sous agitation rotative. Puis la libération a été réalisée à 37°C sous agitation rotative durant 21 jours. Les analyses ont été effectuées par dosage ELISA. L'évaluation de la migration *in vitro* des cellules souches adipeuses humaines (hCSA) par traitement avec des solutions de CCL5 ou des suspensions de PMBs chargées en CCL5 (CCL5/PMBs), a ensuite été analysée dans des inserts de Transwell. Finalement, des PMBs chargées en CCL5, TGF- β 1 et GDF-5 ont été injectées au sein des NP de modèles *ex vivo* de DIV ovins naturellement dégénérésensemencés en CSA humaines marquées au Vyband™ Dil au niveau d'un de leurs plateaux cartilagineux (PC). Les DIV ont été cultivés durant 3, 7 ou 28 jours de culture *ex vivo*, puis histologiquement préparés. L'observation de la localisation des hCSA fluorescentes au sein des coupes de DIV a permis d'étudier la migration de celles-ci dans le tissu discal. La qualité de la MEC a également été analysée par colorations histologiques (bleue alcian, hématoxyline/éosine/safran et trichrome de masson) et immunomarquages (ACAN, Coll2 et Tie2).

Résultats: Dans cet article nous avons obtenu une adsorption du CCL5 avec une efficacité de 100%, ainsi qu'une libération prolongée de celui-ci, avec 99% du CCL5 libérés après 21 jours. Un « burst » de libération durant les 3 premiers jours a été mis en évidence (24,4 ng/h suivis de 0.09 ng/h). Nous avons ensuite confirmé la capacité du CCL5 à recruter les hCSA *in vitro*, et démontré le maintien de cette propriété chimioattractante après libération des PMBs. Finalement, après avoir validé la possibilité de cultiver *ex vivo* au long terme des DIV lombaires de brebis sans entraîner d'altérations tissulaires, nous avons démontré une augmentation de la distance de migration des CSA humaines en présence de PMBs chargées dans un modèle *ex vivo* de DIV ovin naturellement dégénéré. Les analyses histologiques nous ont permis d'observer une densité cellulaire plus importante au niveau des NP des DIVensemencés en hCSA et injectés en PMBs chargées, après 7 et 28 jours de culture. Un maintien de l'expression du marqueur Tie2 a également été mis en évidence.

Conclusions : Les résultats de cette étude expérimentale démontrent que le système CCL5/PMBs développé est capable de libérer la chimiokine CCL5 durant 21 jours, tout en maintenant son activité chimioattractante. L'étude *ex vivo* réalisée sur des modèles de DIV ovins naturellement dégénérés a permis de faire une première preuve de concept du système à libération séquentielle (PMBs) des facteurs biologiques CCL5, TGF- β 1 et GDF-5. L'utilisation de ce système semble adaptée dans une stratégie de réparation endogène de cas précoces et modérés de DIV dégénérés.

Controlled release of biological factors for endogenous progenitor cells migration and intervertebral disc extracellular matrix remodelling

Leslie Frapin^{1,2}, Johann Clouet^{1,2,3,4}, Claire Chédeville^{1,2}, Constantin Moraru^{1,2,5}, Edouard Samarut^{1,2,5}, Nina Henry^{1,2}, Manon André^{1,2,6}, Eric Bord^{1,2,5}, Boris Halgand^{1,2,8}, Julie Lesoeur^{1,2,6}, Marion Fusellier^{1,2,7}, Jérôme Guicheux^{1,2,6,8*}, Catherine Le Visage^{1,2,*}

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

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

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

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

⁵ CHU Nantes, service de neurotraumatologie, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France

⁶ SC3M – « Electron Microscopy, Microcharacterization and Functional Morphohistology Imaging” Core Facility, Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, INSERM – UMS016, CNRS 3556, CHU Nantes, Université de Nantes, Nantes, Nantes, F-44042 France

⁷ Department of Diagnostic Imaging, CRIP, National Veterinary School (ONIRIS), Nantes F-44307, France

⁸ CHU Nantes, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France

* equally contributing authors/co-corresponding jerome.guicheux@univ-nantes.fr; catherine.levisage@inserm.fr

ABSTRACT

Background: The recent description of resident stem/progenitor cells in degenerated intervertebral disc (IVD) raised the possibility of harnessing their regenerative capacities to stimulate the nucleus pulposus (NP) endogenous repair. In this study, we developed a delivery system based on pullulan microbeads (PMBs) for the sequential release of CCL-5 chemokine to recruit these disc stem/progenitor cells toward the NP tissue, followed by the release of TGF- β 1 and GDF-5 growth factors to induce synthesis of a collagen type II and aggrecan rich extracellular matrix (ECM).

Methods: Bioactivity of released CCL5 on human adipose-derived stem cells (hASCs), selected as mimicking disc stem/progenitors, was demonstrated using a Transwell chemotaxis assay. Regenerative effects of loaded PMBs were investigated in ex vivo spontaneously degenerated ovine IVDs. Fluorescent hASCs were seeded on the top cartilaginous endplate (CEP), PMBs loaded with CCL5, TGF- β 1 and GDF-5 were injected in the degenerated NP, then IVDs were cultured for 3, 7 and 28 days.

Findings: PMBs exhibited a sustained release of biological factors for 21 days. Ex vivo migration of seeded hASCs from the CEP toward the NP was demonstrated, with a significantly higher distance covered by the cells when loaded PMBs were injected (5.8 ± 1.3 mm vs 3.5 ± 1.8 mm with no injected PMBs). In ovine IVDs, overall NP cellularity, collagen type II and aggrecan staining intensity, and Tie2⁺ progenitor cells density in the NP were increased at day 28, as compared to control groups.

Interpretation: PMBs loaded with CCL5/TGF- β 1/GDF-5 constitute an innovative and promising controlled release strategy to promote cell recruitment and IVD endogenous regeneration.

KEYWORDS

Disc disease, Microbeads, Chemokines, Ex vivo model, Regeneration, Cell recruitment

INTRODUCTION

Research in context

Evidence before this study

In a degenerated intervertebral disc (IVD), the imbalance of anabolic/catabolic events leads to extracellular matrix (ECM) degradation and loss of cells in the central nucleus pulposus (NP). The use of exogenous cells has been extensively studied to repopulate the NP, restore tissue homeostasis and reverse the degenerative process. However, these exogenous cells hardly survive when injected in the hostile microenvironment of a degenerated IVD. While endogenous repair has already been reported for several tissues, such as cartilage, tendon, and heart, it has only recently been considered for degenerated discs. Indeed, the existence of IVD stem/progenitor cells, which constitute an alternative source of regenerative cells, notably through their recruitment toward the injured NP, has been recently evidenced. A migration route inside the IVD tissue was hypothesized, and the role of the CCL5 chemokine in the natural healing process was suggested. In another hand, our previous studies have shown (i) the synergistic effects of TGF- β 1 and GDF-5 to stimulate the synthesis of a healthy NP extracellular matrix (ECM) by human adipose stromal cells (hASCs) and (ii) the sustained release of these growth factors from pullulan microbeads (PMBs) as well as the maintenance of their in vitro bioactivity.

Added value of this study

In this context, we sought to develop a sequential release system of both chemokines and growth factors that would: i) recruit disc stem/progenitor cells toward the degenerated NP using CCL5, then ii) activate the anabolic properties of recruited disc stem/progenitor cells, in order to stimulate the synthesis of a healthy NP ECM and restore the NP tissue. We demonstrated the migratory activity of CCL5 released from PMBs on hASCs, used as cells mimicking the disc stem/progenitor cells. We then evaluated the regenerative potential of CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs and GDF-5/PMBs in ex vivo spontaneously degenerated sheep IVDs. We evidenced increased NP cellularity, including Tie2+ progenitor cells, and ECM remodelling, suggesting that stem/progenitor cell migration to a degenerated IVD could boost the tissue regeneration

Implications of all the available evidence

We evidenced that is possible to stimulate the recruitment of stem/progenitor cells from the CEP toward the NP in ovine IVDs and boost ECM remodelling. These findings highlight the potential of an endogenous regenerative strategy. In addition, the newly described model of spontaneously degenerated ovine IVDs constitute a major asset for performing an ex vivo proof of concept of a novel therapeutic approach prior to conducting an in vivo evaluation.

Low back pain (LBP) is a current major socio-economic problem of industrialized societies, affecting 80% of the world population at least one in a lifetime [1]. LBP is associated with repeated work absences and represent one of the leading causes of severe disability and life quality deterioration [2]. The intervertebral disc (IVD) degeneration is now acknowledged as one of the major causes of chronic LBP [3,4]. IVD is primordial for spine stability and mobility. The nucleus pulposus, the central part of the IVD, is gelatinous and hydrated, allowing IVD to resist of compressive strains. Annulus fibrosus (AF), surrounding the NP, offers elastic properties and resistance to tension stresses. Finally, two cartilaginous endplates (CEPs) border the IVD and make junction with vertebral bodies, while allowing diffusion of oxygen, nutrients and metabolic wastes [5]. With these 3 specific structures, IVDs provide a suitable environment to absorb spinal column impacts and plays the role of a fibro-hydraulic shock absorber [6,7]. Mechanical loading, traumas and aging constitute the main risk factors for IVD degeneration. Radical decline of NP cell density combined with a rupture of the homeostasis balance lead to a major quality and quantity deterioration of the NP extracellular matrix (ECM) components, with a decrease in aggrecan and type II collagen fibres. This alteration could be notably due to abnormal and/or increased inflammatory and catabolic activities, as evidenced by the increased expression of IL-1 β , -6, -8, TNF- α MMPs and ADAMTSs [8,9]. These biologically impairments orchestrate structural modifications which affect the IVD mechanical properties and induce pain. This degenerative cascade will generate a vicious circle amplifying IVD degeneration and preventing possible enough natural repair processes from occurring [6,10]. Current treatments of discogenic LBP are focused on painful relief via pharmacological approaches or invasive surgical procedures in severe and resistant LBP cases, such as spine fusion or disc replacement. These surgical procedures, while having demonstrated a certain clinical efficacy notably in term of pain relief, remain highly invasive and present risks to induce an accelerated degeneration of adjacent discs and disrupt spine biomechanics particularly for spine fusion; moreover, they never address the pathogenic mechanisms of IVD degeneration nor allow restoring the biological integrity and function of IVD [11].

In the past few years, regenerative medicine approaches have been described as a promising option to stop or revert the degenerative disc disease (DDD) [12]. Among them, cell therapy aims to transplant exogenous cells to repopulate the degenerative NP and reinitiate the anabolic IVD machinery, in order to synthesize an adequate ECM that could contribute to restore IVD height. Particularly, mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have been extensively studied as a promising source of cells [13]. Pre-clinical trials with injection of MSCs have demonstrated positive results with an increase of type II collagen fibres synthesis. Clinical trials in humans have shown significant pain relief and improvement of patient's life quality, but very few signs of IVD regeneration [14]. Thus, some studies have suggested to therapeutically manipulate MSCs in vitro prior to injection, in order to generate NP-like cells, with growth factor-driven differentiation protocols [15,16]. Co-culture experimentations have also been performed to evaluate the effects of injected MSCs on resident NP cells [17,18]. However, injection of exogenous cells presents a major drawback, mainly due to the low cell survival after injection in the harsh NP microenvironment [19,20]. Indeed, degenerated IVDs provide a hostile microenvironment with important osmotic pressure, acidic pH, low rate of nutrients available and hypoxia conditions, as well as a degenerative inflammatory and catabolic events [5]. In addition, osteophytes formation following MSCs injection has been reported, and technological and regulation restrictions hamper the transfer of cell-based therapies into patients [21].

Recently, stem/progenitor cells have been reported in healthy and degenerated IVD tissue from human and different mammalian species [22–24]. Potential migration within the disc tissue has been suggested, as well as the existence of a migration route communicating between CEP, AF and NP [25]. These disc stem/progenitor cells are considered resembling to MSCs since they express typical MSCs markers (CD90, CD105, CD45, STRO1), and can be in vitro differentiated in osteocytes and chondrocytes [11,26,27]. Interestingly, comparative studies of these disc stem/progenitor cells isolated from CEP, AF and NP have demonstrated the superiority of CEP-stem cells in terms of in vitro migration capacity [28,29]. In another hand, Tie2 positive progenitor cells have also been described in mouse, bovine and human NP as potential source of regenerative cells [30]. In this context, these endogenous disc stem/progenitor cells constitute a promising alternative to the use of exogenous stem cells for IVD regenerative strategies [31]. Such endogenous repair strategies however face the challenge of recruiting disc stem/progenitor cells from the periphery of IVD and CEPs, where they are mostly present, toward the degenerated NP. Interestingly, ex vivo studies performed on bovine IVD cultured in degenerative conditions, have demonstrated an overexpression of chemokines known to specifically recruit MSCs [32,33]. These results suggest that a natural mechanism of endogenous healing occurs in degenerative IVDs, but could not be sufficient enough to allow a complete restoration of the disc homeostasis [10]. This low regenerative capacity could be due to the IVD's avascularity limiting the nutrients and oxygen availability [5].

Chemokines and growth factors operate as mediators of healing processes and represent potential molecular targets to stimulate and guide regeneration mechanisms. Chemokine (CC-motif) ligand 5 (CCL5, also named Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted, RANTES) recruits a substantial number of cells, including Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs), that express their specific membrane receptors, CCR1/3/5 [34,35]. In IVD context, CCL5 is secreted by disc cells, and CCL-5 receptors are expressed at the surface of AF and NP cells, suggesting that CCL5 could play a role in the IVD healing process [33]. Interestingly, physiological expression of CCL-5 is up-regulated in degenerative conditions [33,36,37]. Moreover, in patients, systemic CCL5 has been associated with discogenic back pain and moderate/severe lumbar disc degeneration, suggesting that CCL5 might be considered as a biomarkers for the diagnosis and monitoring of disc degeneration [38–40]. In another hand, growth factors TGF- β 1 and GDF-5, both essential factors to the IVD embryonic development, have been evaluated as therapeutic targets [41]. GDF-5 is physiologically present in IVD tissue and participates in disc homeostasis by increasing type II collagen fibre and aggrecan synthesis by NP cells, also named nucleopulpcytes (NPCy) [42,43]. TGF- β 1 induces the up-regulation of COL2A1 and ACAN expression genes in NPCy in vitro [44,45]. Of particular interest, we have demonstrated a synergistic role of these factors to induce the nucleopulpogenic differentiation of human adipose stem cells (hASCs), after 28 days of in vitro culture, as evidenced by synthesis of an ECM rich in sulphated glycosaminoglycans (GAGs) and type II collagen fibres, and expression of specific NPCy markers, such as CD24, PAX1 and OVOS2 [46].

Biological factors are particularly prone to in vivo degradation, and their protection by biomaterials is an option to enable a sustained therapeutic effects while performing a single injection into the IVD [12,47]. A large panel of biomaterials, composed of natural or synthetic polymers, have been combined with biological factors [48]. Among

them, polysaccharides microparticles have been studied to encapsulate CCL5, TGF- β 1 and GDF-5 [49,50]. Microparticles were prepared from pullulan, a linear polymer of glucose units, already approved by Food and Drug Association (FDA) and widely used in the food and pharmaceutical and cosmetic industries [51–53]. We have already studies these microbeads notably as TGF- β 1 and GDF-5 delivery system, with 27% and 100% of release over 21 days, respectively, and maintenance of their biological activity in terms of phosphorylation of Smad pathways was demonstrated in vitro [49].

In this context, the objective of the present study was to develop a delivery system composed of pullulan microbeads (PMBs) that could i) deliver CCL5 to recruit disc stem/progenitor cells, and ii) release a TGF- β 1 and GDF-5 synergistic cocktail to stimulate the synthesis of an NP-like ECM. Since disc stem/progenitor cells, which are the cells ultimately targeted by an endogenous IVD regenerative strategy, are only found in small numbers and are difficult to isolate, we selected hASCs to mimic them. This approach of using model cells has been previously reported in several endogenous IVD repair based studies [32,54–56]. We characterised CCL5 adsorption and release kinetics, then assessed the stimulatory effect of CCL5 on hASCs migration in vitro. Finally, we investigated the ex vivo effect of an injection of CCL5, TGF- β 1 and GDF-5 PMBs in a sheep degenerated IVD model, by analysing cell migration and tissue response.

MATERIALS AND METHODS

FITC-Pullulan microbeads (PMBs)

First, pullulan (200 000 g/mol, Hayashibara Inc., Japan) was labelled with fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) (Sigma Aldrich, St Louis, MO), as previously described [49]. FITC-pullulan (10 mg), combined with non-labelled pullulan (6 g), was dissolved in 20 mL of distilled water, under magnetic stirring, until a homogenous, viscous solution was obtained. Microbeads were then obtained using a combined emulsion/cross-linking process. Briefly, three 3 mL syringes were prepared in parallel, with (1) 2.5 g of FITC-pullulan solution, (2) 250 μ L of 10M NaOH solution and (3) 250 μ L of 90% w/v sodium trimetaphosphate (Sigma Aldrich, St Louis, MO) [57]. In parallel, 75 mL of rapeseed oil were placed in a 150 mL beaker and stirred during 30 minutes at room temperature. Then, content of syringes (1) and (2) was mixed using a luer-lock connection, then syringe (3) was connected to add the crosslinking agent. The resulting mixture was then quickly injected, within 30 seconds, using an 18G needle, into the oil phase under stirring at 450 rpm. The water/oil emulsion was then placed at 37°C during 1h30 under magnetic stirring to allow for chemical cross-linking and microbead formation. Successive washing steps of the microbeads were then performed with PBS pH 7.4 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), followed with sodium dodecyl sulphate (0.008% w/v, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) then with NaCl (0.0025%, Sigma Aldrich, MO, USA). PMBs were then filtered using a blood transfusion set (mesh aperture 200 μ m, CareFusion, San Diego, CA), freeze-dried and stored at room temperature until use. All formulated PMBs batches were then pooled to obtain a single batch.

PMBs were observed with fluorescence microscopy (DM IL LED Fluo, Leica, Germany) to visualize their shape before and after freeze-drying. Their size was measured using particle size analysis (Mastersizer 3000 Laser, Malvern Instruments, UK). For each FITC-PMB batch, 5 measurements were performed using 30 mg of freeze-dried PMBs rehydrated in PBS.

PMBs loading with CCL5 chemokine

All loading and release experiments were performed using 20 mg of freeze-dried PMBs, corresponding to 800 000 microbeads, that were decontaminated by exposition to UV light for 30 minutes. Three concentrations (1, 2 and 4 μ g/mL in PBS/BSA) of human CCL5 (R&D, Minneapolis, MN, USA, 278-RN) were prepared in filter-sterilized PBS pH 7.4 (ThermoFisher Scientific, St Aubin, France), containing 1% w/v of bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, St Louis, MO), as a buffer. PMBs were suspended in 500 μ L of chemokine solution and loading was performed by adsorption at 4°C under rotary stirring on a Mini LabRoller™ Dual Format Rotator (Labnet) for 24 hours. Unloaded PMBs were prepared in parallel using no chemokines. To remove unloaded chemokines, samples were centrifuged at 5 000 rpm for 10 minutes, at 4°C. Supernatants were then retrieved for ELISA assays (Duoset® kits, R&Dsystems, Minneapolis, MN, USA, 278-05) to measure the amount of unloaded CCL5 and to calculate the amount of adsorbed chemokines and the adsorption efficacy. Experiments were performed in triplicate for each condition.

PMBs loading with growth factors

Loading was performed as previously described [49], using 20 mg of freeze-fried PMBs, corresponding to 800 000 microbeads, that were decontaminated and suspended in 500 μ L of 1.2 μ g/mL of human TGF- β 1 (Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France, 100-21, 50 μ g/mL) or 2.4 μ g/mL of human GDF-5 (Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France, 120-01, 100 μ g/mL) solution prepared in filter-sterilized PBS/BSA. Loading was performed by adsorption at 4°C under rotary stirring on a Mini LabRoller™ Dual Format Rotator (Labnet) for 24 hours.

Adsorbed chemokine visualization

Chemokine loaded PMBs or unloaded PMBs were washed in PBS immediately after adsorption then fixed in 4% w/v paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes at room temperature. After 3 washing steps in PBS, PMBs were incubated overnight at 4°C with human CCL5 (R&D, Minneapolis, MN, USA, AF-278-NA) at 10 μ g/mL in PBS1X. Samples were then incubated for 1h at room temperature with a secondary antibody (anti-goat IgG Alexafluor 577 nm; NorthernLights TM, 1:1000). For all incubation steps, samples were rotary stirred on a Mini LabRoller™ Dual Format Rotator (Labnet). Labelled PMBs were then mounted on a glass slide with Prolong® (Molecular probes®, Life Technologies, USA) and observed by fluorescence confocal microscopy (A1RS, Nikon, Champigny sur Marne, France). Acquisitions were then processed with Image J software. Experiments were performed in triplicate for each condition.

In vitro release of chemokines from PMBs

Chemokine-loaded PMBs were suspended in 500 μ L of PBS/BSA at 37°C for 21 days, under rotary stirring. At 1h, 2h, 4h, 8h, 24h, 48h, 72h, 4 days, 7 days, 14 days and 21 days, PMBs were centrifuged at 5 000 rpm for 10 minutes at 4°C, then supernatants were collected and replaced by fresh PBS/BSA. Collected supernatants were used for ELISA assays to evaluate the amounts of released CCL5 at each time point. Experiments were performed in triplicate for each condition and each time point. For all subsequent experiments, loaded PMBs were prepared using chemokines solutions prepared at 4 μ g/mL.

In vitro bioactivity of chemokines

Adipose stem cells isolation and culture

Human adipose-derived stromal cells (ASCs) were collected from lipoaspirates harvested from 7 adult donors (33-64 years), who had given their informed consent (Supplementary Table 1). Adipose tissues were enzymatically digested and human ASCs were isolated by density gradient centrifugation and adherence to tissue culture plastic as previously described [46,58] and expanded with complete culture medium (high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM, Gibco, Life Technologies, Paisley, UK) supplemented with 10% w/w fetal calf serum (FCS) (Dominique Dutscher, France), 1% w/w Penicillin / Streptomycin (P/S) and 0.1% w/w fungizone. Human ASCs were used at passage 4 at most.

In vitro migration assay

Human ASCs migration assays were performed in 24-well plates combined with Transwell inserts with 8 µm pore polycarbonate membrane (Corning, 3422, Kennebunk ME, USA). Cells were serum-deprived the day before the experiment, detached with trypsin then suspended in serum-free culture medium supplemented with 0.1% BSA w/v. Cells (250 000 cells) were seeded on the top of the inserts (200 µL). CCL5 solutions (250 ng/mL) were prepared in serum-free culture medium supplemented with 0.1% w/v of BSA and added to the bottom chamber of the wells (500 µL). Controls experiments were performed with no chemokines. After 4h of incubation at 37°C in a 20% O₂, 5% CO₂ atmosphere, cells that remained on top of the inserts were removed using a cotton swab while those that migrated to the lower side of the insert were fixed by cold methanol (VWR Prolabo Chemicals, Fontenay Sous Bois, France) and stained with a 0.1% w/v crystal violet solution (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Stained migrated cells were observed using light microscopy then crystal violet was solubilized in 500 µL of acetic acid (MerckMillipore, Darmstadt, Germany, 1% v/v). Absorbance was quantified at 595 nm (PerkinElmer) and the number of migrated cells was calculated from a standard curve.

In another experiment, migration assays were performed by replacing chemokines solutions by PMBs loaded with CCL5 to evaluate the bioactivity of chemokines released over time. Time course in vitro migration assays were performed with 250 000 cells/insert and migration duration of 4 hours. First, chemokine loaded CCL5/PMBs prepared in serum-free culture medium supplemented with 0.1% w/v of BSA were added to 24-well plates (500 µL) and incubated at 37°C. At each released time point (0h, 4h, 24h, 48h, 72h and day 7), human ASCs were seeded on the top of a Transwell insert (250 000 cells/insert) as previously described, and migration assay was performed with cells in contact with the incubated CCL5/PMBs, for 4 hours at 37°C. Inserts were then removed and migrated cells were analysed with crystal violet, while the 24-wells plate, containing the loaded PMBs, and were put back at 37°C for subsequent chemokine release and further analysis. Controls experiments were performed with unloaded PMBs and free chemokine solutions. Experiments were performed in triplicate, with cells from 4 human donors (D, E, F and G).

Ovine IVD isolation

IVDs were collected from 10 sheep aged 1-7 years old (Vendée breed, GAEC HEAS, Les Rabelais, Ligné, France) in the accredited Centre of Research and Pre-Clinical Investigations (ONIRIS, National Veterinary School of Nantes). Sheep received a bolus hypocoagulant dose of heparin (50 IU/kg) and were euthanized with an overdose of barbiturates (60 mg/kg) while respecting the current best practices and legislation (European Directive 2010/63/EU). Post-euthanasia medullar MRI of the thoraco-lumbar sheep spines were performed to obtain T2-weighted images (TE: 86ms, TR: 3000ms; slice thickness: 3mm), using a 1.5T MRI scanner (Magnetom Essenza®, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) [59]. Post-euthanasia X-ray imaging was conducted using a radiography machine (Convix 80® generator and Universix 120 table) from Picker International (Uniontown, Ohio, USA), to obtain coronal and sagittal plane radiographs of the sheep lumbar spines, with a collimator-to-film distance of 100 cm, exposure of 100 mAs, and penetration power of 48kVp. Osirix software® (3.9, Osirix Foundation, Geneva, Switzerland) was used to analyse X-ray and MRI images and each lumbar IVD was analysed using the Pfirrmann grading system [60], by two neurosurgeons from the Nantes hospital. After extraction of the thoraco-

lumbar spine via a posterior approach, under aseptic conditions, IVDs were individually isolated by removing the vertebral bodies with an oscillating saw without damaging the cartilaginous endplates, as previously described for a bovine caudal model.[54,61]

Ovine IVD ex vivo culture

Isolated IVDs were cultured in 30 mL of IVD culture medium composed of high glucose DMEM, FCS 2%, P/S 1% v/v, fungizone 0.1% v/v, ITS 1.25% v/v, ascorbate-2-phosphate 1% w/v and non-essential amino-acids 1% w/v, at 37°C in 20% O₂ and 5% CO₂ atmosphere. To evaluate the feasibility of a long-term culture of healthy ovine IVDs, a preliminary study with isolated lumbar IVDs from 4 young sheep (1-year-old, Pfirrmann grade 1), cultured for 7, 14 and 21 days, was performed. To assess the feasibility of injecting PMBs, IVDs were injected at day 0 with PMBs (0.8 % w/w suspension in PBS) via a trans-annular pathway and a 23G needle connected to a 1 mL syringe (injected volume 200 µL) and cultured for 7, 14 and 21 days. IVDs were processed for histological sections, after one cartilaginous endplate was removed with a scalpel. IVDs were frozen for 3 minutes in isopentane/dry ice, then embedded in Super Cryoembedding Medium (SCEM) (Section Lab, Hiroshima, Japan), frozen again in isopentane/dry ice and finally stored at -80°C until further use. Frozen IVDs were sectioned (7-10 µm) with CryoStar NX70® cryostat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in the axial orientation, starting from the side without CEP. Frozen IVDs sections were histological stained with alcian blue and haematoxylin/eosin/safran (HES) or used for cell metabolism activity analysis using a Lactate Dehydrogenase/ Ethidium Homodimer (LDH/EtH) staining protocol. Briefly, frozen IVD sections were first incubated with EtH (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA, 1 µg/mL) for 15 minutes at room temperature, then with a freshly prepared LDH solution (Gly-Gly buffer at 2mM and pH 8.0, containing 40% Polypep, 5.4mg/ml lactic acid, 1.75 mg/ml β-nicotinamide adenine dinucleotide hydrate and 3 mg/mL nitroterazolium blue chloride (NBT)) for 3h at 37°C. Afterward, stained sections were rinsed with distilled water at 50°C, then fixed with PFA 4% solution for 5 minutes. Sections were mounted on a glass slide with Prolong® (Molecular probes®, Life Technologies, USA) and observed both in brightfield and under fluorescent light (excitation/emission 528/617) using a slide scanner (Nanozoomer®, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Image analysis was performed with NDP view2 software® (Hamamatsu Photonics). Results were expressed as a percentage of metabolically active cells (labelled by LDH) in relation to the total number of cells observed in the NP and AF.

Ex vivo bioactivity of PMBs loaded with chemokine and growth factors

To evaluate the activity of our sequential delivery system on a cellularized IVD microenvironment, CCL5/PMBs, TGF-β1/PMBs and GDF-5/PMBs were injected in the NP of an ex vivo IVD via a transannular pathway, then hASCs were seeded on the top cartilaginous endplate (**Fig. 6**). Briefly, 200 µL of loaded PMBs, containing 320 000 PMBs adsorbed with 800 ng of CCL5, 25 000 PMBs adsorbed with 600 ng of TGF-β1 and 25 000 PMBs adsorbed with 1200 ng of GDF-5, were injected via a 23G needle connected to a 1 mL Hamilton syringe. The injection was performed by applying a constant pressure and observing a pause before removing the needle to avoid reflux. Injected IVDs were then incubated for 2 hours, in 30 mL of IVD culture medium, at 37°C, in 20%O₂ and 5%CO₂ atmosphere. After that, culture medium was removed and human ASCs (500 000 of cells in 100 µL, passage 1-3)

were seeded on the top cartilaginous endplate, IVDs were then incubated for 30 minutes, before adding 30 mL of culture medium. Before injection, human ASCs were freshly labelled with Vybrant™ Dil cell labelling solution (Molecular Probes, USA, V-22888), according to the supplier's guidelines. Culture medium was replaced every 2-3 days, with disc height measured with callipers at each medium change and IVDs were carefully kept in the same orientation, so that the seeded top endplate remained upright throughout the study. Control experiments with intact IVDs, IVDs injected only with loaded PMBs and non-injected IVDs seeded with labelled human ASCs were performed. IVDs were cultured for 3, 7 or 28 days for all conditions. Overall, 3 donors of human ASCs (D, E and G) were used, and IVDs were isolated from 6 sheep (3-7 years old) presenting lumbar IVDs with Pfirrmann grade 2 or 3 (**Fig. 6**).

Analysis of cell recruitment and regeneration in ex vivo ovine IVDs

At each time point, ex vivo IVDs were processed for histological analysis, with fixation in PFA 4% for 5 days, followed by decalcification (Shandon TBD-2™ Decalcifier, 6,764,004, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) for 3 weeks and a post-fixation step, after abundant rinsing, in PFA 4% for 24 hours. Then, all IVDs were frozen and cryosectioned, as previously described, in the coronal orientation, starting from the posterior arch. To evaluate cell migration, the 18 IVDs seeded with hASCs were sectioned in 5 levels, separated from each other by 500 µm, while 18 others IVDs (intact and loaded PMBs groups) were sectioned on 2 levels, separated from each other by 2 cm, for ECM evaluation. Frozen IVDs sections were either directly mounted in Prolong® (Molecular probes®, Life Technologies, USA) to observe the localization of labelled human ASCs, or histological stained with alcian blue, HES and Masson's trichrome, or immunohistochemical stained (**Fig.6**).

For immunostaining, frozen sections were incubated with chondroitinase ABC (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA, C2905) or 0.1% trypsin (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA, T9935) or proteinase K (Sigma Aldrich, St Louis, USA, P6556), for 30 minutes, then with H₂O₂ (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA, 3% w/w) to inactivate internal peroxidases. After blocking with 10% w/w goat serum in 4% w/w BSA (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA, A9647) for 30 minutes, sections were incubated in primary antibody solutions (prepared in 0.1% v/v Triton and 4% w/v BSA) overnight at 4°C. Primary antibodies were: type I collagen (1:250 dilution, anti-human Abcam, Cambridge, UK, ab138492), type II collagen (1:100 dilution, anti-human, MPBiomedicals, France, 631701), Aggrecan (1:100, anti-human, Abcam, Cambridge, UK, ab3778), Tie2 (1:100, anti-human and anti-sheep, Cliniscience, Nanterre, France). Sections were then incubated with a secondary antibody (biotinylated goat anti-mouse secondary antibody (1:500 dilution, Dako, Agilent Technologies, Les Ulis, France, E0433) for aggrecan or anti-rabbit secondary antibody (1:300 dilution, Dako, Agilent Technologies, Les Ulis, France E0432) for type I and II collagen and Tie2, for 1h at room temperature. Following horseradish peroxidase-conjugated streptavidin amplification (1:400, Dako, Demark), sections were developed with diaminobenzidine (DAB kit, GBI Labs, CO2-12, USA) for 1 minute and counterstained with haematoxylin for 30 seconds.

Unstained and stained sections were observed using a slide scanner under fluorescent and brightfield light (Nanozoomer®, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and image analysis was performed with NDP view2 software® (Hamamatsu Photonics) and ImageJ software. Migrated cells identified in the NP were counted using

Image J software, and results were expressed as the mean value of the number of migrated cells per section, with 5 sections (each separated from 500 μm) analysed per disc and per time point. The maximum migration distance from the endplate toward the NP was measured using NDPScan software. For each section, time point and donor, results are presented as the mean value of 3 measurements performed on one section.

Statistical analysis

All the results are presented as means $\pm$ SD. Statistical analysis were performed using Graph Pad Prism 5.0® software (GraphPad, San Diego, California, USA). Statistical significance was determined using one-way ANOVA or two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test for multiple group comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Unless otherwise stated, the experiments were repeated at least three times.

RESULTS

Pullulan microbeads (PMBs) for chemokine adsorption and release

PMBs were successfully obtained by a water/oil emulsification process combined with a chemical crosslinking step, during which phosphate bonds between the -OH groups of pullulan chains are created, as described previously [49]. To perform loading with biological factors, freeze-dried PMBs were rehydrated with CCL5 at 3 different loading concentrations (1, 2 and 4 µg/mL) and incubated at 4°C for 24 hours. Loaded PMBs exhibited a spherical morphology and a mean size of 95.4 ± 0.5 µm (90% of the particles population had a diameter inferior to 184 µm) (data not shown) [49]. Following a centrifugation step, ELISA assays performed on supernatants did not detect CCL5, suggesting a 100% loading efficiency for this molecule (data not shown). CCL5 adsorbed on PMBs were evidenced using red fluorescently labelled specific antibodies (**Fig. 1**). CCL5 adsorption was confirmed at all 3 tested concentrations, while unloaded PMBs incubated in PBS did not exhibit any red fluorescence (**Fig.1**).

CCL5 release in PBS supplemented with 1% w/v BSA was then studied for 21 days at 37°C, with ELISA assays performed at each time point on collected supernatants. Macroscopic observations at the end of the release experiment did not evidence any degradation of the PMBs (data not shown). Results of the cumulative amount of CCL5 released over time are presented in **Fig. 1**. Overall, a sustained delivery of adsorbed chemokine was observed for 21 days, for all initial loading concentrations. PMBs/CCL5 (initial concentration of 4 µg/mL) showed an initial burst release during the first 24h, with a release rate of 43 ng/h, followed by a continuous release of 0.07 ng/h. A similar profile was observed for PMBs/CCL5 loaded with initial concentrations of 1 µg/mL and 2 µg/mL. At day 21, 85%, 99% and 99% of the adsorbed CCL5 were released from PMBs loaded with initial concentrations of 1, 2 and 4 µg/mL, respectively.

In vitro migration assay

We then evaluated the ability of free and released chemokines to stimulate the migration of human adipose-derived stem cells (hASCs), as cells mimicking the endogenous progenitors, using a Transwell insert. We analysed the migratory effect of CCL5 (250 ng/mL in DMEM/BSA) on human ASCs, with experiments performed in triplicate on 3 donors (donor A, B and C) (**Fig. 2**). Representative microscopic images of the lower side of inserts, showing cells stained with crystal violet, demonstrate that only few untreated cells, exposed to DMEM/BSA, exhibited a spontaneous migration (**Fig. 2A**, left image), whereas numerous cells treated with CCL5 (**Fig. 2A**, right image) migrated and were evidenced on the lower side of the porous membrane. Quantitative analysis of the migration is presented (**Fig. 2A**, lower panel) as a migration fold increase for each donor, as compared to their own control group (untreated cells). We observed a striking inter-donor variability, with migration of cells from donor B barely enhanced by incubation with CCL5, while migration of cells from donor A and donor C was multiplied by 3.1 and 4.2, respectively, in the presence of CCL5.

In another experiment, we evaluated the chemokine recruitment activity over time by incubating CCL5 solutions (at 4 µg/mL) or PMBs previously loaded with CCL5 (loading concentration 4 µg/mL) at 37°C, for up to 7 days, on cells from 4 additional donors (D,E,F and G). At specific time points (fresh solution or suspension, 4h, 24h, 48h, 72h and

7 days of incubation), human ASCs were seeded on Transwell inserts (with 250 000 cells/insert) then a migration assay was performed for 4 hours, with cells in contact with the previously incubated free chemokines or released chemokines. Results were expressed in fold increase as compared to untreated cells or cells treated with unloaded PMBs (pooled for all donors D, E, F and G), at each time point. For free CCL5 (**Fig. 2B**, left panel), a trend in decreased activity overtime was observed, with a migration fold increase of 4.1 with a fresh solution, as compared to untreated cells and a reduced migration after only 4 hours of incubation at 37°C (fold increase of 1.4). No effect on human ASC in vitro migration after 72 hours and 7 days was observed. On the contrary, PMBs loaded with the CCL5 demonstrated an increased migratory effect on human ASCs over time (**Fig. 2B**, right panel). Results were expressed in fold increase as compared to cells treated with unloaded PMBs at the same time point (fresh suspension of PMBs, 4h, 24h, 48h, 72h and 7 days of incubation). We confirmed that loaded PMBs presented a bioactivity for at least 3 days. We observed an increase of the migratory effect on ASCs after 4 hours and 24 hours of incubation (fold increase of 1.6 and 2.0, respectively), and no migration detected when CCL5/PMBs were incubated for 7 days before the migration assay. It is worth noting that pooled results from four human donors indicated no significant differences. To overcome the inherent donor variation, we increased the number of in vitro experiments and we confirmed that a significant migration increase was achieved with released CCL5 for three cell donors out of four. Moreover, similar bioactivity profiles were obtained with all four donors, with a maximum of migration obtained with PMBs incubated for 4h to 48h (**Fig. 2C**).

Ex vivo lumbar ovine IVD long-term organ culture

We then investigated the feasibility of a long-term organ culture with lumbar IVDs isolated from 4 sheep. Harvested IVDs (**Fig. 3B**) were cultured for 21 days and their structural integrity was analysed on histological sections stained with alcian blue and HES. While a decrease in the alcian blue staining intensity in the NP was observed at day 21, as compared to day 0, there was no obvious modification of the tissue cellularity on HES sections. These data collectively show that we have for the first time successfully implemented an ex vivo culture model of ovine lumbar IVD that maintain its cellular and histological organization for at least 3 weeks.

By using this model, we then tested whether PMBs suspension in PBS may be intradiscally injected. IVDs were thus injected at day 0 with PMBs (0.8 % (w/w) suspension in PBS, injected volume 200 µL), via a trans-annular route and a 23G needle (n=8 discs) to estimate the impact of this injection on long-term IVD organ culture (**Fig. 3C**). At each time point (day 0, 7, 14 and 21), discs were cryosectioned and negatively charged PMBs were evidenced on alcian blue sections as dark blue dots, as indicated with black arrows.

To further address whether this transannular injection of PMBs may affect IVD integrity during the course of culture, histological Boos scoring was used to quantitatively assess IVD degenerative status. Our data indicated that the culture duration tends to increase the modified Boos score of cultured and non-injected IVDs from 6 at day 0 to 10 at day 7 (**Fig. 3D**). The Boos score then remained stable until day 21. A similar trend was observed with cultured, injected IVDs, where the Boos score was higher immediately following injection (10 at day 0) then remained stable until day 21. It is worth noting that the modified Boos score used in this study takes into account the NP cell density, the NP numbers of tears and granular changes, as well as the presence of NP mucosal degeneration. It ranges

from 0 (no IVD degeneration) to 18 (complete IVD degeneration), and thus indicates that ex vivo culture of IVDs and injection of PMBs did not induce major degenerative process. In addition, disc cell metabolic activity was assessed on disc sections with an LDH/EtH assay. At each time point, more than 80% of the disc cells were metabolically active, whether the IVD were injected with PMBs or not (**Fig. 3E**).

Cell migration in spontaneously degenerated ovine IVD microenvironment

After having validated our ability to culture an ex vivo organ model of ovine IVD, we were interested in determining whether intradiscally injected PMBs loaded with CCL5 and growth factors may contribute to mobilize, recruit and stimulate stem/progenitors cells (modeled by human ASCs placed on top of CEP) in our organ culture model. To assess the effect of CCL5/PMBs on cell migration, Vybrant Dil labelled fluorescent human ASCs, were seeded on the top cartilaginous endplate of degenerated ovine IVDs (Pfirrmann grade 2-3, as assessed on spine MRIs (**Fig.S1**)) then tracked for up to 28 days of culture. The experimental design is presented on **Figure 4**, with 4 conditions: intact IVDs (n=9), IVDs injected with CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs and GDF-5/PMBs (n=9), IVDs seeded with human ASCs (n=9), and IVDs seeded with human ASCs then injected with loaded CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs and GDF-5/PMBs (n=9).

At day 3, 7 and 28, no fluorescent cells were observed in IVD sections of intact and injected PMBs conditions without any seeded hASC (**Fig.5A, top row**). On the contrary, numerous red fluorescent cells were observed on sections of IVDs seeded with hASCs, injected or not with PMBs (hASCs and hASCs + PMBs groups), at each time point (**Fig. 5A**). The number of fluorescent cells in the NP was counted using ImageJ software, and results were expressed as the total number of migrated cells per section (**Fig. 5B**). While a tendency for an increased number of migrated cells per section as a function of time was noted for both the seeded hASCs condition (mean values of 11, 12 and 8 at day 3, 7 and 28, respectively) and the seeded hASCs + loaded PMBs condition (mean values of 9, 22 and 12 at day 3, 7 and 28, respectively), there was no significant difference between the groups at the same time point. The maximum migration distance from the endplate toward the NP, highlighted in yellow dotted arrows on **Fig. 5A**, was measured and results are presented on **Fig. 5C** as the mean value of 3 measurements for each donor (D, E and G). While human ASCs migrated a distance of 3-4 mm at day 3 and day 7, whether loaded PMBs were injected or not, a significant increase in the maximum migration distance was observed at day 28 in the loaded PMBs condition, as compared to the seeded hASCs condition (7.48 ± 0.42 mm vs $2.67 \text{ mm} \pm 0.66$ mm for donor D, $4.78 \text{ mm} \pm 0.13$ mm vs $5.87 \text{ mm} \pm 0.20$ mm for donor E and $5.07 \text{ mm} \pm 0.41$ mm vs $2.02 \text{ mm} \pm 0.38$ mm for donor G, respectively). These data demonstrate that loaded PMBs didn't significantly impact the number of migrated cells but significantly increased their migration distance within the disc tissue.

Extracellular matrix histological analysis of ex vivo IVDs

To evaluate the anabolic effects of the seeded human ASCs and the injected loaded PMBs on the NP extracellular matrix, histological Alcian blue (AB), HES and Masson's trichrome staining were performed on sections of all levels of each condition, and at each time point (day 3, day 7 and day 28). Representative coronal sections show the 3 anatomical IVD regions of IVD (CEPs on the top and bottom, the NP in the centre surrounding by the AF) (**Fig. 6**).

While alcian blue intensity decreased overtime in the intact group (**Fig. 6A**), a slightly more intense blue staining was observed at day 7 and day 28 in all experimental groups (hASCs, loaded PMBs and hASCs + loaded PMBs conditions), particularly in the hASCs + loaded PMBs group, suggesting an ECM with higher GAG content. Injected PMBs, composed of negatively charged polysaccharide network, were identified as blue dots within the NP tissue at each time points, indicating that PMBs withstood the hostile microenvironment of the degenerated IVD throughout the ex vivo culture (**Fig. 6B**, day 28). No similar blue dots were observed on sections of groups not injected with PMBs at any time point. It is worth noting that in the hASCs + PMBs condition, injected PMBs appear surrounded by some loose blue stained tissue at day 7 (data not shown) and day 28, (**Fig. 6B**). Regarding the NP cellularity, a qualitative analysis of HES stained NP sections of all groups revealed a higher cell density for groups seeded with hASCs, injected with PMBs or not, as compared to NP sections of groups where no hASCs were seeded (intact and PMBs conditions), at day 7 and day 28 (**Fig. 6C**).

Collagen and aggrecan expression in ex vivo IVDs

Immunostaining of ECM molecules was performed on cryosections of several levels of each condition, and at each time point (day 3, day 7 and day 28). Intense collagen type I immunohistostaining was observed in vertebral bodies and AF areas of IVD sections of all groups and at each time point (not shown). Collagen type II was observed on whole IVD sections, mainly as a diffuse matrix staining for all conditions and at each time point, with a slight increase of the staining intensity at day 28 for groups seeded with hASCs, injected with PMBs or not, as compared to NP sections of groups where no hASCs were seeded (intact and PMBs conditions) (**Fig. 7**, top row). On high magnification images, cytoplasmic expression of type II collagen was observed in cells of the transitional zone (TZ) between the CEPs and the NP and, as well as in cells of the NP area (**Fig. 7**, 2nd and 3rd rows). Similarly, a diffuse aggrecan staining was observed for all conditions and at each time point, with a slight increase of the staining intensity at day 28 for groups seeded with hASCs, injected with PMBs or not, as compared to NP sections of groups where no hASCs were seeded (intact and PMBs conditions)(**Fig. 7**, bottom row). In addition, an intracellular staining was observed for all groups, except for the intact group, with aggrecan positive cells mainly localized in the TZ area (not shown), while some aggrecan positive cells were also observed in the NP.

Tie2 positive cells in an ex vivo IVDs

To further analyse the presence and localization of progenitor cells in the ex vivo IVDs, immunohistostaining for a progenitor cell marker, the angiopoietin-1 receptor (Tie2), was conducted. Surprisingly, numerous Tie2 positive cells were observed in all spontaneously degenerated IVD sections, for all groups and time points (**Fig.8**). After 3 days of ex vivo culture, Tie2 positive cells were found in both TZ and NP areas. In groups where no hASCs were seeded (intact and PMBs conditions), we observed a fast decrease of the density of Tie2 positive cells with ex vivo culture time, with only very few positive cells in the NP at day 7 and day 28. For the group seeded with hASCs but not injected with PMBs, a moderate decrease overtime was also noted, with some Tie2 positive cells identified in both TZ and NP areas after 7 and 28 days of ex vivo culture. On the contrary, in the group seeded with hASCs then injected with loaded PMBs, numerous Tie2 positive cells were evidenced at each time point, especially in the NP area.

DISCUSSION

The present work aims to develop an injectable sequential release system of chemokine and growth factors in order to stimulate endogenous repair in a degenerated IVD. The sequential release steps are essential to: i) recruit endogenous stem/progenitor cells toward the degenerated NP, then ii) locally stimulate these migrated cells in order to synthesize a healthy extracellular matrix rich in aggrecan and type II collagen.

Endogenous disc stem/progenitor cells have recently been discovered and characterized, paving the way to new regenerative strategies, while overcoming the difficulties often associated with cell therapy. Indeed, cell leakage and death following injection into the NP, as well as osteophytes formation, are partly due to the fact that injected cells are not adapted to the disc microenvironment [13,21,23,62]. On the contrary, disc stem/progenitor cells have been identified in all three IVD compartments (CEP, NP and AF), as well as in vertebral bodies [28,37,63]. Migration routes within the IVD, more precisely pathways connecting the cartilaginous endplates to the centre of the NP, have been hypothesized and subsequently studied [64,65]. Disc stem/progenitor cells exhibit phenotypic similarities and higher osteogenic and chondrogenic differentiation capabilities than bone marrow derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) [24,26]. Interestingly, disc stem/progenitor cells originated from CEP show higher migration abilities and superior chondrogenic regeneration [29,66,67]. As such, the recruitment of disc stem/progenitor cells from CEPs toward NP seems a very promising endogenous repair strategy.

Understanding the mechanisms of IVD degeneration as well as the failure of repair processes could be the key to the design of an effective disc regeneration strategy. Indeed, IVD spontaneous endogenous repair might not be as effective as expected in preventing degeneration [10]. All three major events in IVD degeneration, i.e inflammation and catabolic cascades, progressive loss of cells and decline in cellular functions and anabolic activities, should be considered in order to implement a robust and sequential repair strategy [68]. A such, therapeutic strategies should address these three events, with the aim of decreasing the catabolic and inflammatory activities to improve the hostile degenerated IVD microenvironment, then repopulating the partially healed NP tissue, and finally restoring the anabolic activities, and all this with a single intradiscal injection [11,12,47]. However, a chemokine/growth factors delivery approach may still be sufficient to counteract a moderate inflammation, notably with TGF- β contributing to maintain the expression levels of connective tissue growth factor (CCN2), which decreases the up-regulation of MMPs and ADAMTS by inhibition of the IL-1 β [69–71]. This present work is therefore based on a 2-step sequential strategy that could take place in a moderately degenerated IVD with restrained inflammatory, catabolic activities, and available disc stem/progenitor cells, described as decreasing with age [30,72].

Herein, to develop such a 2-step sequential strategy, we selected the chemokine CCL5 to recruit disc stem/progenitor cells from the periphery of IVD toward NP, and the growth factors TGF- β 1 and GDF-5 to orientate and stimulate migrated disc stem/progenitor cells to synthesize a nucleopulpogenic ECM. To perform a single injection treatment, we combined them with pullulans microbeads (PMBs) and therefore, hypothesized that these loaded PMBs would provide appropriate release and biological properties. We analysed the adsorption and release profiles of chemokine CCL5 from PMBs, using the same initial concentrations (1, 2 and 4 μ g/mL) than those used in our previous study with growth factors (TGF- β 1 and GDF-5) and PMBs [49]. In a similar manner, we

demonstrated an adsorption efficiency of 100% and a sustained release profile for CCL5, with 99% released at 21 days for the initial loading concentration of 4 µg/ml. Although CCL5 fast release fits the required profile for cell recruitment in step 1, the previously reported growth factor release (27% for TGF-β1 and 100% for GDF-5) [49] may be too fast to achieve the production of an ECM with appropriate biomechanical properties. Whether such a drug delivery system may allow migrated progenitors to fully differentiate into the nucleopulpopogenic pathway remains of particular interest and will deserve to be further analysed. Association of microparticles or microbeads to a macro-hydrogel could slow down the release of biological factors and potentially favour the ideal sequential release profile [68]. This delayed effect has notably been reported for TGF-β1/PMBs and GDF-5/PMBs dispersed in a cellulose-based hydrogel [49]. A polymer of choice could be hyaluronic acid, one of the main component of the NP ECM, that has been used as a thermoreversible hydrogel for delivering another chemokine, CXCL12 (Chemokine (CXC) ligand factor 12, also named stromal derived factor-1, SDF-1 [54–56].

Regarding the CCL5 chemoattractant activity, the trend of an increased cell migration overtime obtained with CCL5/PMBs, as compared to unloaded PMBs and free chemokines, confirmed that the protection provided by the biomaterial is a fundamental aspect to ensure a sustained biological effect. This is in line with the maintained biological activity of TGF-β1 and GDF-5 after release from PMBs, i.e. ability to phosphorylate the SMAD (2/3 and 1/5/8) pathways of hASCs, that was demonstrated previously [49]. As reported in the literature, we observed an expected important donor-to-donor variability when analysing the chemotaxis results. This is in agreement with a study that addressed the effect of donor's age on cell migration and showed that human BM-MSC isolated from young donors present a significantly higher migration capacity in a bovine ex vivo model, when compared to cells from older donors [54]. To overcome this variability, we increased the number of in vitro experiments with different donors and confirmed that a significant migration increase was achieved with released CCL5 for three human donors out of four, with similar profiles obtained for all human donors.

Ex vivo IVD culture organ models have been recently developed by several research teams in order to evaluate disc stem/progenitor cells migration routes. We first validated our culture conditions, based on protocols developed by the AO Foundation [61], using lumbar IVDs isolated from young sheep. Histological and cell metabolism data collectively show that we have for the first time successfully implemented an ex vivo culture model of lumbar ovine IVD for at least 3 weeks and that could be used to monitor the effects of intradiscally injected biologics. We then implemented a degenerative model to study the chemoattractant potential of our sequential release system. Previous studies were performed in caudal IVDs that were isolated from calves, then submitted to a nucleotomy to degenerate the initially healthy tissue [61]. However, this induced microenvironment mimicking a degenerative tissue is far from a naturally damaged IVD. As such, we aimed to use a spontaneously degenerated microenvironment and we selected sheep IVDs, known to present spontaneous IVD degeneration occurring with ages as a more relevant animal model [73,74]. Testing of CCL5/PMBs, TGF-β1/PMBs and GDF-5/PMBs was then performed in age-dependent spontaneous degenerative model using lumbar IVDs harvested from 3 to 7-year-old sheep. While spontaneous disc degeneration models are highly relevant to a clinical situation, they also present several drawbacks as compared to the induced degeneration models. In addition to the inherent inter-discal

variability within one animal, this is an uncontrolled and less repeatable model, mostly due to the significant inter-donor variability of the disc degeneration. In addition, the model turned out to be technically challenging, with the presence of osteophytes that hampered the cryosectioning step of decalcified samples. Nonetheless, this spontaneous model of IVD degeneration in a large animal model is a considerable asset for performing an ex vivo proof of concept of a novel therapeutic approach. To our knowledge, this is the first study to report an ex vivo model of naturally degenerated IVD.

Using this ex vivo spontaneously degenerated IVD model, we evidenced a trend of increasing migrated hASCs number and a significant increase in hASCs migration distance when using CCL5/TGF- β 1/GDF-5 PMBs sequential release system. We also evidenced a spontaneous cell migration, in agreement with what has been reported in ex vivo caudal bovine IVDs, probably due to chemokines secreted by the degenerated disc cells, notably CCL5 [32,33]. Another study performed in an ex vivo nucleotomized bovine IVD showed that, while injected soluble SDF-1 had no chemoattractant activity, suggesting that the soluble protein might be prone to degradation in the tissue, hyaluronan-poly(N-isopropylacrylamide) (HAP) hydrogels exhibited a maximum release of SDF-1 at 24h. In addition, a significant increase in the proportion of recruited human BM-MSCs from the CEP toward the NP was evidenced after 48 hours [54]. It is worth noting that several ex vivo studies were performed using bioreactors where IVD tissues were submitted to a “high frequency loading (10 Hz) to induce degeneration [32,33]. In these conditions, secretion of CCL5 by the degenerated disc cells was enhanced and resulted in a chemotactic effect on human MSCs. Since we used sheep IVDs exhibiting an age-related degeneration, implementation of a bioreactor using a “physiological loading” at low frequency (0.2 Hz) could be performed to investigate cell recruitment.

The progenitor cell marker, Tie2, has already been described in mouse, canine, bovine and human NP [30,75,76]. These studies demonstrated that Tie2 positive cells isolated from NP tissue could differentiate in the mesenchymal lineage, as contrary to Tie2 negative cells [75]. For the first time, we report the presence of Tie2 positive cells in ovine IVDs. The fast disappearance of Tie2 positive cells in ovine degenerated IVDs that were cultured for 7 days or 28 days (intact groups) is in accordance with the reported decrease with age and degeneration of Tie2 progenitor cells in murine and human NP [30]. Interestingly, an increased NP cellularity was observed in the condition where hASCs were seeded on the top endplate, as compared to the control group. While low cell proliferation has been reported in both healthy and herniated human IVDs [77,78], a stimulation of NP cell proliferation has been described when IVDs were injured by nucleotomy. Moreover, the injection of loaded PMBs resulted in the preservation of the Tie2 positive cells in the NP tissue overtime, as compared to day 0. These results suggest that the combination of CCL5/TGF- β 1/GDF-5 PMBs could have either enhanced the migration of hASCs from the CEP toward the NP, stimulated the migration of endogenous progenitor cells from the CEP toward the NP or enhanced the expression of Tie2 marker in resident NP cells. Interestingly, studies reported that hASCs promote the Tie2 marker expression by progenitor cells [79,80]. Human anti-mitochondrial immunolabelling has not been successful and we are currently investigating another way to label human cells in order to confirm these hypotheses.

In this study, we selected hASCs to mimic the IVD stem/progenitor cells, but also for their demonstrated ability to differentiate into NP-like cells when cultured with TGF- β 1 and GDF-5 [46]. We can speculate that migrated hASC

from the CEP were able to attenuate IVD degeneration through ECM remodelling and synthesis of a healthy NP ECM. As such, increasing the recruitment of disc stem/progenitor cells toward a degenerated NP could increase ECM remodelling, enhancing the tissue regenerative potential. It will be interesting to explore the mechanisms by which cells invade the IVD tissue. ECM degradation by MMPs secreted by degenerative cells has been hypothesized, with up-regulation of MMP13 and MMP7 demonstrated in an ex vivo bovine IVD model cultured in degenerative conditions [32].

The next step of the study will be to perform an in vivo proof of concept in sheep with degenerated IVDs presenting Pfirrmann scores between 2 and 3, in order to confirm the regeneration potential of this chemokines/growth factors sequential delivery system. Intradiscal injectability in delicate and hard-to-reach IVD tissue should be considered. Injectability through a 23G needle have been demonstrated for PMBs alone and PMBs dispersed within a macro-hydrogel [49]. The trans-annular injection is the most commonly studied, and used in ongoing clinical studies. It is worth noting that the transpedicular approach has been recently described as an alternative route, but long-term effect on the endplate integrity has not been evaluated yet and some induced degeneration signs have been reported [81].

CONCLUSION

This study demonstrates that pullulan microbeads (PMBs) constitute a suitable micro-carrier for CCL5 chemokine and TGF- β 1 / GDF-5 growth factors, allowing their sequential and sustained release and maintenance of their biological activity, i.e. in vitro ability to enhance cell migration, as well as ability to activate Smad pathway [49]. We also demonstrated that this sequential release system significantly increased the migration distance of human ASCs toward the NP, in a newly described ex vivo degenerated ovine IVD model. In addition, overall NP cellularity, collagen type II and aggrecan staining intensity and Tie2 positive progenitor cells density in the NP were increased at day 28, as compared to control groups. The results presented here constitute a proof of concept that PMBs loaded with CCL5/TGF- β 1/GDF-5 constitute an innovative sequential release system for endogenous IVD regeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

LF is a recipient of a MESR PhD scholarship. The authors gratefully acknowledge S. Grad (AO foundation, Davos, Switzerland) for her help in implementing the ex vivo ovine model of IVD. Authors thank Drs. F. Lejeune (Clinique Breteche, Nantes) for harvesting human lipoaspirates. Authors also thank the CRIP (O. Gauthier, N. Boushina, C. Decante, P. Roy, D. Rouleau, S. Madec, I. Leborgne) for providing the sheep spines and the MicroPICell platform from the SFR Francois Bonamy/INSERM UMS 016 (P. Hulin, S. Nedellec, P. Paul-Gilloteaux) for confocal microscopy.

FUNDING SOURCES

This study was supported by grants from Région des Pays de la Loire (BIO2), ANR (STIMUDISC- ANR-16-CE18-0008 and REMEDIV ANR-14-CE16-0017) and Fondation de l'Avenir (AP-RMA 2015-018 and BO-RMA-15-001).

DECLARATIONS OF INTERESTS

The authors declare no financial conflicts of interest.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conception and design: LF, JC, MF, JG and CLV

Data acquisition: LF, CM, CC., ES., MA., B.H and JL

Data analysis and interpretation LF, JC, MF, JG and CLV

Manuscript draft, edition and revision: LF, JG and CLV

Final approval of the manuscript: All the authors

J.G. and C.L.V. contributed equally to this work.

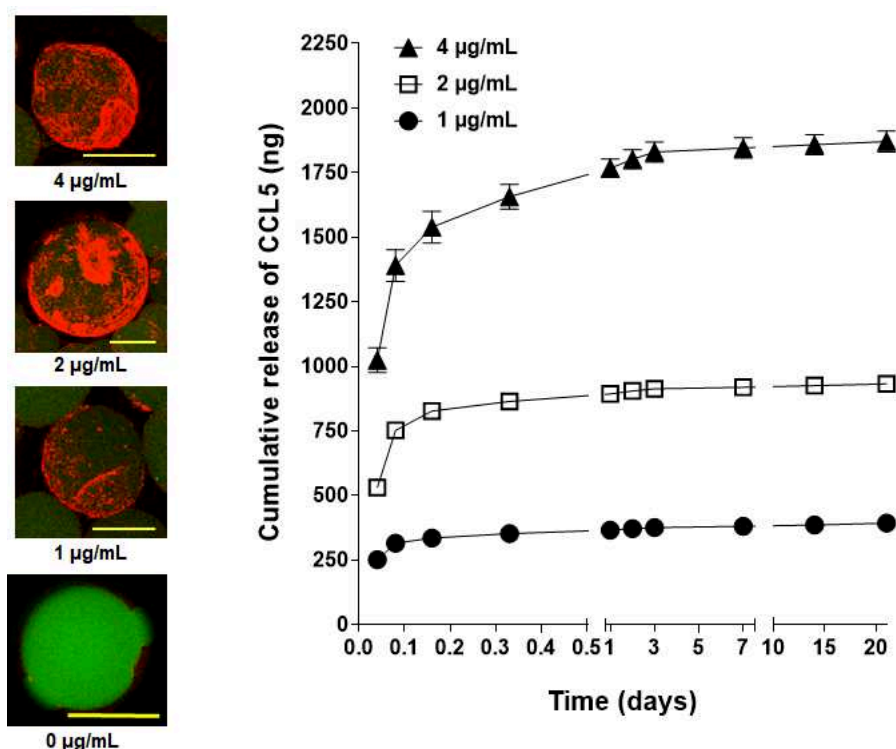


Figure 1. CCL5 chemokines adsorption and release kinetics from Pullulan MicroBeads (PMBs). PMBs were loaded by incubation in CCL5 (1, 2 or 4 µg/mL in PBS) and kept at 4°C under stirring rotation for 24 hours. In one experiment, loaded PMBs were fixed with PFA and immunolabelled with anti-CCL5 antibody, followed by secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor fluorophores (577nm). Chemokines were observed at the surface of PMBs by confocal fluorescence microscopy (scale bar 100 µm). In another experiment, chemokine release from loaded PMBs was performed in 500 µL of PBS/1% w/v BSA at 37°C under stirring rotation, for 21 days. At specific time points, supernatants were retrieved and analysed with ELISA for CCL5. Results are expressed as the cumulative amount of released CCL5, as a function of time. Experiments were performed in triplicate and results are expressed as mean value $\pm$ SD. Abbreviations: CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5; PFA: paraformaldehyde.

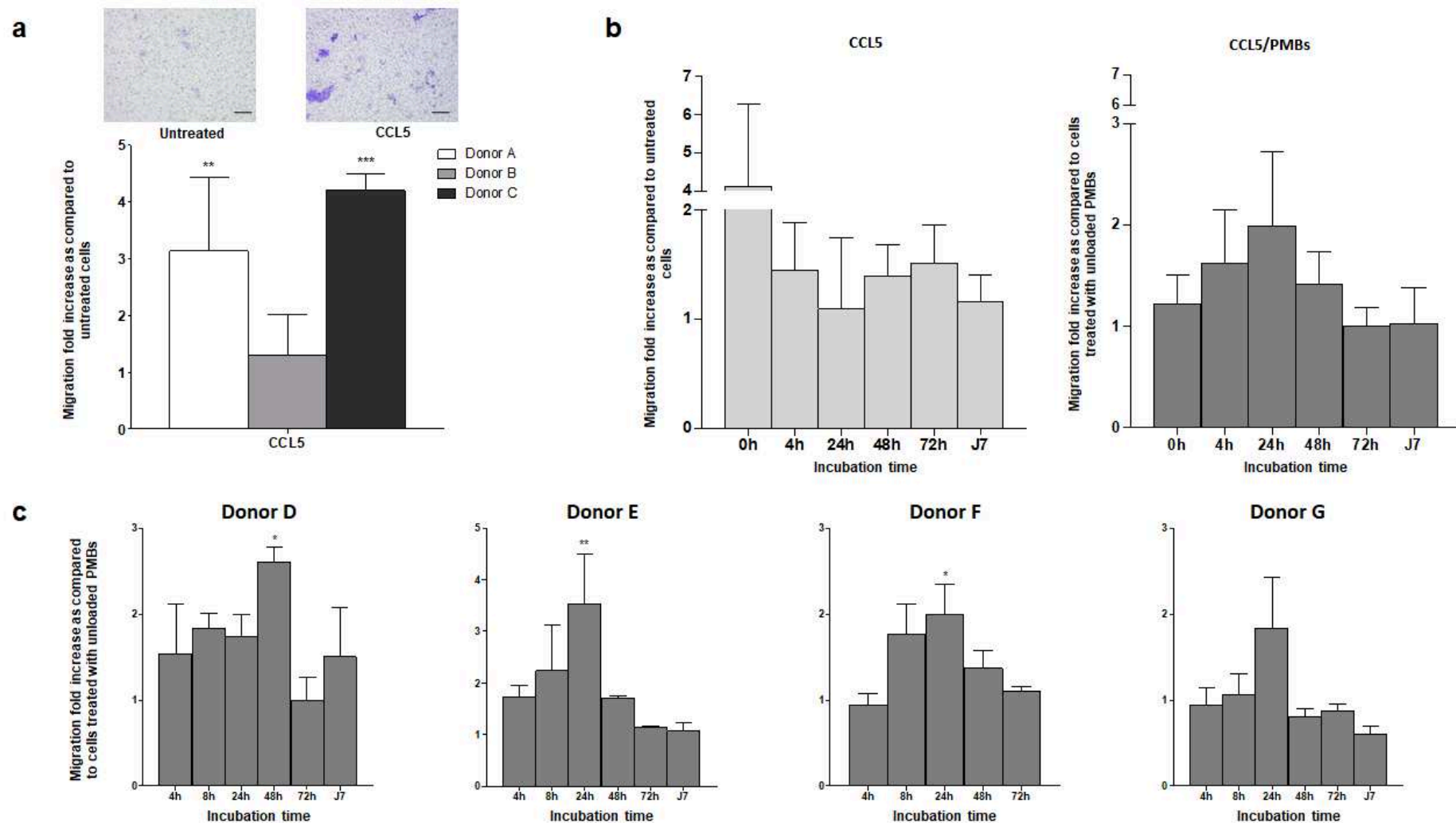


Figure 2. In vitro bioactivity of CCL5 on human ASCs migration. (a) Migratory effect of CCL5 on human ASCs. In vitro migration of human ASCs treated with CCL5 (250 ng/mL in DMEM/0.1% w/v BSA), or untreated cells (DMEM/0.1% w/v BSA) for 4 hours are presented. Representative microscopic images of the lower side of inserts, showing

migrated cells stained with crystal violet (scale bar 100 μm). Results for 3 donors (donors A, B and C) were independently expressed in fold increase as compared to their own control group (untreated cells) and are presented as mean values $\pm$ SD of triplicate experiments. **(b)** Sustained bioactivity of CCL5. Migratory effect of free CCL5 was assessed on human ASCs as a function of time. Free CCL5 (4 $\mu\text{g/mL}$) all in DMEM/0.1% w/v BSA, were incubated at 37°C. At specific time points (fresh solution or suspension, 4h, 24h, 48h, 72h and 7 days of incubation), human ASCs were seeded on Transwell inserts then a migration assay was performed for 4 hours, with cells in contact with the incubated free chemokines. Results are expressed in fold increase as compared to untreated cells, at each time point, pooled for all donors (donors D, E, F and G). Untreated cells were incubated with DMEM/0.1% w/v BSA. **(c)** Sustained bioactivity of CCL5 released from PMBs. Migratory effect of CCL5 released from PMBs was assessed on human ASCs as a function of time. CCL5/PMBs (initial loading concentration 4 $\mu\text{g/mL}$), all in DMEM/0.1% w/v BSA, were incubated at 37°C. At specific time points (fresh solution or suspension, 4h, 24h, 48h, 72h and 7 days of incubation), human ASCs were seeded on Transwell inserts then a migration assay was performed for 4 hours, with cells in contact with incubated microbeads CCL5/PMBs. Cells from 4 donors (D, E, F and G) were used to assess the bioactivity of CCL5/PMBs over time. For each time point and donor, migration results are expressed in fold increase as compared to cells treated with unloaded PMBs at the same time point. Results are presented as mean values $\pm$ SD 4 donors (donors D, E, F and G), with all experiments performed in triplicate. *represents a significant difference with untreated cells, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, two way ANOVA, Bonferroni post-test. Abbreviations: CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5; ASCs: Adipose Stem Cells; BSA: Bovine Serum Albumin; PMBs: Pullulan Microbeads.

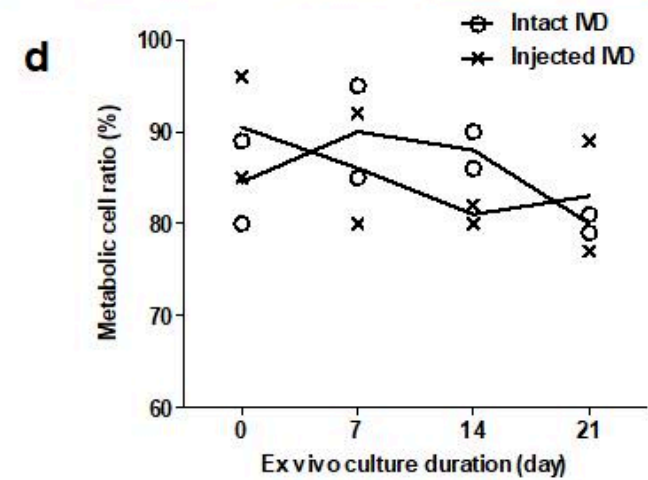
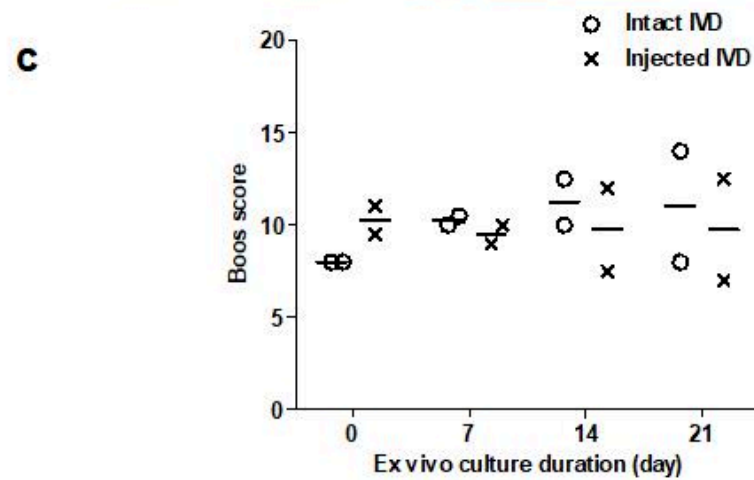
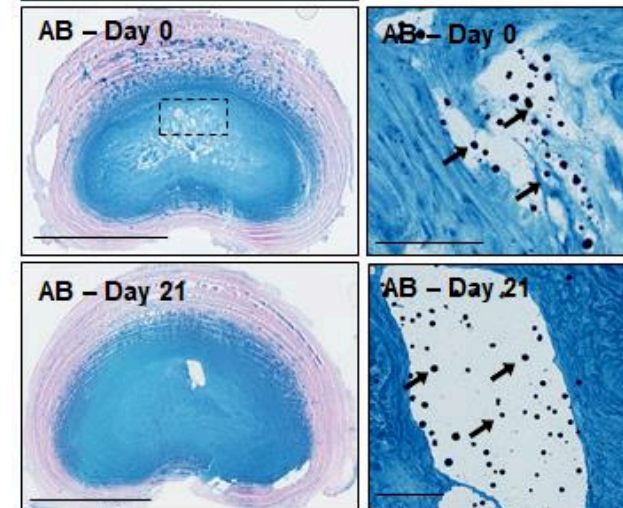
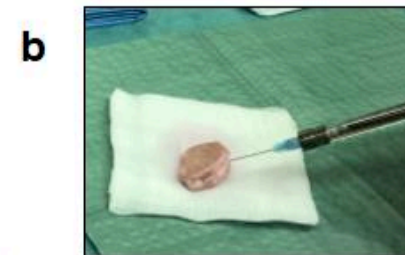
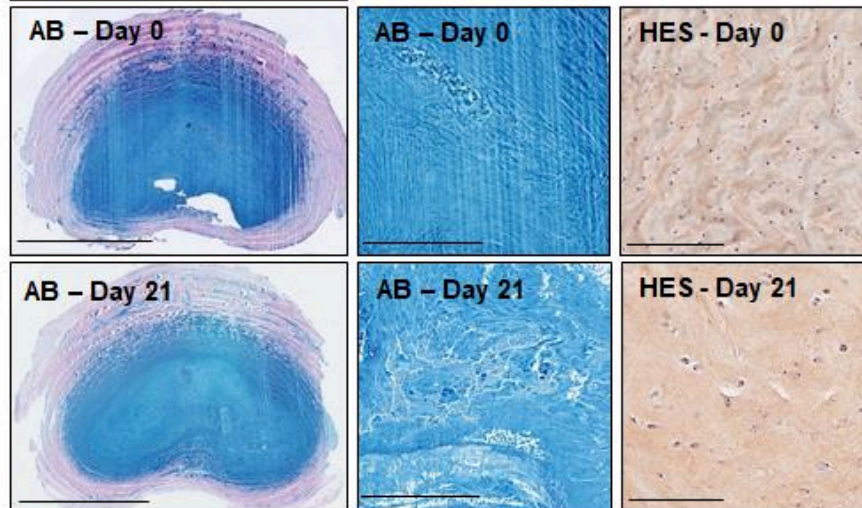
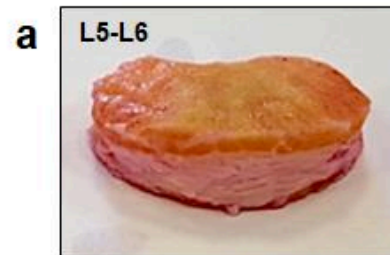
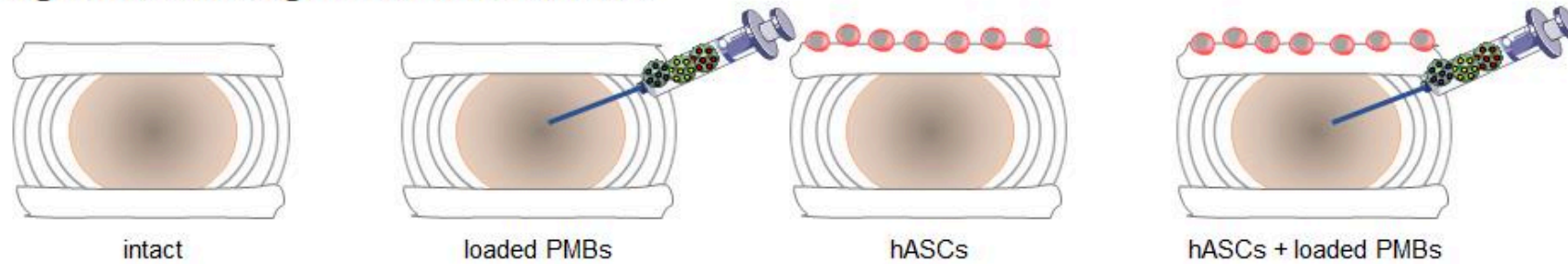


Figure 3. Long-term ex vivo culture of ovine IVDs. (a) Lumbar IVDs (16) were harvested from young sheep, with spine MRI performed immediately post-mortem (Pfirrmann grade 1). IVDs were cultured for up to 21 days, cryo-sectioned and histologically stained with alcian blue (AB) and haematoxylin/eosin/saffron (HES) to analyse ECM content and cell density over time (scale bar 10 mm for the whole IVD section and 2.5 mm for high magnification). (b) IVDs (n=8) were injected with unloaded PMBs (0.8 % w/w in PBS), cryo-sectioned and histologically stained (scale bar 10 mm for the whole IVD section and 2.5 mm for high magnification). Injected PMB observed within the NP tissue at day 0 and day 21 are evidenced with black arrows. (c) Boos score was measured on histologically stained sections of intact (non-injected; n=8 with 2 discs used per time point) and injected IVDs (n=8 with 2 discs used per time point). (d) Cell metabolism in the NP and AF was evaluated with an LDH/EtH assay. Results were expressed as a percentage of the number of metabolically active cells (labelled by LDH) to the total number of cells. Experiments were performed on two IVDs per time point for each condition (non-injected and injected). Abbreviations: IVD: Intervertebral Disc; AB: Alcian Blue; HES: Haematoxylin Eosin Saffron; NP: Nucleus Pulposus; PMBs: Pullulan Microbeads, LDH: Lactate Deshydrogenase; EtH: Ethidium Homodimer.

Aged-related degenerated ovine IVDs



Culture for up to 28 days
Fixation (PFA 4%)
Embedding
Frozen sectioning (7 μ m)

Analysis

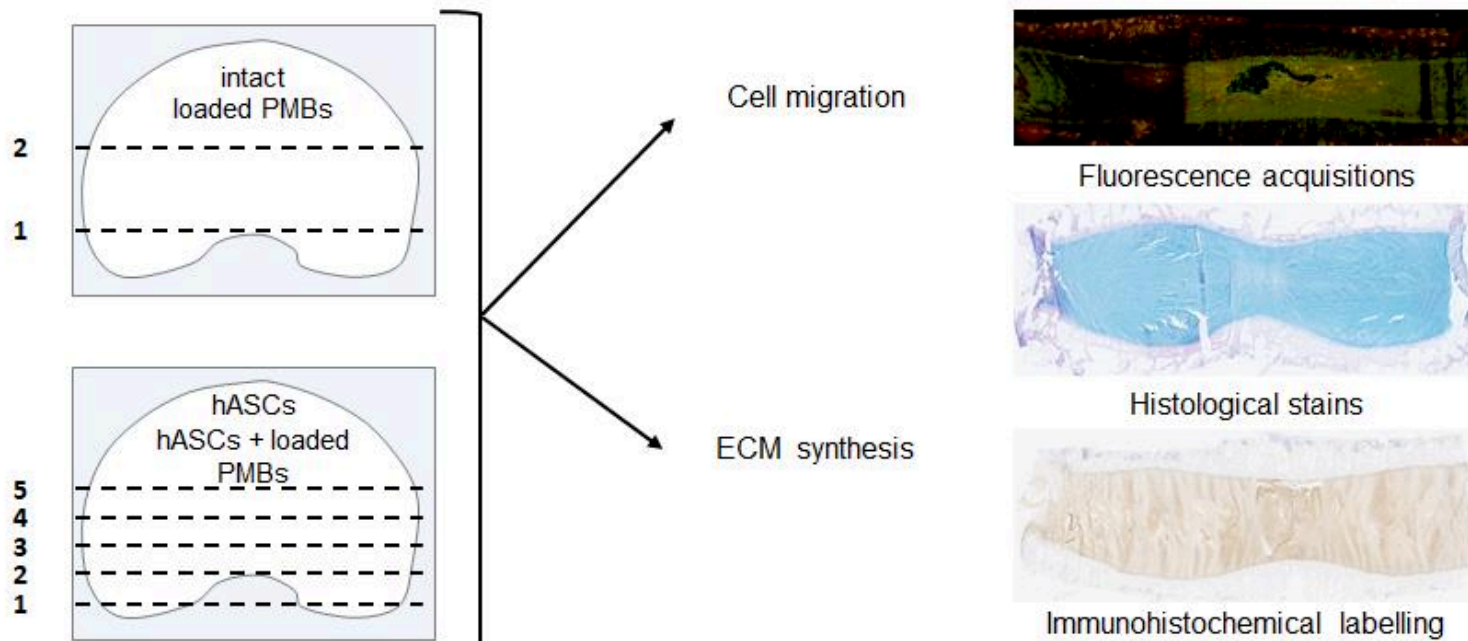


Figure 4. Schematic representation of the experimental design for studying cell migration and disc regeneration. An ex vivo organ culture model was performed by using aged-related degenerated ovine IVDs. Four conditions were evaluated, with 9 intact IVD controls (intact group), 9 IVDs seeded with Vybrant™ Dil labeled human ASCs (hASCs group), 9 IVDs injected with CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs and GDF-5/PMBs (loaded PMBs group) and 9 IVDs seeded with Vybrant™ Dil labelled human ASCs then injected with CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs and GDF-5/PMBs (hASCs + loaded PMBs group). At each time point (3, 7 and 28 days of culture), IVDs were fixed with PFA 4% then frozen sectioned coronally (7 μ m). IVDs non-seeded were cut on 2 levels and IVDs seeded with cells were cut on 5 levels, with 40 sections per level for all IVDs. For migration evaluation, red fluorescent cells were observed using a Nanozoomer® slide scanner. For ECM analysis, slides were histological stained (alcian blue, haematoxylin/eosin/saffron and Masson's trichrome) and immunohistochemical labelled (type I collagen, type II collagen, aggrecan and Tie2). Abbreviations: ASC: Adipose Stem Cells; IVD: intervertebral disc; PMBs: Pullulan Microbeads; CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5; TGF- β 1: Transforming Growth Factor- β 1; GDF-5: Growth Differentiation Factor 5; ECM: extracellular matrix; PFA: paraformaldehyde.

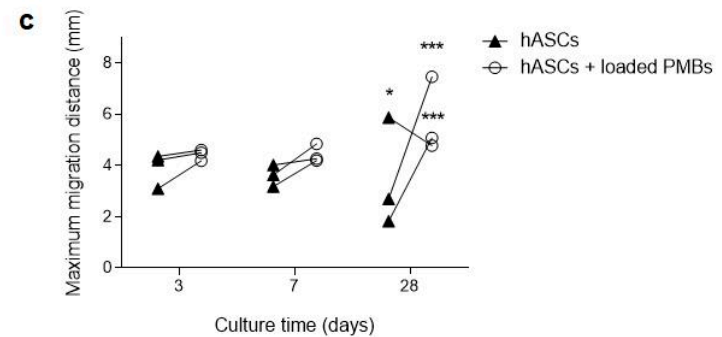
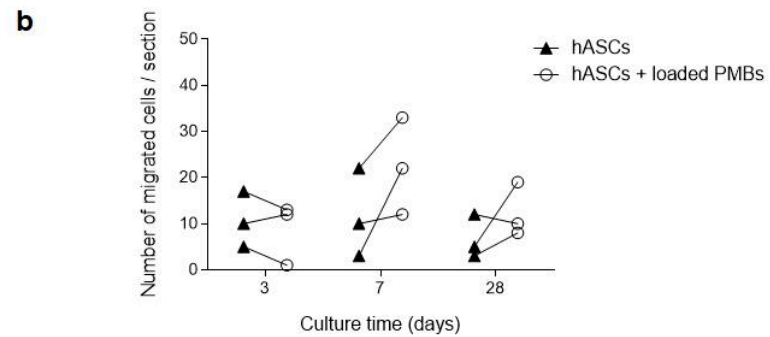
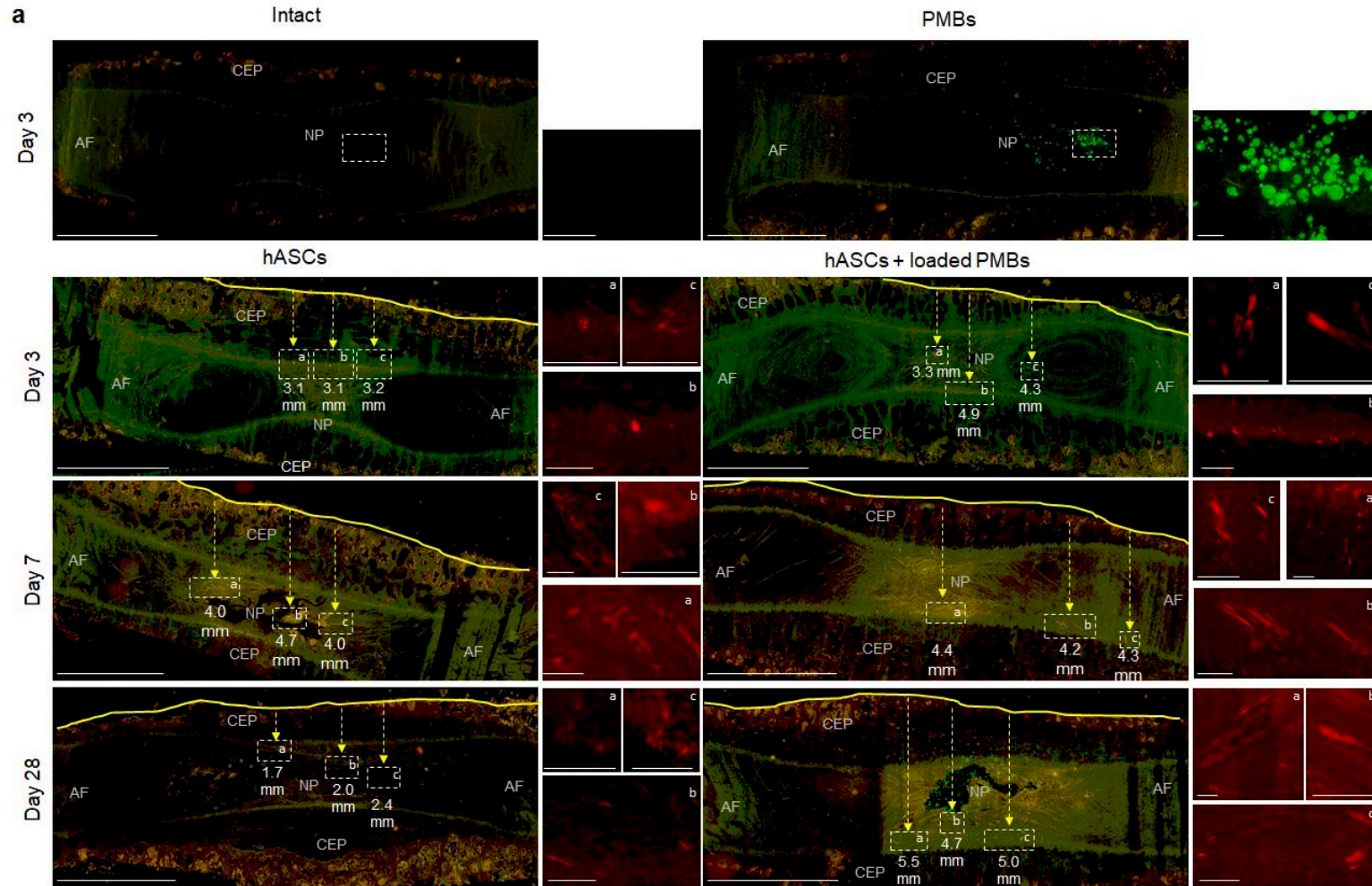


Figure 5. Cell migration in spontaneously degenerated ex vivo ovine IVDs. IVDs (n=36) were isolated from 6 sheep (3-7 years old) presenting moderate lumbar degeneration (Pfirrmann grade 2 or 3). Top cartilaginous endplates were seeded with human ASCs (n=9 discs, donors D, E and G), freshly labelled with Vybrant™ Dil, and loaded PMBs with CCL5, TGF- β 1 and GDF-5 (0.8 % w/w in PBS) were injected via a trans-annular injection in the NP at day 0. Control discs were either only injected with PMBs (n=9 discs), only seeded with human ASCs (n=9 discs), or 9 others kept intact (n=9 discs). After 3, 7 or 28 days of culture, IVDs were fixed with PFA 4% then coronally frozen sectioned (7 μ m). To evaluate cellular migration, red fluorescent cells were observed using a Nanozoomer® slide scanner. (a) Representative fluorescent images of IVD frozen sections at 3 and 28 days. High magnification inserts highlight the migrated red fluorescent cells observed at the greatest distance from their seeding point, with dotted arrows indicating the distance covered by the cells (scale bars: low magnification 5 mm, high magnification 250 μ m). (b) Migrated cells identified in the NP were counted using Image J software. Results are presented as the mean value of the number of migrated cells per section, with 5 sections (each separated from 500 μ m) analysed per disc and per time point. Values from 3 donors are represented. (c) Maximum migration distance from the endplate (highlighted with a yellow line) toward the NP was measured using NDPScan software. For each section, time point and donor, results are presented as the mean value of 3 measurements performed on one section. Abbreviations: ASCs: Adipose Stem Cells; IVD: intervertebral disc; PMBs: Pullulan Microbeads; CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5; TGF- β 1: Transforming Growth Factor- β 1; GDF-5: Growth Differentiation Factor 5; ECM: extracellular matrix; PFA: paraformaldehyde.

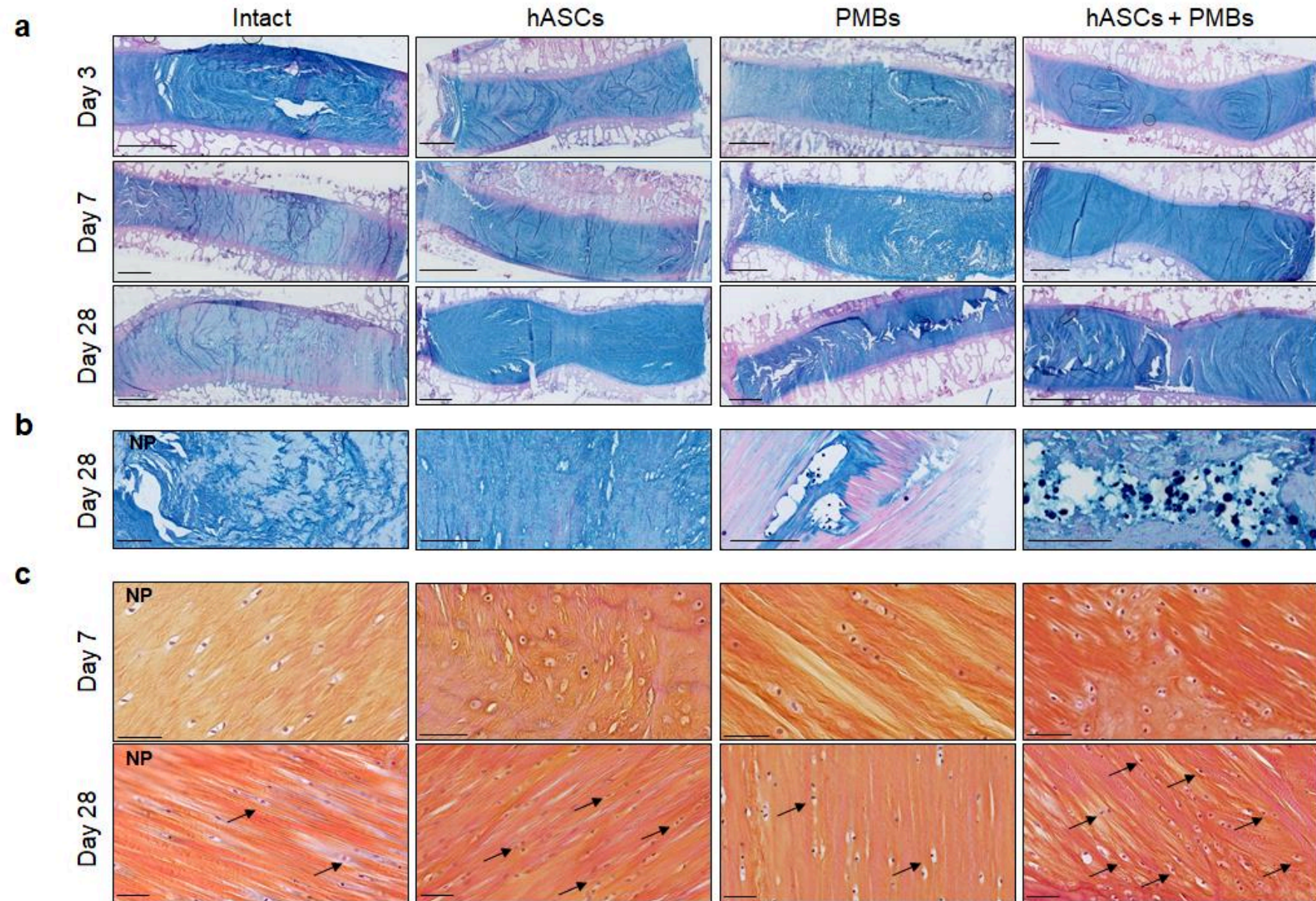


Figure 6: Histological analysis of spontaneously degenerated ex vivo ovine IVDs. Lumbar IVDs (n=36) were harvested from 6 sheep (3-7 years old) presenting moderate lumbar degeneration (Pfirrmann grade 2 or 3). Top cartilaginous endplates were seeded with human ASCs (n=9 discs, donors D, E and G), freshly labelled with Vybrant™ Dil, and loaded PMBs with CCL5, TGF- β 1 and GDF-5 (0.8 % w/w in PBS) were injected via a trans-annular injection in the NP at day 0. Control discs were either only injected with PMBs (n=9 discs), only seeded with human ASCs (n=9 discs), or 9 others kept intact (n=9 discs). Following 3, 7 or 28 days of culture, IVDs were fixed with PFA 4% then coronally frozen sectioned (7 μ m), then histologically stained with alcian blue (AB) and haematoxylin/eosin/saffron (HES) to analyse the ECM content and cell density, respectively, (a) Representative whole IVD sections stained with AB (scale bar 2.5mm). (b) High magnification of AB stained sections with negatively charged PMBs identified as blue dots within the NP tissue at day 28 (scale bar: 500 μ m). (c) High magnification HES stained sections, with cells labelled with black arrows (scale bar 50 μ m). Abbreviations: IVD: Intervertebral Disc; PMBs: ASCs: Adipose Stem Cells; Pullulan Microbeads; CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5; TGF- β 1, Transforming Growth Factor- β 1; GDF-5, Growth Differentiation Factor 5; NP: Nucleus Pulposus; PFA: paraformaldehyde; AB: Alcian Blue; HES: Haematoxylin Eosin Saffron; ECM: extracellular matrix.

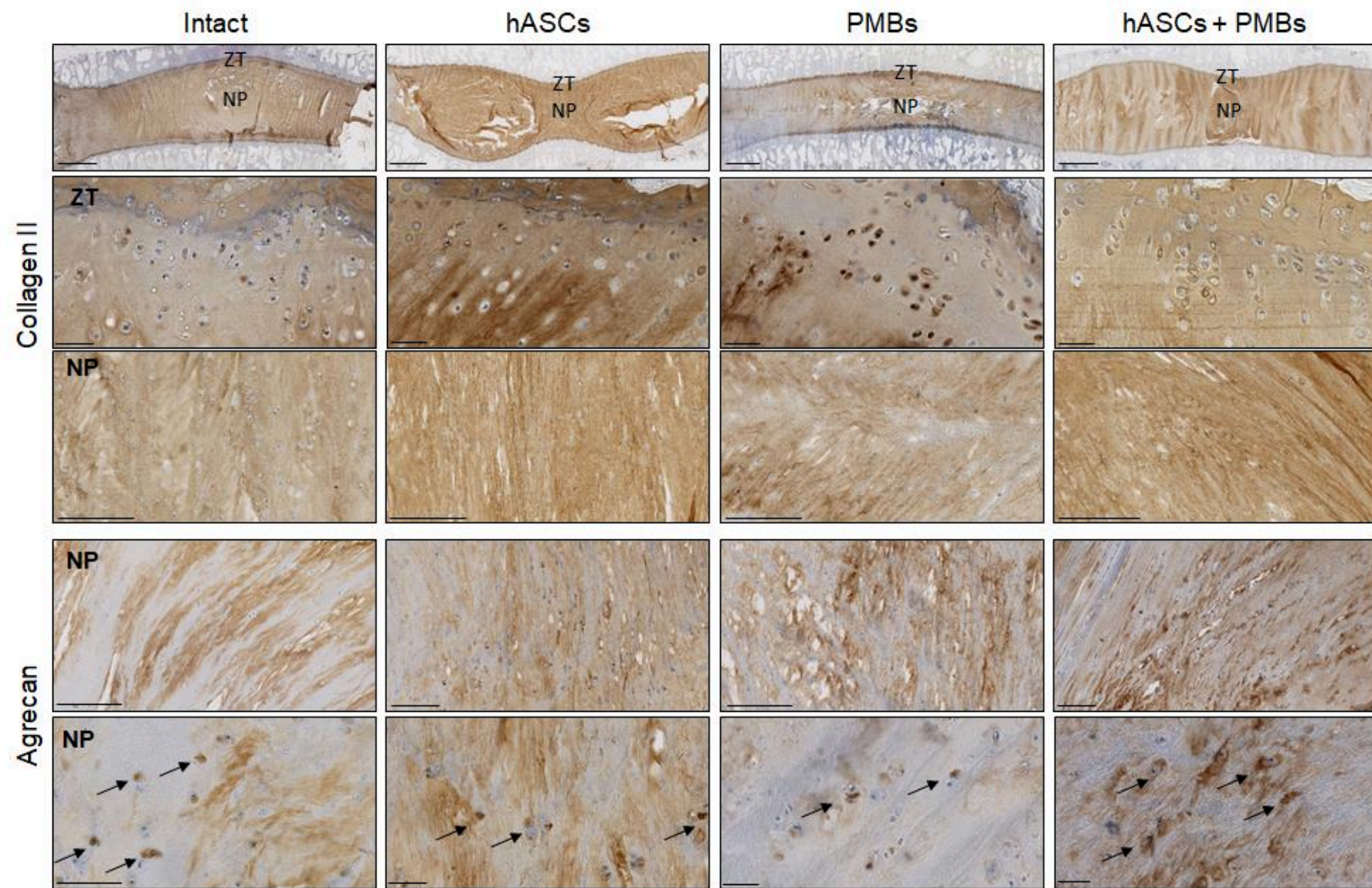


Figure 7. Collagen and aggrecan immunostaining in aged-related degenerated ex vivo ovine IVDs. Lumbar IVDs (n=36) were harvested from 6 sheep (3-7 years old) presenting moderate lumbar degeneration (Pfirrmann grade 2 or 3). Top cartilaginous endplates were seeded with human ASCs (n=9 discs, donors D, E and G), freshly labelled with Vybrant™ Dil, and loaded PMBs with CCL5, TGF- β 1 and GDF-5 (0.8 % w/w in PBS) were injected via a trans-annular injection in the NP at day 0. Control discs were either only injected with PMBs (n=9 discs), only seeded with human ASCs (n=9 discs), or 9 others kept intact (n=9 discs). After 3, 7 or 28 days of culture, IVDs were fixed with PFA 4%, cryo-sectioned coronally (7 μ m), then immunohistologically labelled with type II collagen and aggrecan antibodies. Representative whole IVD sections (day 28) immunolabelled for type II collagen (top row, scale bar 2.5 mm), with high magnifications of TZ (scale bar 50 μ m) and NP regions (scale bar 250 μ m). Representative low (top row, scale bar 250 μ m) and high magnification NP sections (scale bar 50 μ m) (day 28) immunolabelled for aggrecan. Abbreviations: IVD: Intervertebral Disc; PMBs: Adipose Stem Cells; Pullulan Microbeads; NP: Nucleus Pulposus; TZ: transitional zone; PFA: paraformaldehyde; ECM: extracellular matrix.

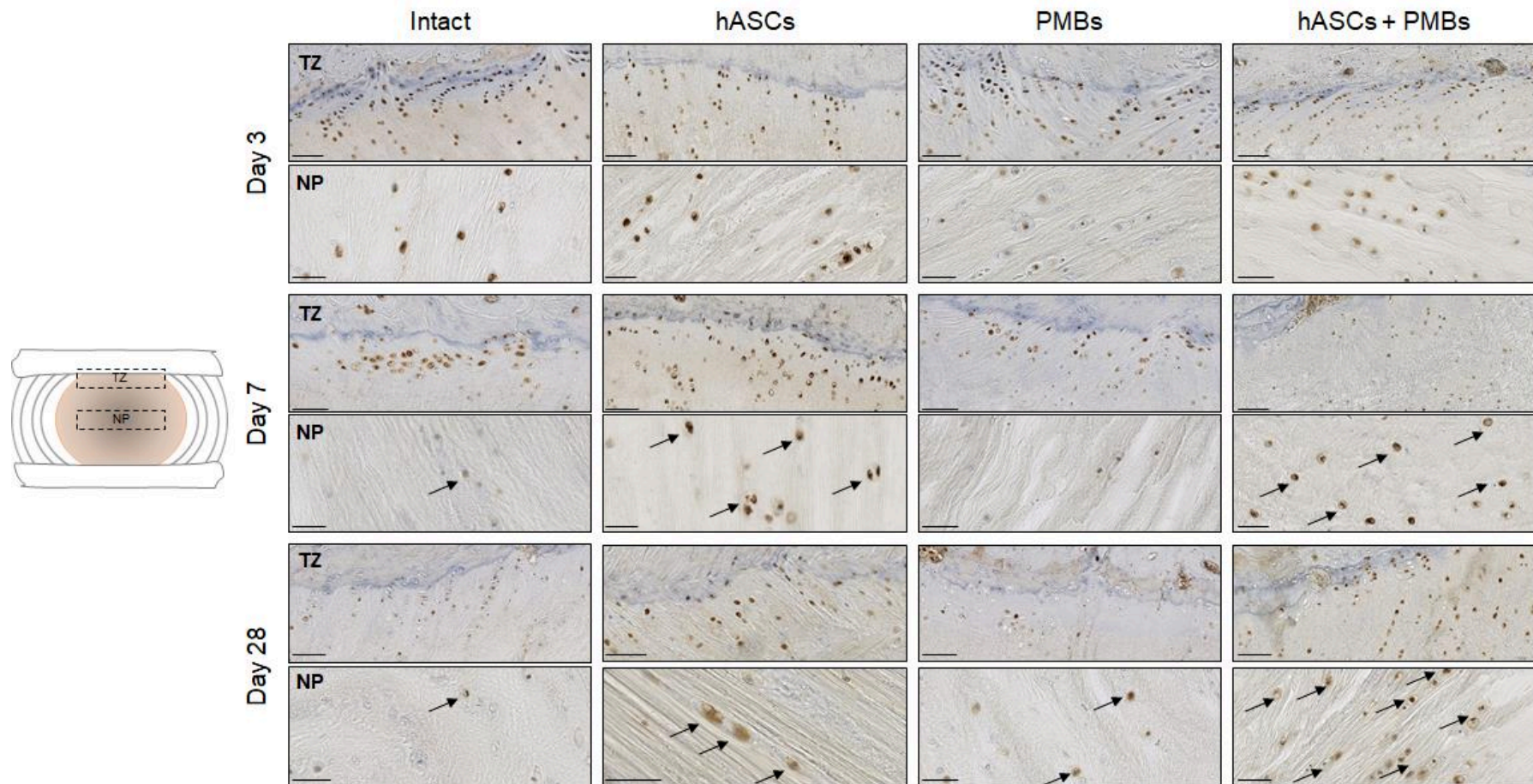


Figure 8. Tie2⁺ cells immunostaining in in aged-related degenerated ex vivo ovine IVDs. Lumbar IVDs (n=36) were harvested from 6 sheep (3-7 years old) presenting moderate lumbar degeneration (Pfirrmann grade 2 or 3). Top cartilaginous endplates were seeded with human ASCs (n=9 discs, donors D, E and G), freshly labelled with VybrantTM Dil, and loaded PMBs with CCL5, TGF- β 1 and GDF-5 (0.8 % w/w in PBS) were injected via a trans-annular injection in the NP at day 0. Control discs were either only injected with PMBs (n=9 discs), only seeded with human ASCs (n=9 discs), or 9 others kept intact (n=9 discs). After 3, 7 or 28 days of culture, IVDs were fixed with PFA 4%, cryo-sectioned coronally (7 μ m), then immunohistologically labelled with Tie2 antibodies. Representative images of the transitional zone between CEPs and NP (TZ, scale bar

100 μm) and the central NP region (NP, scale bar 50 μm) within the same IVD section, for each group at day 3, 7 and 28. Abbreviations: IVD: Intervertebral Disc; PMBs: ASCs: Adipose Stem Cells; Pullulan Microbeads; TZ: transitional zone; NP: Nucleus Pulposus; PFA: paraformaldehyde; ECM: extracellular matrix.

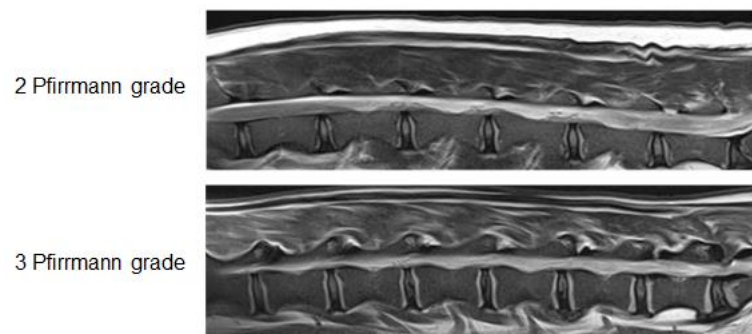


Figure S1. Representative MRIs of ovine spines used for the spontaneous IVD degeneration ex vivo model.

Table S1: Human donor information.

Donor	Age	Sex	Experiments
A	42	Femme	In vitro migration analysis
B	57	Femme	In vitro migration analysis
C	64	Femme	In vitro migration analysis
D	51	Femme	In vitro migration analysis, ex vivo model
E	45	Femme	In vitro migration analysis, ex vivo model
F	33	Femme	In vitro migration analysis
G	45	Femme	In vitro migration, ex vivo model

REFERENCES

- [1] Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abdulkader RS, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32130-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32130-X).
- [2] Hoy D, March L, Brooks P, Blyth F, Woolf A, Bain C, et al. The global burden of low back pain: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 2014. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204428>.
- [3] Andersson GBJ. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet* 1999;354:581–5. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01312-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01312-4).
- [4] Manchikanti L, Singh V, Datta S, Cohen SP, Hirsch J a. Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain. *Pain Physician* 2009;12:E35–70. <https://doi.org/10.1016/j.jmpt.2008.08.003>.
- [5] Huang YC, Urban JPG, Luk KDK. Intervertebral disc regeneration: Do nutrients lead the way? *Nat Rev Rheumatol* 2014. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.91>.
- [6] Vergroesen PPA, Kingma I, Emanuel KS, Hoogendoorn RJW, Welting TJ, van Royen BJ, et al. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: A vicious circle. *Osteoarthr Cartil* 2015;23:1057–70. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.028>.
- [7] Adams MA, Roughley PJ. What is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It? *Spine (Phila Pa 1976)* 2006;31:2151–61. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c>.
- [8] Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology* 2009;48:5–10. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken396>.
- [9] Walker MH, Anderson DG. Molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2004. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2004.07.010>.
- [10] Ma K, Chen S, Li Z, Deng X, Huang D, Xiong L, et al. Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthr Cartil* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.08.021>.
- [11] 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. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.017>.
- [12] 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* 2018;36:281–94. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.009>.
- [13] Sakai D, Andersson GBJ. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: Obstacles and solutions.

Nat Rev Rheumatol 2015;11:243–56. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.13>.

- [14] Schol J, Sakai D. Cell therapy for intervertebral disc herniation and degenerative disc disease: clinical trials. *Int Orthop* 2019. <https://doi.org/10.1007/s00264-018-4223-1>.
- [15] Clarke LE, McConnell JC, Sherratt MJ, Derby B, Richardson SM, Hoyland JA. Growth differentiation factor 6 and transforming growth factor-beta differentially mediate mesenchymal stem cell differentiation, composition, and micromechanical properties of nucleus pulposus constructs. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R67. <https://doi.org/10.1186/ar4505>.
- [16] Xia K, Zhu J, Hua J, Gong Z, Yu C, Zhou X, et al. Intradiscal Injection of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Nucleus Pulposus-Like Cell-Seeded Polymeric Microspheres Promotes Rat Disc Regeneration. *Stem Cells Int* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6806540>.
- [17] Vadalà G, Studer RK, Sowa G, Spiezia F, Iucu C, Denaro V, et al. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31816b4619>.
- [18] Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, Nakai T, Nishimura K, Kawada H, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: Significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004. <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000131416.90906.20>.
- [19] Liang C, Li H, Tao Y, Zhou X, Li F, Chen G, et al. Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc. *J Transl Med* 2012. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-49>.
- [20] Sakai D, Grad S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.009>.
- [21] Vadalà G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: Cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med* 2012. <https://doi.org/10.1002/term.433>.
- [22] Henriksson HB, Svanvik T, Jonsson M, Hagman M, Horn M, Lindahl A, et al. Transplantation of Human Mesenchymal Stems Cells Into Intervertebral Discs in a Xenogeneic Porcine Model. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009;34:141–8. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31818f8c20>.
- [23] Brisby H, Papadimitriou N, Brantsing C, Bergh P, Lindahl A, Barreto Henriksson H. The Presence of Local Mesenchymal Progenitor Cells in Human Degenerated Intervertebral Discs and Possibilities to Influence These In Vitro: A Descriptive Study in Humans. *Stem Cells Dev* 2013;22:804–14. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0179>.
- [24] Risbud M V., Guttapalli A, Tsai T-T, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR, et al. Evidence for Skeletal Progenitor Cells in the Degenerate Human Intervertebral Disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007;32:2537–44.

<https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318158dea6>.

- [25] Henriksson HB, 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. *Spine (Phila Pa 1976)* 2012;37:722–32. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318231c2f7>.
- [26] Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, Muntión S, Hernandez-Campo P, Santamaria C, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010;35:2259–65. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181cb8828>.
- [27] Gruber HE, Riley FE, Hoelscher GL, Ingram JA, Bullock L, Hanley EN. Human annulus progenitor cells: Analyses of this viable endogenous cell population. *J Orthop Res* 2016;34:1351–60. <https://doi.org/10.1002/jor.23319>.
- [28] Li X-C, Tang Y, Wu J-H, Yang P-S, Wang D-L, Ruan D-K. Characteristics and potentials of stem cells derived from human degenerated nucleus pulposus: potential for regeneration of the intervertebral disc. *BMC Musculoskelet Disord* 2017;18:242. <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1567-4>.
- [29] Wang H, Zhou Y, Chu TW, Li CQ, Wang J, Zhang ZF, et al. Distinguishing characteristics of stem cells derived from different anatomical regions of human degenerated intervertebral discs. *Eur Spine J* 2016;25:2691–704. <https://doi.org/10.1007/s00586-016-4522-4>.
- [30] Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Mishima T, Kato S, Grad S, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat Commun* 2012;3:1264. <https://doi.org/10.1038/ncomms2226>.
- [31] Vanden Berg-Foels WS. In situ tissue regeneration: chemoattractants for endogenous stem cell recruitment. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20:28–39. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2013.0100>.
- [32] Illien-Jünger S, Pattappa G, Peroglio M, Benneker LM, Stoddart MJ, Sakai D, et al. Homing of Mesenchymal Stem Cells in Induced Degenerative Intervertebral Discs in a Whole Organ Culture System. *Spine (Phila Pa 1976)* 2012;37:1865–73. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182544a8a>.
- [33] Pattappa G, Peroglio M, Sakai D, Mochida J, Benneker LM, Alini M, et al. CCL5/rantes is a key chemoattractant released by degenerative intervertebral discs in organ culture. *Eur Cells Mater* 2014. <https://doi.org/10.22203/eCM.v027a10>.
- [34] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 2006;24:1030–41. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0319>.
- [35] Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, et al. The In Vitro Migration Capacity of

- Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Comparison of Chemokine and Growth Factor Chemotactic Activities. *Stem Cells* 2007. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0054>.
- [36] Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, Bethea S, Norton HJ, Hanley EN. Production and expression of RANTES (CCL5) by human disc cells and modulation by IL-1- β and TNF- α in 3D culture. *Exp Mol Pathol* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.01.002>.
- [37] Wangler S, Menzel U, Li Z, Ma J, Hoppe S, Benneker LM, et al. CD146/MCAM distinguishes stem cell subpopulations with distinct migration and regenerative potential in degenerative intervertebral discs. *Osteoarthr Cartil* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.04.002>.
- [38] Ahn SH, Cho YW, Ahn MW, Jang SH, Sohn YK, Kim HS. mRNA expression of cytokines and chemokines in herniated lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 2002. <https://doi.org/10.1097/00007632-200205010-00005>.
- [39] Grad S, Bow C, Karppinen J, Luk KDK, Cheung KMC, Alini M, et al. Systemic blood plasma CCL5 and CXCL6: Potential biomarkers for human lumbar disc degeneration. *Eur Cells Mater* 2016. <https://doi.org/10.22203/eCM.v031a01>.
- [40] Kepler CK, Markova DZ, Dibra F, Yadla S, Vaccaro AR, Risbud M V., et al. Expression and relationship of proinflammatory chemokine RANTES/CCL5 and cytokine IL-1 β in painful human intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 2013. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318285ae08>.
- [41] Baffi MO, Moran MA, Serra R. Tgfr2 regulates the maintenance of boundaries in the axial skeleton. *Dev Biol* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.002>.
- [42] Chujo T, An HS, Akeda K, Miyamoto K, Muehleman C, Attawia M, et al. Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc - In vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006;31:2909–17. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000248428.22823.86>.
- [43] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression of cartilage-derived morphogenetic protein in human intervertebral discs and its effect on matrix synthesis in degenerate human nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther* 2009. <https://doi.org/10.1186/ar2808>.
- [44] Park JY, Yoon YS, Park HS, Kuh SU. Molecular response of human cervical and lumbar nucleus pulposus cells from degenerated discs following cytokine treatment. *Genet Mol Res* 2013. <https://doi.org/10.4238/2013.March.15.4>.
- [45] Merceron C, Portron S, Vignes-Colombeix C, Rederstorff E, Masson M, Lesoeur J, et al. Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: Potential application to cartilage regenerative medicine. *Stem Cells* 2012. <https://doi.org/10.1002/stem.1686>.
- [46] Colombier P, Clouet J, Boyer C, Ruel M, Bonin G, Lesoeur J, et al. TGF- β 1 and GDF5 act synergistically

- to drive the differentiation of human adipose stromal cells toward nucleus pulposus-like cells. *Stem Cells* 2016;34:653–67. <https://doi.org/10.1002/stem.2249>.
- [47] Blanquer SBG, Grijpma DW, Poot AA. Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;84:172–87. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.024>.
 - [48] Fléreau K, Pace R, Gautier H, Rethore G, Guicheux J, Le Visage C, et al. Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine. *Adv Colloid Interface Sci* 2017;247:589–609. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.012>.
 - [49] Henry N, Clouet J, Fragale A, Griveau L, Chédeville C, Véziers J, et al. Pullulan microbeads/Si-HPMC hydrogel injectable system for the sustained delivery of GDF-5 and TGF- β 1: new insight into intervertebral disc regenerative medicine. *Drug Deliv* 2017;24:999–1010. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1340362>.
 - [50] Suffee N, Le Visage C, Hlawaty H, Aid-Launais R, Vanneaux V, Larghero J, et al. Pro-Angiogenic effect of RANTES-loaded polysaccharide-based microparticles for a mouse ischemia therapy. *Sci Rep* 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13444-7>.
 - [51] Leathers TD. MINI-REVIEW Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1386-4>.
 - [52] Shingel KI. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydr Res* 2004;339:447–60. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.034>.
 - [53] Cheng KC, Demirci A, Catchmark JM. Pullulan: Biosynthesis, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;92:29–44. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3477-y>.
 - [54] Pereira CL, Gonçalves RM, Peroglio M, Pattappa G, D'Este M, Eglin D, et al. The effect of hyaluronan-based delivery of stromal cell-derived factor-1 on the recruitment of MSCs in degenerating intervertebral discs. *Biomaterials* 2014;35:8144–53. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.017>.
 - [55] Pereira CL, Teixeira GQ, Ribeiro-Machado C, Caldeira J, Costa M, Figueiredo F, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells seeded on cartilaginous endplates promote Intervertebral Disc Regeneration through Extracellular Matrix Remodeling. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep33836>.
 - [56] Pereira CL, Quelhas Teixeira G, Rita Ferreira J, D'Este M, Eglin D, Alini M, et al. Stromal Cell Derived Factor-1-Mediated Migration of Mesenchymal Stem Cells Enhances Collagen Type II Expression in Intervertebral Disc. *Tissue Eng Part A* 2018. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0131>.
 - [57] Purnama A, Aid-Launais R, Haddad O, Maire M, Mantovani D, Letourneur D, et al. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv Transl Res* 2015;5:187–97. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0177-4>.

- [58] Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* 2010;5:1294–311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.81>.
- [59] Le Fournier L, Fusellier M, Halgand B, Lesoeur J, Gauthier O, Menei P, et al. The transpedicular surgical approach for the development of intervertebral disc targeting regenerative strategies in an ovine model. *Eur Spine J* 2017. <https://doi.org/10.1007/s00586-017-5199-z>.
- [60] Pfirrmann CWA, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001;26:1873–8. <https://doi.org/10.1097/00007632-200109010-00011>.
- [61] Illien-Junger S, Pattappa G, Peroglio M, Benneker LM, Stoddart MJ, Sakai D, et al. Homing of mesenchymal stem cells in induced degenerative intervertebral discs in a whole organ culture system. *Spine (Phila Pa 1976)* 2012;37:1865–73. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182544a8a>.
- [62] Henriksson H, Thornemo M, Karlsson C, Hägg O, Junevik K, Lindahl A, et al. Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and a potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009;34:2278–87. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181a95ad2>.
- [63] Fragkakis EM, El-Jawhari JJ, Dunsmuir RA, Millner PA, Rao AS, Henshaw KT, et al. Vertebral body versus iliac crest bone marrow as a source of multipotential stromal cells: Comparison of processing techniques, tri-lineage differentiation and application on a scaffold for spine fusion. *PLoS One* 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197969>.
- [64] Henriksson HB, Hagman M, Horn M, Lindahl A, Brisby H. Investigation of different cell types and gel carriers for cell-based intervertebral disc therapy, in vitro and in vivo studies. *J Tissue Eng Regen Med* 2012. <https://doi.org/10.1002/term.480>.
- [65] Henriksson HB, Papadimitriou N, Tschernitz S, Svala E, Skioldebrand E, Windahl S, et al. Indications of that migration of stem cells is influenced by the extra cellular matrix architecture in the mammalian intervertebral disk region. *Tissue Cell* 2015;47:439–55. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.08.001>.
- [66] Liu C, Guo Q, Li J, Wang S, Wang Y, Li B, et al. Identification of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108239>.
- [67] Liu S, Liang H, Lee SM, Li Z, Zhang J, Fei Q. Isolation and identification of stem cells from degenerated human intervertebral discs and their migration characteristics. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2017. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw121>.
- [68] Frapin L, Clouet J, Delplace V, Fusellier M, Guicheux J, Le Visage C. Lessons learned from intervertebral disc pathophysiology to guide rational design of sequential delivery systems for therapeutic biological factors. *Adv Drug Deliv Rev* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.08.007>.
- [69] Kepler CK, Ponnappan RK, Tannoury CA, Risbud M V., Anderson DG. The molecular basis of intervertebral

- disc degeneration. *Spine J* 2013;13:318–30. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2012.12.003>.
- [70] Wang WJ, Yu XH, Wang C, Yang W, He WS, Zhang SJ, et al. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin Chim Acta* 2015;448:238–46. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.06.023>.
- [71] Tran CM, Schoepflin ZR, Markova DZ, Kepler CK, Anderson DG, Shapiro IM, et al. CCN2 suppresses catabolic effects of interleukin-1beta through alpha5beta1 and alphaVbeta3 integrins in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration. *J Biol Chem* 2014;289:7374–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.526111>.
- [72] Wu H, Shang Y, Yu J, Zeng X, Lin J, Tu M, et al. Regenerative potential of human nucleus pulposus resident stem/progenitor cells declines with ageing and intervertebral disc degeneration. *Int J Mol Med* 2018. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3766>.
- [73] Alini M, Eisenstein SM, Ito K, Little C, Kettler AA, Masuda K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur Spine J* 2008. <https://doi.org/10.1007/s00586-007-0414-y>.
- [74] Nisolle JF, Bihin B, Kirschvink N, Neveu F, Clegg P, Dugdale A, et al. Prevalence of age-related changes in ovine lumbar intervertebral discs during computed tomography and magnetic resonance imaging. *Comp Med* 2016.
- [75] Tekari A, Chan SCW, Sakai D, Grad S, Gantenbein B. Angiopoietin-1 receptor Tie2 distinguishes multipotent differentiation capability in bovine coccygeal nucleus pulposus cells. *Stem Cell Res Ther* 2016. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0337-9>.
- [76] Sakai D, Schol J, Bach FC, Tekari A, Sagawa N, Nakamura Y, et al. Successful fishing for nucleus pulposus progenitor cells of the intervertebral disc across species. *JOR SPINE* 2018. <https://doi.org/10.1002/jsp2.1018>.
- [77] Gruber HE, Ingram JA, Norton HJ, Hanley EN. Senescence in Cells of the Aging and Degenerating Intervertebral Disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000253960.57051.de>.
- [78] Johnson WEB, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connect Tissue Res* 2001. <https://doi.org/10.3109/03008200109005650>.
- [79] Mohammadi E, Nassiri SM, Rahbarghazi R, Siavashi V, Araghi A. Endothelial juxtaposition of distinct adult stem cells activates angiogenesis signaling molecules in endothelial cells. *Cell Tissue Res* 2015. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2228-2>.
- [80] Navarro A, Marín S, Riol N, Carbonell-Uberos F, Miñana MD. Human adipose tissue-resident monocytes exhibit an endothelial-like phenotype and display angiogenic properties. *Stem Cell Res Ther* 2014. <https://doi.org/10.1186/scrt438>.

- [81] Vadalà G, Russo F, Pattappa G, Schiuma D, Peroglio M, Benneker LM, et al. The transpedicular approach as an alternative route for intervertebral disc regeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2013. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318285bc4a>.

PARTIE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La dégénérescence discale est responsable de 40% des cas de lombalgies chroniques, et constitue un véritable problème de santé publique avec une prise en charge coûteuse et des arrêts de travail fréquents chez les patients. Les traitements actuels des lombalgies discogéniques restent centrés sur le soulagement des douleurs ressenties par les patients et non pas sur la restauration structurelle et fonctionnelle du tissu discal. Malgré une efficacité à court terme, les approches pharmacologiques et chirurgicales actuelles présentent des limites non négligeables dues aux effets secondaires des molécules pharmacologiques administrées au long court ou encore au caractère invasif des interventions chirurgicales. De plus, ces dernières peuvent entraîner des risques de dégénérescence des étages discaux adjacents. Avec l'amélioration ces dernières années des connaissances relatives à la physiologie et physiopathologie discale, la communauté scientifique se tourne désormais davantage vers de nouvelles stratégies à visée non plus seulement symptomatique, mais également régénératrice, afin de réparer le tissu dans son intégrité. Ces thérapies innovantes se basent sur des approches cellulaire, moléculaire ou encore génique pouvant être combinées ou non à un biomatériau. L'association à un biomatériau représente un avantage certain afin de protéger les cellules, la protéine ou le gène thérapeutique lors de l'injection mais également pour sa survie *in vivo* dans un environnement aussi hostile que celui du DIV dégénéré. De nombreuses approches d'ingénierie tissulaire font aujourd'hui l'objet d'études en vue d'une régénérescence discale. Le Noyau pulpeux, élément central du DIV, est généralement le premier touché lors d'une DDL. Il subit alors des atteintes qualitatives et quantitatives au niveau cellulaire et matriciel, engendrant une perte de ses propriétés mécaniques, pouvant se répercuter par la suite au niveau de l'Anneau fibreux qui l'entoure. Ainsi, l'idée de restaurer ce NP à des stades de DDL précoce et modérée apparaît comme une stratégie prometteuse. Ainsi, une re-cellularisation de celui-ci, suivis d'une synthèse de MEC saine, permettrait le rétablissement des capacités de résistance aux contraintes mécaniques grâce à la restauration des activités biologiques du DIV. Par conséquent, la thérapie cellulaire a été largement étudiée ces dernières années, avec l'espoir qu'une injection intradiscale de CSM exogènes, associées ou non à des facteurs biologiques mais également éventuellement à un biomatériau, permettrait de relancer la machinerie anabolique, stopper les cascades cataboliques et ainsi diminuer voire même stopper la progression de la dégénérescence. Malgré les résultats encourageants de ces approches, celles-ci peinent à trouver leur place dans l'arsenal thérapeutique proposé aux patients. Ceci en raison notamment de certaines

limites qui leurs sont associées. Effectivement, l'injection *in situ* de cellules exogènes est associée à des contraintes techniques et réglementaires non négligeables, du fait des nécessités de culture *in vitro* préalable à l'injection. Associée à ces inconvénients, la faible survie des cellules injectées au sein du microenvironnement discal hostile limite leurs effets thérapeutiques. L'injection d'une quantité importante de cellules par rapport à la cellularité initiale du NP sain est ainsi nécessaire. Une fuite par reflux post-injection représente également un inconvénient pouvant amener à la formation d'ostéophytes (Vadalà et al. 2012). Ces dernières années, la découverte de cellules souches / progénitrices existantes au sein du tissu discal sain et dégénéré de plusieurs mammifères (lapin, souris, rat, cochon) et chez l'humain, ouvre la voie à de nouvelles stratégies de régénérescence endogène du DIV (H. Henriksson et al. 2009; Brisby et al. 2013). Ces approches thérapeutiques innovantes permettraient alors de s'affranchir des limites liées à l'apport de cellules souches exogènes en utilisant les cellules souches / progénitrices endogènes déjà présentes au sein du tissu et donc adaptées au microenvironnement complexe du DIV (hypoxie, faible apport en nutriments, forte pression osmotique). Depuis leur découverte, ces cellules souches discales ont été caractérisées et leurs similitudes phénotypiques avec des cellules souches de type mésenchymateuses ont été reportées (Risbud et al. 2007; Blanco et al. 2010). De manière intéressante, ces cellules souches discales sont retrouvées dans les différentes régions du DIV (PC, AF et NP). A la suite de cette constatation, l'hypothèse de leur capacité de migration au sein du tissu discal depuis des niches de cellules souches localisées au niveau des PC et à la périphérie du DIV a été émise (H. B. Henriksson et al. 2012). Par ailleurs, des études comparatives ont démontré que ces cellules souches discales présentaient des propriétés différentes de migration selon leurs localisations (PC, AF ou NP). Ainsi, les cellules souches des PC ont des capacités de migration supérieures, par rapport aux autres cellules souches discales (AF et NP). De plus, d'autres études ont quant à elles, décrit une surexpression de chimiokines dans des modèles *ex vivo* de DIV mis en conditions dégénératives (faible apport nutritif combiné à des contraintes mécaniques intenses et fréquentes). L'ensemble de ces données permet alors de renforcer l'hypothèse d'une potentielle migration cellulaire au sein du DIV (H. Wang et al. 2016; S. Liu et al. 2017; C. Liu et al. 2014; G. Pattappa et al. 2014). En parallèle, la présence de cellules progénitrices Tie2 positives au niveau des NP de DIV humains et de souris a également été décrite. Leur densité diminuerait néanmoins au cours du vieillissement et de la dégénérescence discale (Sakai et al. 2012). L'ensemble de ces éléments suggère ainsi

l'existence de processus de réparation naturelle se déroulant au sein du DIV, mais qui restent néanmoins insuffisants pour induire une régénérescence complète du tissu et contrer au long terme les mécanismes de dégénérescence discale (Ma et al. 2018).

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse, avec pour objectif principal de stimuler une réparation endogène du DIV tout en évitant l'apport de cellules exogènes. Le challenge principal de ce type d'approches innovantes relève donc de la nécessité de recruter les cellules souches discales des PC (où elles sont le plus abondantes), vers le NP dégénéré (structure centrale et particulièrement décellularisé au cours d'une DD). Ce recrutement cellulaire permettrait alors de repeupler le NP. Il semble ensuite nécessaire de stimuler localement les activités anaboliques des cellules recrutées pour guider la synthèse d'une nouvelle MEC saine. Comme précédemment décrit, la dégénérescence discale entraîne un dérèglement complexe de la balance anabolisme/catabolisme impliquant une multitude d'éléments inflammatoires, pro-cataboliques et apoptotiques agissant comme un cercle vicieux qui combine trois éléments principaux : i) inflammation et catabolisme, ii) atteintes cellulaires et iii) pertes des fonctions anaboliques et dégradation matricielle. Ainsi, afin de mettre en place une stratégie robuste de régénérescence du DIV, la prise en compte de ces trois éléments semble primordiale (Frapin et al. 2019). De plus la considération du stade de dégénérescence est un paramètre important. Afin d'agir sur ces 3 composantes principales de la dégénérescence discale tout en évitant la répétition des injections intradiscales, le recours à un système de libération séquentielle d'agents biologiques est alors obligatoire. En effet il semble raisonnable d'agir de manière successive sur ces mécanismes, notamment en ce qui concerne l'apport de cellules biologiquement actives au niveau du NP et la stimulation de leurs activités de synthèse, en vue d'une nouvelle matrice extracellulaire saine. La libération de facteurs anaboliques sans recrutement ou apport de cellules métaboliquement actives au préalable pourrait s'avérer insuffisante en raison de la très faible densité cellulaire d'un NP dégénéré et de la perte des fonctions anaboliques des cellules encore présentes.

Dans ce travail de thèse, nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'un système injectable de libération séquentielle de facteurs biologiques composé de chimiokines et de facteurs de croissance permettrait de stimuler et guider une réparation endogène du DIV et ainsi contrer les processus de dégénérescence. Cette stratégie endogène vise les cas de DD précoces et modérées avec une activité inflammatoire moindre et s'articule en deux temps : i) recruter les cellules souches discales des PC vers le NP, grâce à la libération de chimiokines, puis ii) stimuler

et orienter la synthèse par ces cellules discales recrutées d'une nouvelle MEC de type nucléopulpogénique.

A cette fin, nous avons étudié l'association de microparticules de pullulane (PMBs) avec les chimiokines CXCL12 et CCL5 et les facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5. Les analyses d'adsorption et de libération du TGF- β 1 et du GDF-5 ont d'ores et déjà fait l'objet d'une précédente étude (Henry et al. 2017), qui avait démontré une efficacité d'adsorption de 100% pour les deux facteurs de croissance, ainsi qu'une libération prolongée jusqu'à 21 jours *in vitro*. Deux profils de libération avaient également été mis en évidence, en accord avec les masses moléculaires de ces deux facteurs, à savoir 25kDa pour le TGF- β 1 et 13kDa pour le GDF-5. Une libération de 27% pour le TGF- β 1 et de 100% pour le GDF-5 avait été observée, à 21 jours, pour une concentration initiale d'absorption de 4 μ g/ml. Dans cette présente étude, nous avons exploré, dans des conditions identiques, l'adsorption et la libération des deux chimiokines CXCL12 et CCL5 sur une durée de 21 jours également, à 37°C (Figure 18).

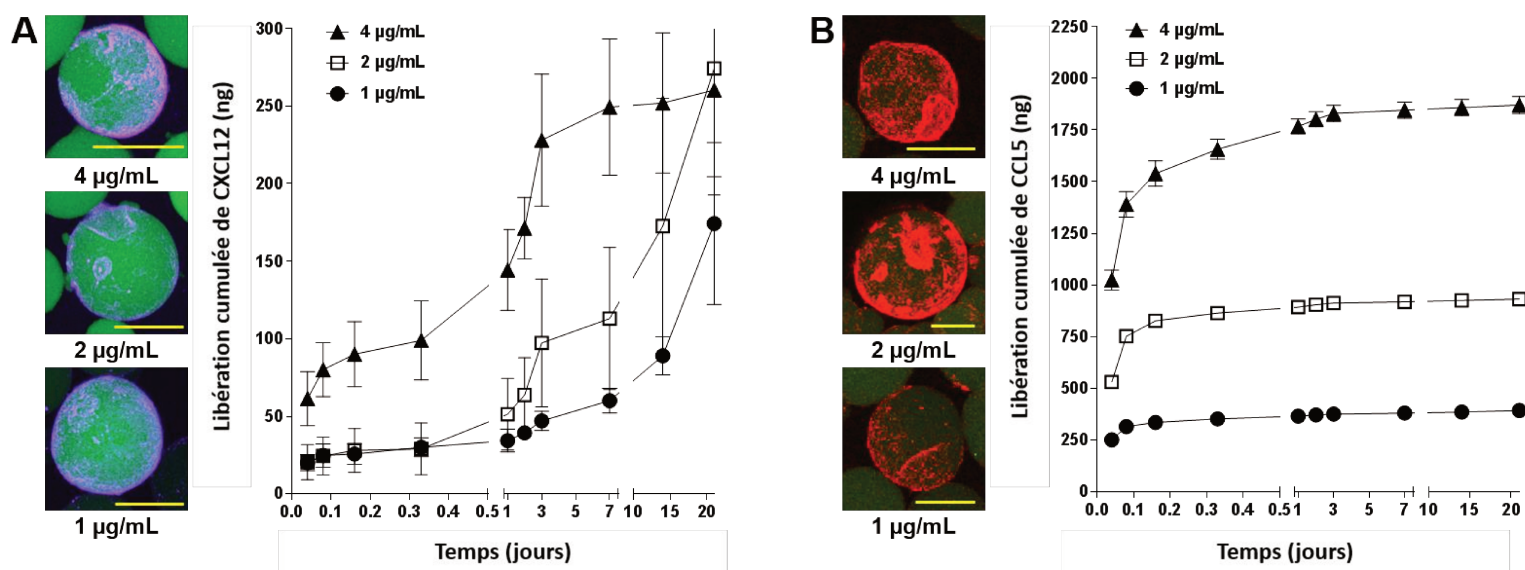


Figure 18 : Adsorption et profils de libération des chimiokines CXCL12 et CCL5 des microbilles de pullulane.

Les PMBs sont chargées par incubation dans une solution soit de CXCL12 soit de CCL5 (1, 2 ou 4 μ g/ml dans du PBS) puis incubées à 4°C sous agitation rotative pendant 24h. Des PMB chargées en CXCL12 ou CCL5 ont ensuite été fixées avec du PFA et immunomarquées grâce aux anticorps anti-CXCL12 (A) ou anti-CCL5 (B), suivis des anticorps secondaires conjugués à des fluorophores Alexa Fluor (A : 650 nm ; B : 577 nm). Les chimiokines ont ainsi été observées à la surface des PMBs par microscopie confocale à fluorescence (barre d'échelle 100 μ m). La libération de chimiokines à partir de PMBs a ensuite été réalisée dans 500 μ L de PBS/1% p/v BSA à 37°C sous agitation rotative, pendant 21 jours. À chaque temps d'étude (1h, 2h, 4h, 24h, 48h, 72h, 7 jours, 14 jours et 21 jours) les surnageants ont été prélevés et analysés par dosages ELISA spécifiques du CXCL12 ou du CCL5. Les résultats sont exprimés en quantités de CXCL12 (A) et de CCL5 (B) cumulées, en fonction du temps. Les expériences ont été effectuées en trois exemplaires et les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écart-type. Abréviations : CXCL12 : ligand 12 de chimiokine (motif CXC) ; CCL5 : Chimiokine (motif C-C) ligand 5 ; PFA : paraformaldéhyde.

De façon similaire, une efficacité d'adsorption de 100% a été mesurée, ainsi qu'une libération prolongée des chimiokines durant 21 jours *in vitro*. Un « burst » de libération durant les 3

premiers jours de culture a été mesuré, définissant alors les profils de libération suivants : 1 ng/h et 74 ng/h durant les 24 premières heures, suivies de 0.8 ng/h et 0.7 ng/h pour le CXCL12 et le CCL5, respectivement. Tandis que 11 ng/h et 80 ng/h durant les 24 premières heures, suivies de 1.9 ng/h et 2.7 ng/h avaient été dosés pour le TGF- β 1 et GDF-5, respectivement, donnant alors le système de libération séquentielle suivant (Figure 19).

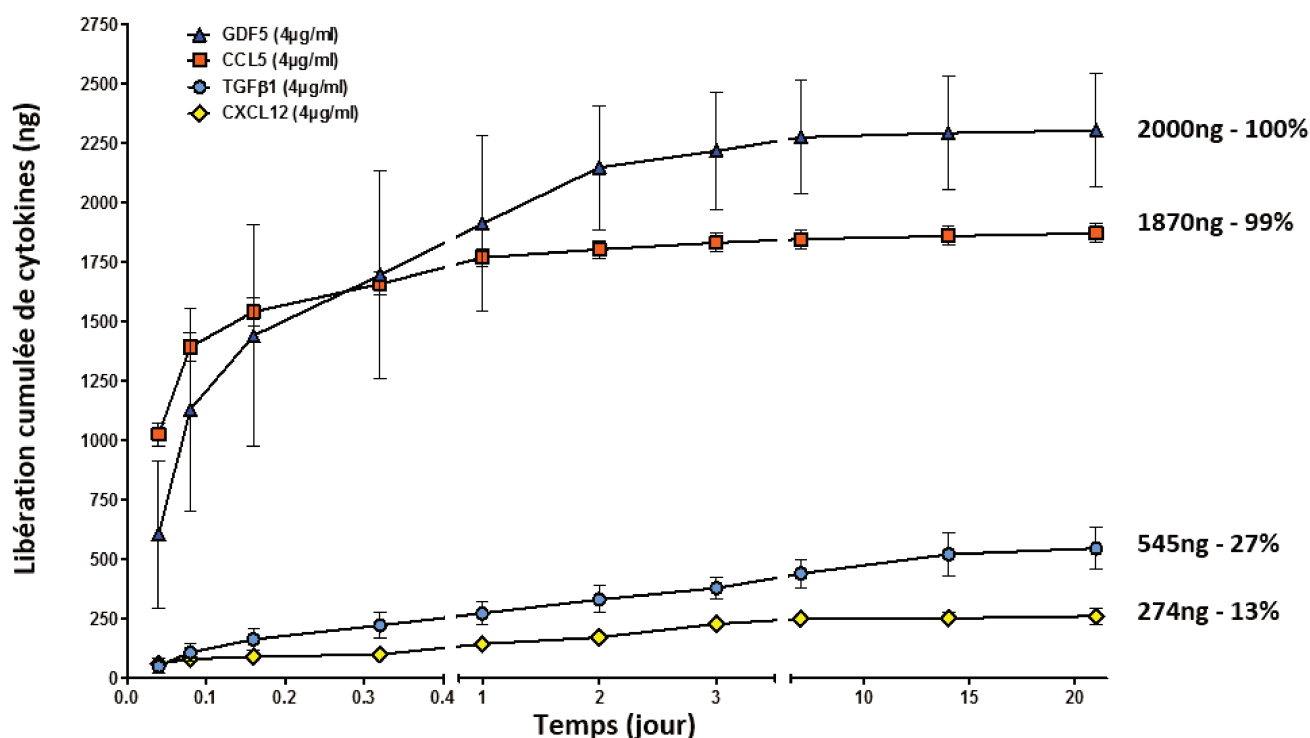


Figure 19 : Libération séquentielle des facteurs biologiques: CCL5, CXCL12, TGF- β 1 et GDF-5 à partir des microbilles de pullulane

Les PMBs sont adsorbées séparément avec du CXCL12, CCL5, TGF- β 1 ou du GDF-5, à une concentration initiale de 4μg/ml dans 500μl de PBS/BSA 1% p/v, pendant 24h à 4°C sous agitation rotative. Puis leur libération est étudiée à 37°C durant 21 jours dans 500μl de PBS/BSA 1% p/v, sous agitation rotative. Les surnageants sont récupérés aux temps d'études spécifiques puis les facteurs sont dosés par dosages ELISA spécifiques. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écart-type et réalisés en triplicat. Abréviations: CXCL12 : ligand 12 de chimiokine (motif CXC) ; CCL5 : Chimiokine (motif C-C) ligand 5 ; TGF : Transforming Growth Factor ; GDF : Growth Differentiation Factor.

La libération rapide du CCL5 dans les premières heures, associée à la libération rapide mais prolongée du GDF-5 ainsi qu'à la libération progressive du TGF- β 1 pourrait permettre d'obtenir le schéma séquentiel souhaité. Ce système permettrait de recruter les cellules souches / progénitrices discales vers le NP, puis de stimuler leurs activités anaboliques en vue d'une synthèse locale de MEC saine.

Ces différents facteurs biologiques sont tous chargés positivement tandis que les microbilles de pullulane sont chargées négativement du fait des ponts phosphates créés lors de la réticulation chimique (agent réticulant : STMP). Nous pouvons alors suggérer que l'adsorption de ces 4 facteurs à la surface des PMBs se fait notamment grâce à la mise en place de liaisons électrostatiques positive – négative entre les facteurs et les microbilles. Concernant la

libération, il est décrit que celle-ci peut varier selon la charge électrostatique, la masse moléculaire et la dose des facteurs chargés. Ainsi, sachant que les deux chimiokines ici étudiées, le CXCL12 et le CCL5, présentent toutes deux une charge positive et des masses molaires équivalentes ($\approx 8\text{kDa}$), nous nous attendions à obtenir des profils de libération similaires pour des concentrations d'adsorption égales. Néanmoins, la dimérisation du CXCL12, en condition physiologique, décrite dans certaines études, pourrait alors expliquer la différence de profil de libération observée et le retardement de libération du CXCL12 par rapport au CCL5 (Ray et al. 2012). Concernant les facteurs de croissance, la libération rapide et importante du GDF-5 durant les trois premiers jours peut constituer une limite de ce système. En effet, le temps de recrutement des cellules *in vivo* est actuellement difficile à estimer et la libération trop rapide du GDF-5 pourrait alors s'avérer inefficace. De plus, les protocoles classiques de différenciation nucléopulpogénique de cellules souches *in vitro* nécessitent une mise en contact prolongée des cellules avec les deux facteurs (Colombier et al. 2016). Afin de retarder la libération du GDF-5 et prolonger son effet, l'association des PMBs chargées avec un macro-hydrogel est envisageable et a d'ores et déjà fait l'objet d'une étude lors d'une précédente thèse au laboratoire (Nina Henry, RMeS, INSERM UMR 1229, 2013-2017). Cette précédente étude a démontré que l'association des PMBs, chargées en TGF- β 1 et GDF-5, avec un hydrogel d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si), synthétisé au laboratoire, permettait d'obtenir une libération ralentie et progressive dans le temps (Figure 20) (Henry et al. 2017).

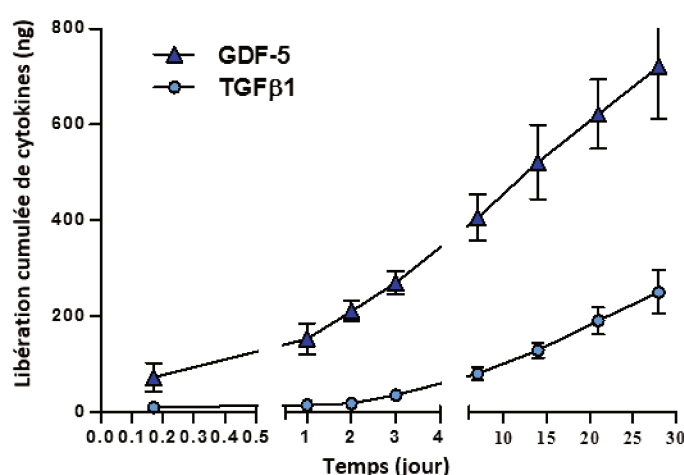


Figure 20: Cinétique de libération des facteurs TGF- β 1 et GDF-5 à partir du système biphasique PMBs/HPMC-Si. Les PMBs chargées séparément avec du TGF- β 1 et du GDF-5 à une concentration initiale de $4\mu\text{g/mL}$, ont été associées à un hydrogel d'HPMC-Si (Henry et al. 2017). La libération a été analysée à la suite de 3h de réticulation, par ajout de $500\mu\text{l}$ de PBS/BSA 1% p/v. Les surnageants sont récupérés aux temps d'études spécifiques puis les facteurs sont dosés par dosages ELISA

spécifiques. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écart-type et réalisés en triplicat pour le GDF-5 et en duplicat pour le TGF- β 1. Abréviations : TGF : Transforming Growth Factor ; GDF : Growth Differentiation Factor.

L'association d'un macro-hydrogel permettrait aussi de développer un système biphasique auquel nous pourrions envisager d'ajouter des facteurs anti-cataboliques ou anti-inflammatoires afin de diminuer l'inflammation locale préalablement au recrutement de cellules, et ainsi pouvoir améliorer leurs activités anaboliques et la restauration de l'homéostasie. En effet, l'action anti-catabolique du TGF- β 1 par l'inhibition du TNF- α et, par conséquent, des MMP peut s'avérer insuffisante dans les cas les plus sévères de DD (Cassie M. Tran et al. 2010). Sa libération progressive, est un avantage concernant son action anabolique, et en vue d'une action anti-catabolique prolongée dans le temps. Cependant, le TGF- β 1 ne permettrait pas de soigner dans un premier temps l'inflammation locale du NP préalablement au recrutement des cellules. Cette stratégie de réparation endogène du DIV par injection intradiscale des systèmes CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs cible donc des DD précoces et modérées.

Cependant, les difficultés actuelles de diagnostic des DD précoces et modérées peuvent également s'avérer être une limite. En effet, le diagnostic est actuellement principalement basé sur la description des douleurs ressenties par les patients (paramètre subjectif), suivies de techniques d'imageries (IRM et radiographie). Des nouvelles méthodes de diagnostic sont actuellement en cours d'évaluation afin de permettre une prise en charge plus rapide et spécialisée des patients. Ainsi, un nouvel outil d'imagerie non-invasif permettant de détecter des DD précoces est actuellement développé au sein du laboratoire. Ce nouvel outil a pour principe de réaliser des mesures objectives et directes des différents temps caractéristiques des séquences en pondération T1, T2 et T2* par le biais d'IRM quantitatives ou relaxométries (Nora Bouhsina, RMeS, INSERM U1229, 2018-2021). Cette étude est réalisée chez la brebis par comparaison des données de relaxométrie obtenues aux méthodes de classification de la dégénérescence discale classiquement utilisées (grade de Pfirrmann (Pfirrmann et al. 2001) et score de Boos (Boos et al. 2002)). L'objectif final est de mettre au point une technique d'évaluation quantitative de la DD permettant de mieux sélectionner les DIV à traiter et d'assurer le suivi pour évaluer l'efficacité d'un traitement.

De plus, au regard de la localisation et de la fragilité du DIV, la répétition des injections intradiscales est absolument à éviter. L'association de différents agents thérapeutiques permettant d'agir aux différents stades de la DD, par le biais d'une unique injection

intradiscal, est actuellement un véritable challenge (Frapin et al. 2019). Ainsi, le développement de systèmes à libération séquentielle représente une option très intéressante. Cependant, la capacité d'injecter au sein du tissu discal constitue actuellement une problématique encore non-résolue. A ce jour, l'injection trans-annulaire est la voie d'abord la plus couramment utilisée. Cette dernière est également pratiquée pour la mise en place de modèle de DD induit. Son utilisation au sein d'une stratégie de régénérescence interroge donc. Des études ont néanmoins démontré que les altérations induites par une injection trans-annulaire étaient à corréluer au diamètre de l'aiguille utilisée par rapport à la taille du DIV traité. Ainsi, un ratio diamètre aiguille/taille du DIV, inférieur à 40% n'entraînerait pas de lésions dégénératives de l'AF. L'utilisation de l'injection trans-annulaire reste néanmoins encore sujette à discussion, notamment dans les cas de DD précoces et modérées (Elliott et al. 2008). Pour ces raisons, l'optimisation de cette voie d'abord semble actuellement primordiale afin de limiter les effets potentiellement néfastes de l'injection trans-annulaire. Ainsi, au laboratoire une récente thèse portant sur le développement d'un implant biodégradable dans les cas de hernies discales, pourrait s'avérer être une option prometteuse à cette fin (Maude Gluais, RMeS, INSERM UMR 1229, 2015-2018) (Gluais et al. 2019). Ces récents travaux, ont permis de développer un implant constitué de fibres alignées de polycaprolactone électrospinnées mimant les propriétés morphologiques et mécaniques de l'AF natif et permettant une colonisation cellulaire spontanée *in vitro*. L'implantation *in vivo* de ce patch au sein d'un modèle ovin présentant un défaut induit de l'AF, a permis de fournir un microenvironnement propice à la production de fibres de collagène. Des études *in vivo* au long terme au sein d'un modèle de hernie discal reste encore à réaliser. En attendant, l'utilisation d'aiguilles de 23G semble un compromis satisfaisant afin d'éviter au maximum les lésions dégénératives, sachant que des aiguilles de 18G sont aujourd'hui conventionnellement utilisées en clinique humaine.

Une fois le système injecté, puis les facteurs libérés, ceux-ci doivent alors permettre le recrutement des cellules souches discales puis la stimulation de leurs activités anaboliques et la synthèse d'une MEC saine. Ainsi, la bioactivité de ce système a été étudiée *in vitro*, par analyse des capacités de migration cellulaire des PMBs chargées en chimiokines, puis par évaluation des propriétés anaboliques des PMBs chargées en facteurs de croissance. Premièrement, concernant les études de migration cellulaire *in vitro*, nous avons évalué les capacités de recrutement du CXCL12 et du CCL5 sur des CSM issues de tissu adipeux d'origine

humaine (cellules souches/stromales adipeuses, CSA), au sein d'inserts de Transwell. Tout d'abord, le test de migration *in vitro* a été optimisé en étudiant l'influence de la densité d'ensemencement cellulaire, de la durée de migration et de la concentration en chimiokines (CXCL12), sur le nombre total de cellules recrutées (Figure 21). Une augmentation de la densité d'ensemencement des cellules de 100 000 cellules/insert à 250 000 cellules/insert a entraîné une augmentation du nombre de cellules recrutées (70 540 cellules contre 102 000 cellules, respectivement, pour une durée de migration de 24 heures et une concentration de CXCL12 de 500 ng/ml). Cependant, aucun effet semblable n'a été observé lorsque la densité d'ensemencement augmente à 500 000 cellules/insert. D'autre part, l'augmentation de la durée de migration de 4 heures à 6, 12 ou 24 heures a diminué significativement le nombre de cellules recrutées (65 000 cellules contre 20 700, 32 600 et 20 600, respectivement, avec 500 000 cellules/insert stimulées et 500 ng/ml de CXCL12). Enfin, l'augmentation de la concentration de CXCL12 de 100 ng/ml à 250 ng/ml n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de cellules recrutées, tandis que l'augmentation de la concentration de 250 ng/ml à 500 ng/ml a fait passer ce nombre de 83 000 à 43 000 cellules, respectivement (avec 500 000 cellules/insert stimulées pendant 24 heures). Par conséquent, tous les essais de migration subséquents ont été effectués dans les conditions optimisées suivantes : 250 000 cellules/insert, 4 heures de migration et une concentration en chimiokines de 250 ng/ml.

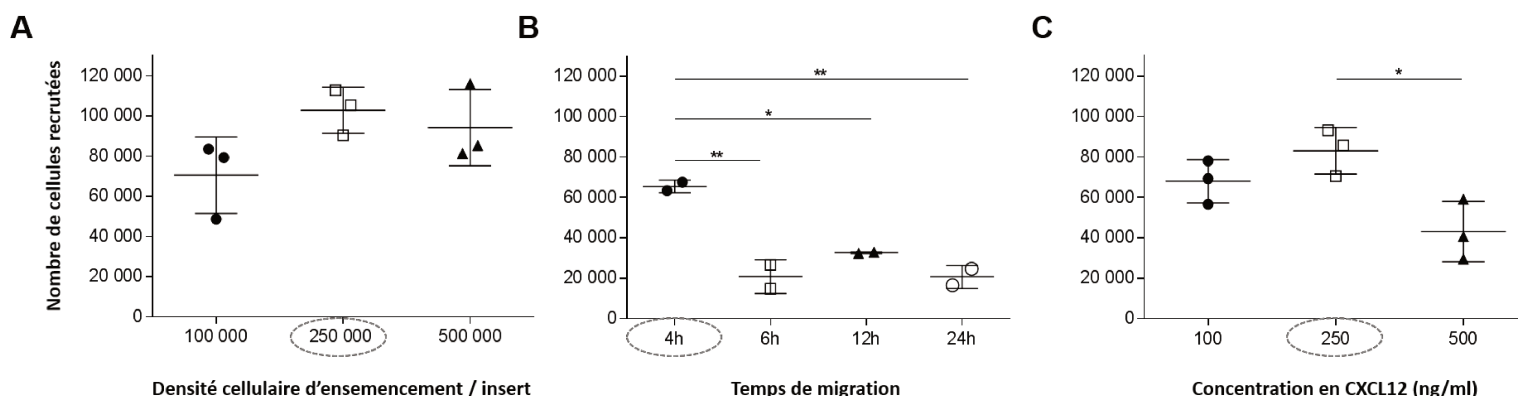


Figure 21 : Tests d'optimisation des essais d'évaluation de la migration cellulaire *in vitro*

Des cellules souches adipeuses humaines (hCSA) ont été ensemencées dans la chambre supérieure d'un insert de Transwell (taille des pores : 8 μ m) et la chimiokine CXCL12 a été ajoutée dans la chambre inférieure. La migration a été effectuée à 37°C, dans une atmosphère à 20% d'O₂ et 5% de CO₂. Les cellules recrutées ont été colorées par du cristal violet puis quantifiées par analyse spectrophotométrique à 595 nm. L'influence de la densité d'ensemencement des cellules (A), du temps de migration (B) et de la concentration en CXCL12 (C) sur le nombre de cellules recrutées est présentée. Les conditions expérimentales sélectionnées pour le reste de l'étude sont mises en évidence par des lignes pointillées. Les résultats sont présentés sous la forme de valeurs moyennes $\pm$ écart-type obtenues avec 1 donneur pour chaque condition (donneurs 1 pour les deux premiers graphiques et 2 pour le dernier graphique), les expériences sont réalisées en double ou en triple exemplaires. ANOVA unidirectionnelle, post-test de Bonferroni * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Abréviations : CSA : Cellules souches adipeuses ; CXCL12 : ligand de chimiokine (motif CXC) 12.

Des contrôles de migration réalisés en absence de chimiokine ont également permis d'observer une migration spontanée des CSA humaines *in vitro* au sein des inserts de Transwell. Puis, les analyses de migration *in vitro* ont mis en évidence une tendance à l'augmentation de la migration spontanée des CSA humaines par le CXCL12 pour les 2 donneurs testés (A et C) sur 3 (A, B et C). Tandis qu'une augmentation significative par le CCL5 a été mise en évidence pour 2 donneurs testés (A et C) sur 3 (A, B et C). De plus, il a été mis en évidence chez un donneur (C) une augmentation significative de la migration des CSA humaines par stimulation avec la chimiokine CCL5 par rapport à la chimiokine CXCL12 (*Figure 22.A*). Dès ces premières expérimentations une importante variabilité inter-donneurs a été observée, conforme aux descriptions préalables de la littérature (Pereira et al. 2014). Nous avons ensuite exploré le maintien de leur effet de migration dans le temps, et avons observé une diminution notable de leur efficacité de migration, dès 4h d'incubation (*Figure 22.B*). Ces observations suggèrent alors que les chimiokines CXCL12 et CCL5 sont rapidement dégradées à 37°C en solution, ou bien que celles-ci deviennent inactives après un court temps d'incubation. En parallèle de ces analyses, nous avons évalué de manière similaire les capacités de migration de PMBs chargées en CXCL12 ou CCL5 (800 000 PMBs, 4µg/ml), afin d'évaluer la bioactivité de ces systèmes. Une augmentation progressive de la migration a été obtenue pour le système CCL5/PMBs avec une augmentation de la migration de 1,2 à 1,6 puis 2 fois supérieure, par rapport aux cellules traitées avec des PMBs non chargées, après respectivement 0, 4h puis 24h d'incubation (*Figure 22.B – en bas à droite*). Puis une diminution progressive de l'effet de ce système sur la migration cellulaire est observée après 48h, 72h puis 7 jours d'incubation. Ces expérimentations ont été réalisées en triplicat sur 4 donneurs. Malgré l'absence de différence significative observée lorsque les 4 donneurs sont rassemblés et que la comparaison est réalisée par rapport à la moyenne des contrôles des 4 donneurs (D, E, F et G), des différences significatives sont observées pour les donneurs séparément (*Figure 23*). Concernant le système CCL5/PMBs, 3 donneurs (D, E et F) sur 4 (D, E, F et G) ont démontré une augmentation significative de la quantité de cellules recrutées par rapport aux cellules traitées avec des PMBs non chargées (*Figure 2 de l'article expérimental et Figure 23*). De plus, la similarité des profils obtenus pour chaque donneur de CSA, concernant leurs réponses au système CCL5/PMBs, permet de confirmer le maintien de la stimulation de la migration cellulaire par le système CCL5/PMBs, *in vitro* sur des CSA humaines. Par ailleurs, tout le long de notre étude le CXCL12 s'est avéré peu efficace à stimuler la migration des CSA humaines

de manière reproductible, qu'il soit libre en solution ou libéré des PMBs. En effet, les PMBs chargées en CXCL12 n'ont permis une augmentation significative de la migration des CSA humaines uniquement pour un donneur de CSA testé (E) sur 3 (D, E et F) (*Figure 23*). Ces observations peuvent être dues à la source des CSM utilisées dans cette étude. En effet, les études publiées évaluent principalement des CSM issues de la moelle osseuse et non pas du tissu adipeux.

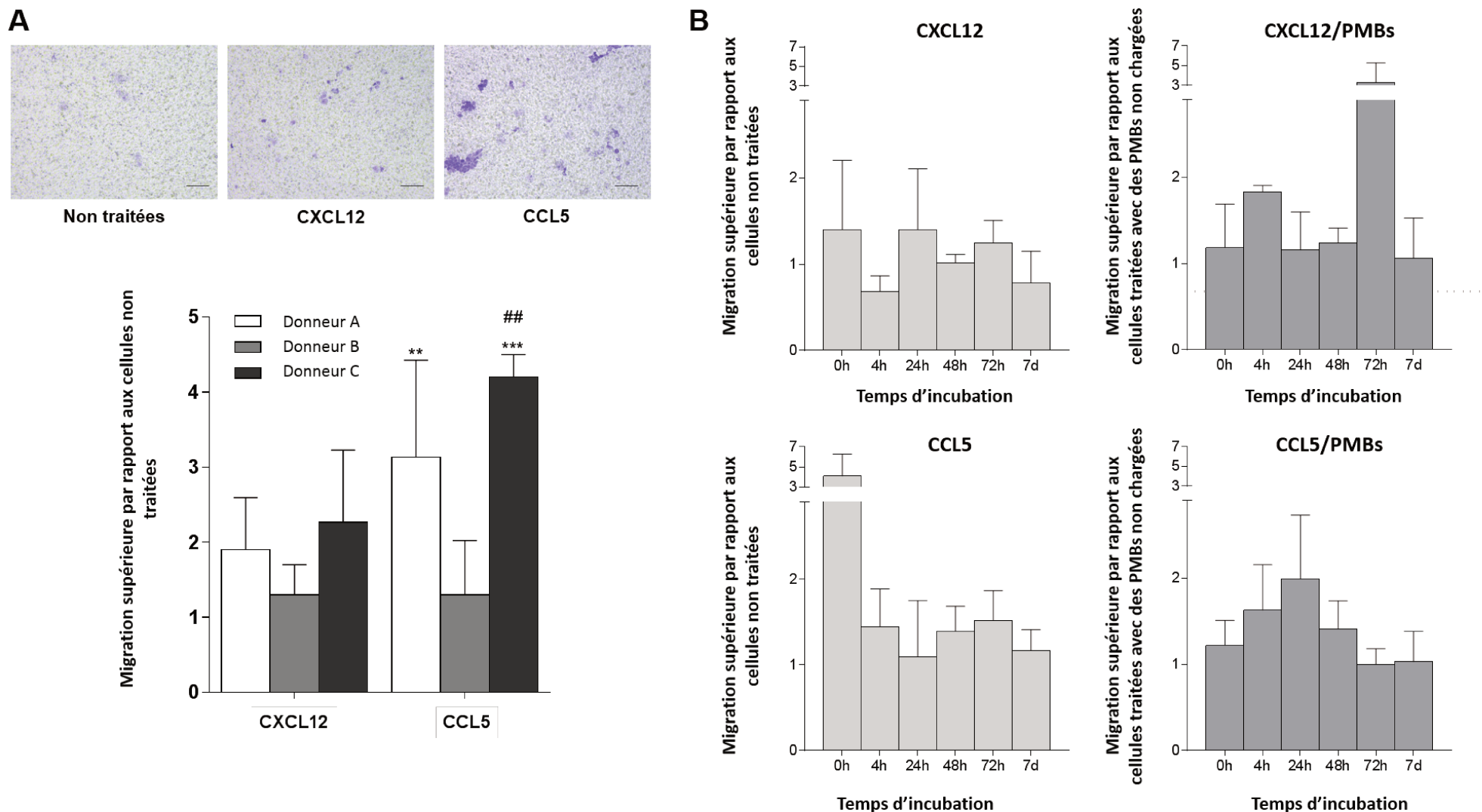


Figure 22 : Evaluation de la bioactivité *in vitro* des chimiokines CXCL12 et CCL5 sur la migration des CSA humaines.

(A) Effet des chimiokines CXCL12 ou CCL5 sur la migration des CSA humaines. La migration *in vitro* pendant 4 heures des CSA humaines traitées avec du CXCL12 (250 ng/ml dans du DMEM/0,1 % p/v BSA) ou du CCL5 (250 ng/ml dans du DMEM/0,1 % p/v BSA), ou des cellules non traitées (DMEM/0,1 % p/v BSA) est présentée. Images microscopiques représentatives de la face inférieure des inserts de Transwell, montrant des cellules recrutées colorées avec du cristal violet (barre d'échelle : 100 μ m). Les résultats sont des expressions relatives pour chacun des 3 donneurs (A, B et C) par rapport à leur propre groupe témoin (cellules non traitées) et sont présentés sous forme de valeurs moyennes $\pm$ écart-type des expériences réalisées en trois exemplaires, (B) Bioactivité prolongée des chimiokines CXCL12 ou CCL5 libérées des PMBs. L'effet des chimiokines libres et des chimiokines libérées des PMBs a été évalué sur les CSA humaines en fonction du temps d'incubation des chimiokines ou des PMBs chargées. Du CXCL12 libre (4 μ g/mL), CCL5 libre (4 μ g/mL), des CXCL12/PMBs (concentration de charge initiale 4 μ g/mL) ou des CCL5/PMBs (concentration de charge initiale 4 μ g/mL), tous dans du DMEM/0,1% p/v BSA, ont été incubés à 37°C. À des temps d'études précis (solution ou suspension fraîche, 4h, 24h, 48h, 72h et 7 jours d'incubation), les CSA humaines sontensemencées sur les inserts de Transwell, puis un test de migration est effectué pendant 4

heures, avec les cellules en contact avec les chimiokines libres incubées (à gauche) ou les microbilles chargées en CXCL12 ou CCL5 (CXCL12/PMB ou CCL5/PMB) (à droite). Les résultats sont des expressions relatives du nombre de cellules ayant migrées par rapport aux cellules non traitées regroupées pour tous les donneurs, à chaque temps d'étude donné. Pour les chimiokines libres et les chimiokines chargées sur les PMBs, les cellules non traitées ont été respectivement incubées soit avec du DMEM/0,1% p/v BSA, soit avec des PMBs non chargées dans du DMEM/0,1% p/v BSA. Les résultats sont présentés sous la forme de valeurs moyennes $\pm$ écart-type de 3 donneurs (chimiokines libres : donneurs D, E et F et CXCL12 libéré) ou de 4 donneurs (CCL5 libéré : donneurs D, E, F et G), toutes les expérimentations sont réalisées en triple exemplaires. * représente une différence significative avec les cellules non traitées, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA bidirectionnelle, post-test de Bonferroni, # représente une différence significative avec la chimiokine CXCL12, ## $p < 0,01$, ANOVA bidirectionnelle, post-test de Bonferroni. Abréviations : CXCL12 : ligand 12 de chimiokine (motif CXC) ; CCL5 : Chimiokine (motif C-C) ligand 5 ; CSA : Cellules souches adipeuses ; BSA : Albumine de sérum bovin ; PMBs : Microbilles de Pullulane.

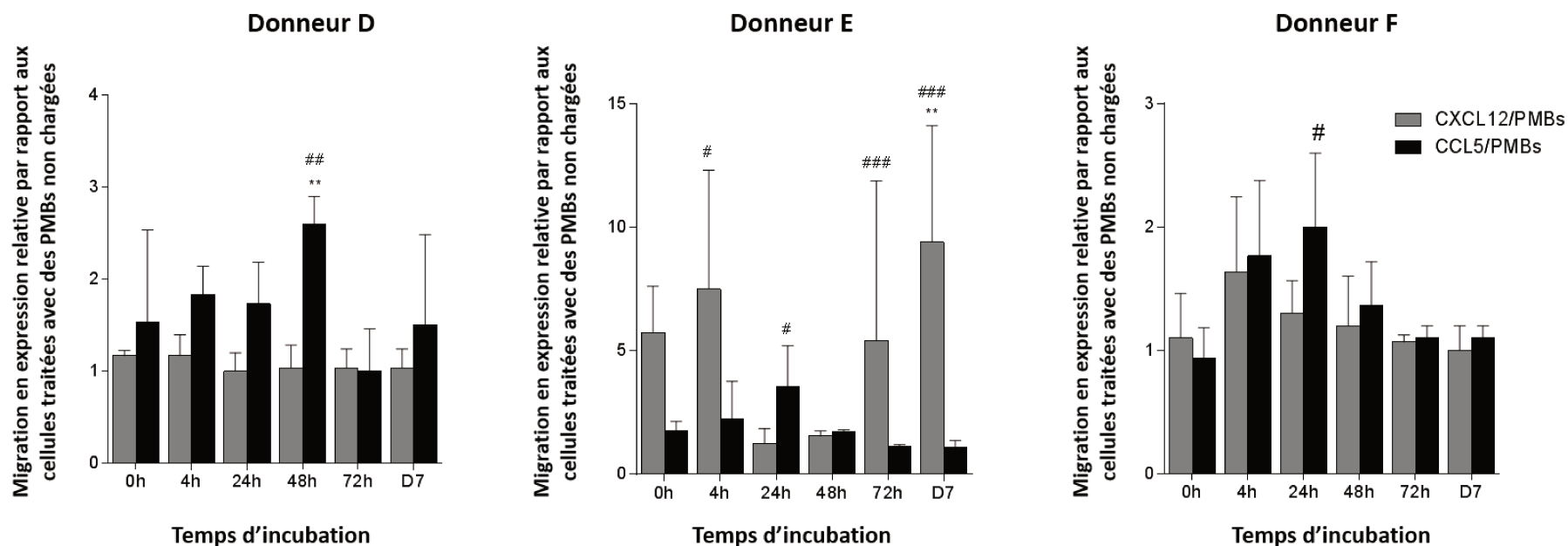


Figure 23 : Variation de la migration des CSA humaines induite par les chimiokines CXCL12 et CCL5 libérées des PMBs, en fonction du donneur.

Les cellules de 3 donneurs (D, E et F) ont été utilisées pour évaluer la bioactivité des systèmes CXCL12/PMBs et CCL5/PMBs, dans le temps. Pour chaque temps d'étude et pour chaque donneur, les résultats de la migration sont des expressions relative de la quantité de cellules recrutées par rapport à quand les cellules sont traitées avec des PMBs non chargées, au même temps d'étude. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes $\pm$ écart-type pour chaque donneur. Les expérimentations sont réalisées en trois exemplaires). * représente une différence significative entre les systèmes CXCL12/PMBs et CCL5/PMBs, ** $p < 0,01$, ANOVA bidirectionnelle, post-test de Bonferroni, # représente une différence significative avec les PMBs non chargées, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, ANOVA bidirectionnelle, post-test de Bonferroni. Abréviations : CXCL12 : ligand 12 de chimiokine (motif CXC) ; CCL5 : Chimiokine (motif C-C) ligand 5 ; CSA : Cellules souches adipeuses ; BSA : Albumine de sérum bovin ; PMBs : Microbilles de Pullulane.

Nous avons également évalué *in vitro* l'effet des systèmes TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs sur la stimulation de la synthèse d'une MEC de type nucléopulpogénique (riche en agrécane et en collagène de type II) par des CSA humaines. Les interactions *in vitro* des CSA humaines cultivées avec des PMBs ont d'abord été analysées. Des densités différentes de CSA humaines (100 000, 250 000 ou 500 000) ont été mélangées à un nombre constant de PMBs (50 000, correspondant à des rapports de 1:2, 1:5 et 1:10), puis cultivées dans des tubes de propylène pendant 7 jours. L'analyse par microscopie fluorescente a démontré la formation d'agrégats spontanés de CSA humaines avec les PMBs dès le 1^{er} jour de culture. Les agrégats sont restés stables jusqu'au 7^{ème} jour de culture. Le rapport 1:10 qui permet la formation des agrégats les plus compacts (*Figure 24.A*) a été sélectionné pour les expérimentations suivantes. Cette agrégation spontanée des cellules de types CSM au contact des PMBs peut s'avérer intéressante *in situ*. En effet nous pouvons imaginer qu'une fois les cellules souches discales recrutées au niveau des NP, leur agrégation spontanée à la surface des PMBs pourrait permettre leur retenue au niveau des NP.

L'analyse de l'impact du TGF- β 1 et du GDF-5 sur des CSA humaines a d'ores et déjà fait l'objet d'une précédente thèse au laboratoire (Pauline Colombier, LIOAD, INSERM UMR 791, 2011-2016). Ces précédents travaux ont démontré les effets synergiques de ces deux facteurs de croissance sur la différenciation de pellets de CSA humaines en pellets de cellules de type NPCy (Colombier et al. 2016). Dans cette étude, nous avons étudié la capacité de ces deux facteurs de croissance lorsqu'ils sont libérés par les PMBs à induire la synthèse d'une MEC de type nucléopulpogénique par les CSA humaines. Les mêmes quantités de TGF- β 1 et GDF-5, que celles utilisées lors du protocole classique *in vitro* de différenciation de CSA humaines en NPCy, ont été adsorbées sur les PMBs (600ng de TGF- β 1 et 1200ng de GDF-5). Les PMBs chargées en TGF- β 1 et GDF-5 ont ensuite été cultivées avec des CSA humaines (ratio 1 :10, 50 000 PMBs chargées, 500 000 CSA), pendant 28 jours, à 37°C, dans une atmosphère à 5% d'O₂. Nous avons également réalisé comme contrôles de ces expérimentations, des agrégats de cellules seules et des agrégats de cellules et PMBs non chargées, sans ou avec les facteurs de croissance en solution dans le milieu de culture qui est renouvelé tous les 3 jours (10ng/ml de TGF- β 1 et 100ng/ml de GDF-5 dans 1ml de milieu) (Colombier et al. 2016). Des analyses histologiques ont ensuite été effectuées pour évaluer la morphologie des agrégats et la synthèse de MEC (*Figure 24.B*). Alors que la taille des agrégats formés à l'aide de PMBs non chargées est restée la même au fil du temps (environ 100 μ m), la taille des agrégats formés à

l'aide des PMBs non chargées et cultivées dans un milieu contenant des facteurs de croissance libres est passée à environ 500 μm . Nous avons également observé une tendance similaire pour les agrégats formés avec les PMBs chargées en TGF- β 1 et GDF-5 (*Figure 23.B*). Que les facteurs soient apportés dans le milieu tous les trois jours, à l'image du protocole classique de différenciation nucléopulpogénique (Colombier et al. 2016), ou qu'ils soient adsorbés sur les PMBs, les CSA humaines synthétisent au centre des agrégats une nouvelle MEC riche en GAG et collagène. L'expression de marqueurs cellulaires spécifiques des NPCy, tels que OVOS2, PAX1 et CD24, a été analysée par immunohistochimie. Les marquages OVOS2, PAX1 et CD24 se sont tous trois révélés être plus prononcés dans les agrégats préparés avec des PMBs chargées en TGF- β 1 et GDF-5 (*Figure 24.B*). Ces analyses ont été réalisées sur 3 donneurs de CSA différents (D, E et G) et la reproductibilité de ces études histologiques qualitatives ont permis de valider la bioactivité *in vitro* des systèmes TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs sur la stimulation de la synthèse d'une MEC de type nucléopulpogénique par des CSA humaines.

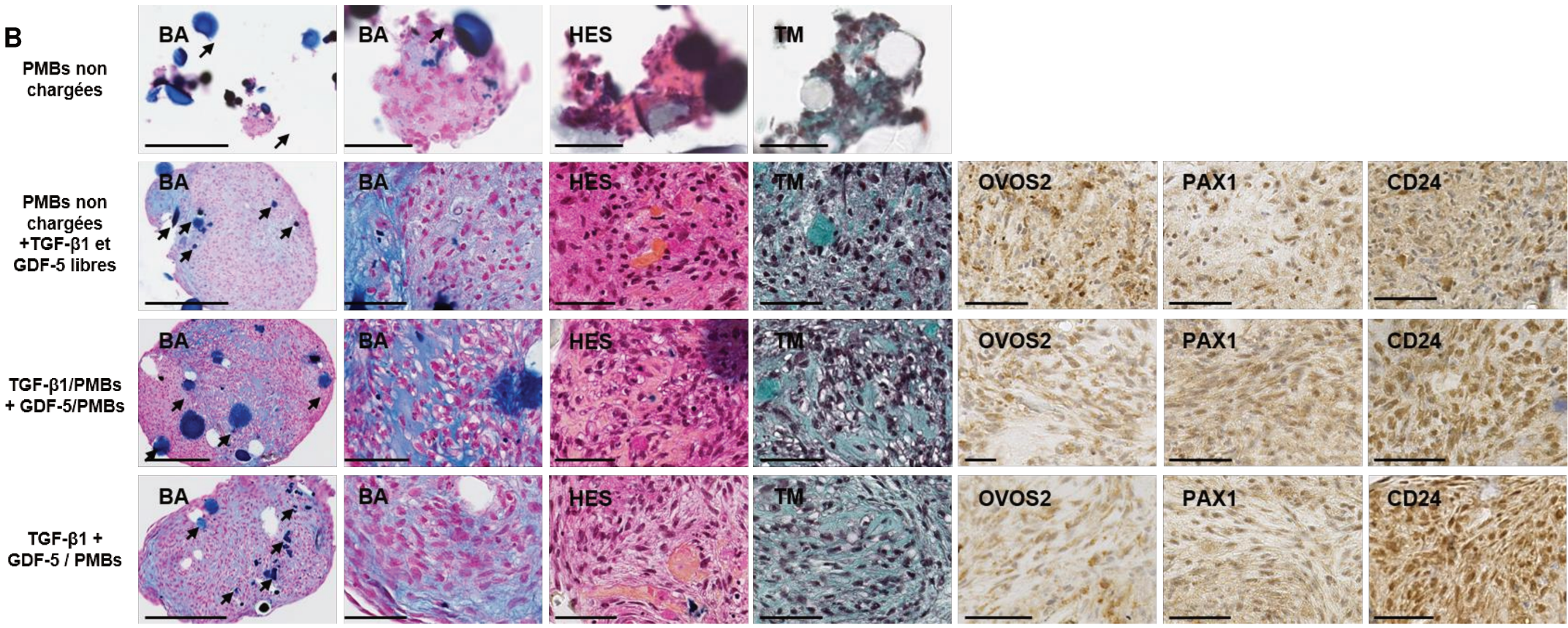
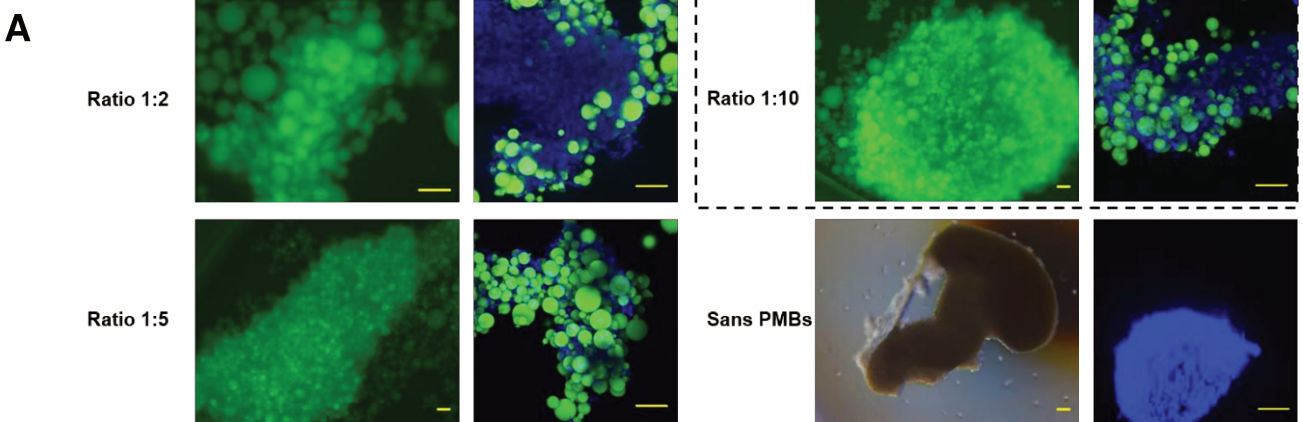


Figure 24 : Évaluation de l'agrégation entre les PMBs et les CSA humains et de la MEC synthétisée in vitro par les CSA humaines cultivées avec des PMBs chargées en TGF-β1 et GDF-5.

(A) Des CSA humaines (donneur D) et des FITC-PMBs fluorescentes ont été mélangées selon différents ratios (1:2, 1:5 et 1:10) et cultivées dans un milieu de culture dépourvu de sérum. Au 7^{ème} jour de culture, les agrégats ont été perméabilisés, marqués au Hoechst et observés en microscopie confocale fluorescente (barre d'échelle : 100µm). (B) Pour l'évaluation du type de MEC synthétisé au centre des agrégats PMBs/CSA, un ratio de 1:10 entre les CSA humaines et les PMBs a été choisi. Les agrégats ont été cultivés pendant 28 jours dans un milieu de différenciation sans sérum complété ou non avec les facteurs de croissance TGF-β1 et GDF-5. Les agrégats sont composés soit de PMBs non chargées (1^{ère} et 2^{ème} lignes), soit de PMBs chargées en TGF-β1 et de PMBs chargées en GDF-5 (3^{ème} ligne), soit de PMBs chargées en TGF-β1 et GDF-5 (4^{ème} ligne). Les agrégats ont ensuite été préparés histologiquement, colorés avec du bleu alcian (BA), de l'hématoxyline/éosine/safran (HES) ou du trichrome de Masson (TM), ou immunomarqués pour OVOSTATIN 2, PAX1 ou CD24 (barres d'échelle : 250 µm pour l'agrégat entier et 50 µm pour les agrandissements). Les PMBs ont été mises en évidence grâce au BA et sont indiqués par des flèches noires. Ces expérimentations ont été réalisées chez 3 donneurs (D, E et G). Milieu de différenciation : DMEM à haute teneur en glucose, P/S 1% v/v supplémenté avec 6,25 µg/mL d'insuline humaine - transférine-sélénite de sodium, de l'ascorbate-2-phosphate 1 % p/v et $1,0 \times 10^{-8}$ M de dexaméthasone. Abréviations : TGF-β1, Transforming Growth Factor-β1 ; GDF-5, Growth Differentiation Factor 5 ; CSA: Cellules souches adipeuses ; PMBs: Microbilles de Pullulane ; BA: Bleu Alcian ; HES : Hématoxyline Eosine Safran ; TM: Trichrome de Masson.

Cependant, contrairement à la simplicité que pourrait refléter ce système d'agrégats spontanés, la récupération de ceux-ci, en vue de leur analyse histologique, du fait de leur petite taille s'est avéré techniquement délicate. De plus, aucune analyse génique n'a pu être effectuée en raison de la quantité trop faible d'ARN récupérée des agrégats de CSA et PMBs. Ces difficultés techniques, nous ont alors poussé à explorer d'autres modèles d'analyse de la bioactivité du système TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs.

Ainsi, l'incorporation de PMBs chargées (50 000/matrice) et de CSA humaines (500 000/matrice) au sein d'une matrice poreuse polysaccharidique a été étudiée en parallèle. Les matrices utilisées sont composées de pullulane et de dextrane, et réticulées par le même agent réticulant que les microbilles de pullulane (STMP). Une précédente étude réalisée dans le cadre de ma thèse d'exercice de pharmacie et de mes stages de master, a démontré la possibilité d'ensemencement de ces matrices par des CSA humaines. La présence d'une MEC de type nucléopulpogénique synthétisée au sein des matrices polysaccharidiques ensemencées avait également été observée (Leslie Frapin, LIOAD, INSERM UMR 791, 2015-2016). Dans cette présente étude, nous avons observé la synthèse d'une MEC composée de GAG (coloration au BA) au centre d'agrégat cellulaire (mis en évidence par des flèches jaunes) présent au sein des matrices ensemencées de CSA humaines et de PMBs chargées en TGF- β 1 et GDF-5, après 14 jours de culture *in vitro* (Figure 25.A). Cependant, après 28 jours de culture, la quantité de CSA humaines, au sein des matrices polysaccharidiques, diminue fortement, ne faisant pas de ce système un modèle de choix pour l'évaluation de la bioactivité des PMBs chargées en TGF- β 1 et GDF-5 (Figure 25.B). Nous avons également tenté de réaliser ces analyses de bioactivité du système TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs au sein de tubes de chitosan fournis par Mr Laurent David et Mme Alexandra Clayer-Montembault du laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP) UMR5223, CNRS-Université Claude Bernard - Lyon I (Figure 25.B). Des tests ont également été effectués en associant les PMBs chargées et les CSA humaines avec de l'HPMC-Si ou encore des gels d'alginate. L'ensemble de ces tests réalisés avaient pour objectif de faciliter l'analyse histologique et permettre la récupération d'une quantité d'ARN suffisante afin de permettre l'évaluation du profil génique des CSA après 28 jours de culture au contact du système de PMBs chargées en TGF- β 1 et GDF-5. Finalement, les essais réalisés avec les matrices polysaccharidiques et les tubes de chitosan ont permis d'observer des résultats histologiques moins concluants par rapport à ceux obtenus avec les agrégats

spontanés (Figure 25). De plus, à l'heure actuelle la récupération d'ARN en vue d'une analyse génique reste toujours insuffisante avec l'ensemble de ces systèmes testés.

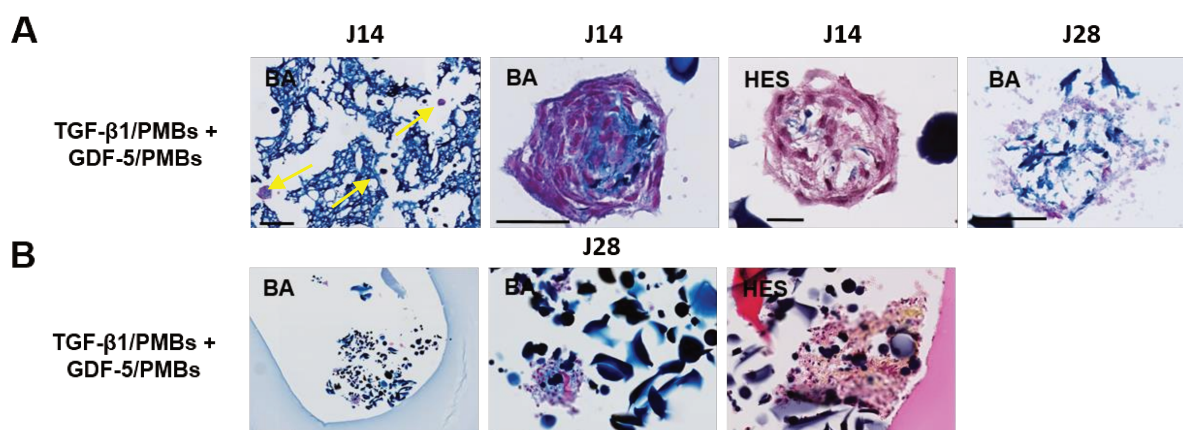


Figure 25 : Essais supplémentaires de l'évaluation *in vitro* de la bioactivité des PMBs chargées en TGF-β1 et GDF-5 sur des CSA humaines.

(A) Des CSA humaines (donneur D) et des PMBs chargées en TGF-β1 (600ng) ainsi que des PMBs chargées en GDF-5 (1200ng) ont étéensemencées (12μL, DMEM) dans des matrices polysaccharidiques, respectant un ratio 1 :10. Les matricesensemencées sont ensuite cultivées durant 14 ou 28 jours puis préparées histologiquement et colorées avec du bleu alcian (BA) et de l'hématoxyline/éosine/safran (HES) (barres d'échelle : 250μm pour l'image de gauche et 25μm pour les agrandissements). (B) Des CSA humaines (donneur D) et des PMBs chargées en TGF-β1 (600ng) ainsi que des PMBs chargées en GDF-5 (1200ng) ont étéensemencées (50μL, DMEM) dans un tube de chitosan, respectant un ratio 1 :10. Les tubes de chitosanensemencés sont ensuite cultivés durant 28 jours puis préparés histologiquement et colorés avec du bleu alcian (BA) et de l'hématoxyline/éosine/safran (HES) (barres d'échelle : 250μm pour l'image de gauche et 50μm pour les agrandissements). Abréviations: TGF-β1, Transforming Growth Factor-β1 ; GDF-5, Growth Differentiation Factor 5 ; PMBs: Microbilles de Pullulane ; BA: Bleu Alcian ; HES : Hématoxyline Eosine Safran.

L'ensemble des analyses histologiques nous a permis de confirmer la bioactivité *in vitro* du système TGF-β1/PMBs et GDF-5/PMBs. L'association des PMBs chargées en TGF-β1 et des PMBs chargées en GDF-5 stimule la synthèse d'une MEC riche en agrécane et collagène par des cellules de type CSM. De plus, l'expression de marqueurs spécifiques des NPCy (OVOS2, PAX1 et CD24) est également observée en présence de PMBs chargées en TGF-β1 et GDF-5 (Figure 23). En parallèle, pour chacune des expérimentations réalisées, un même échantillon de PMBs a été adsorbé simultanément en TGF-β1 et GDF-5 (50 000 PMBs, 600ng de TGF-β1 et 1200ng de GDF-5) nous permettant ainsi d'obtenir des PMBs chargées à la fois en TGF-β1 et GDF-5 (TGF-β1 + GDF-5/PMBs). De manière intéressante des résultats histologiques similaires à la condition TGF-β1/PMBs + GDF-5/PMBs ont été obtenus. Il est important de noter qu'un contrôle réalisé avec des PMBs non chargées et un milieu de culture dépourvu en facteurs de croissance a été effectué pour chacune des expérimentations afin de s'assurer que l'effet observé était bien lié aux facteurs et non aux PMBs elles-mêmes ou à l'agrégation des cellules.

Finalement, après validation du maintien *in vitro* de la bioactivité des différents facteurs biologiques adsorbés sur les PMBs, la preuve de concept du système complet dans le

microenvironnement du DIV était nécessaire. Pour ce faire, nous nous sommes tournés vers l'utilisation, d'un modèle *ex vivo* de culture d'organe. Depuis quelques années, la communauté scientifique se tourne vers l'utilisation de tels modèles *ex vivo*. Ces derniers présentent l'avantage majeur de pouvoir évaluer les stratégies innovantes au sein du tissu cible, et donc d'explorer les effets thérapeutiques ou régénératifs de ces approches (Lotz 2004; Alini et al. 2008). Ils précèdent ainsi la réalisation des études pré-cliniques *in vivo*. En effet, ces modèles *ex vivo*, bien que très instructifs, ne remplacent pas les études pré-cliniques *in vivo* indispensables à l'évaluation du produit. Ils permettent cependant de vérifier les résultats obtenus *in vitro*, dans un environnement contrôlé et tridimensionnel. La faisabilité de la stratégie ainsi que ses effets sur le tissu cible peuvent ainsi être explorés. Il s'agit donc bien de modèles complémentaires et non pas d'alternatives aux modèles *in vivo*. D'autant plus que ces modèles *ex vivo*, bien que très performants, ne tiennent pas compte des contraintes mécaniques et métaboliques retrouvées *in vivo*. L'utilisation des modèles *ex vivo* s'inscrit en plein cœur de la réglementation actuelle en vigueur, en respectant la règle des 3 R : Réduire, Raffiner, Remplacer, consistant à diminuer le nombre d'animaux utilisés à des fins de recherche expérimentale, et également à améliorer au maximum leur bien-être.

Dans notre étude, nous nous sommes fortement inspirés du modèle *ex vivo* de culture d'organe de DIV caudaux bovins, développé à l'AO foundation situé à Davos en Suisse (Illien-Jünger et al. 2012; Pereira et al. 2014). Un étudiant en Master 2 neurochirurgien de formation a eu l'opportunité d'aller se former à l'AO foundation, aux méthodes de culture *ex vivo* de DIV caudaux bovins, afin ensuite de transposer ce modèle aux DIV lombaires ovins (Constantin Moraru, RMeS, INSERM U1229, 2017-2018). Dans le cas du tissu discal, les DIV bovins et ovins sont des parfaits candidats à la mise en place de tels modèles *ex vivo*, au regard de leurs similarités structurelle, dimensionnelle et métabolique (cellules notochordales qui disparaissent progressivement du NP après la naissance) avec le tissu humain. A notre connaissance, aucune autre étude n'a confirmé à ce jour la possibilité de cultiver *ex vivo* des DIV lombaires ovins au long terme en dehors de bioréacteurs (Gantenbein et al. 2006; Jünger et al. 2009). Afin d'en évaluer la faisabilité, des DIV lombaires de 4 jeunes brebis (1 an) ont été prélevés et cultivés *ex vivo* (*Figure 3 de l'article expérimental*). Ces DIV présentaient tous des grades de Pfirrmann évalués à 1. Cette étude préliminaire a permis de valider la culture *ex vivo* au long terme (21 jours) d'un tel modèle. Nous avons observé le maintien de la densité et de la viabilité cellulaire, de l'activité métabolique et de la qualité de la MEC discale, jusqu'à 21 jours

de culture *ex vivo*. Seule une légère augmentation du score de Boos modifié (0 : DIV sain, 18 : plus haut niveau de DD) a été mise en évidence, après 7 jours de culture *ex vivo* (6 à 10). Des scores de Boos de 10 ont également été mesurés après 14 et 21 jours de culture *ex vivo*. En parallèle, nous avons également analysé l'impact de l'injection intradiscale d'une suspension de PMBs non chargées. L'injection de PMBs ne s'est pas révélée être délétère pour le tissu ni compromettre sa culture *ex vivo*. L'impact de l'injection d'un macro-hydrogel d'HPMC-Si combiné ou non à des PMBs non chargées a également été évalué. L'injection a été possible, cependant celle-ci a entraîné une altération de la viabilité cellulaire (*résultats non montrés*). De manière intéressante l'injection d'un volume de 200µL dans ce modèle *ex vivo* de DIV ovins sain s'est avérée possible dans seulement 30% des cas (7 DIV sur 24 DIV injectés), du fait de la variabilité morphométrique des DIV selon les niveaux lombaires. Le volume d'injection serait donc à adapter aux dimensions du DIV qui varient selon l'étage rachidien. Cependant, il s'agissait ici de DIV prélevés de brebis jeunes, et donc plus petits que des DIV de brebis adultes ou même que des DIV humains. De plus, un tissu non dégénératif et donc présentant un niveau d'hydratation important était utilisé dans cette étude préliminaire. Ce haut niveau d'hydratation conduit inévitablement à une augmentation de la pression lors de l'injection. Ceci a été par la suite vérifié lors de notre étude d'évaluation des systèmes CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs au sein d'un modèle *ex vivo* de DIV ovins naturellement dégénérés. Un effet, au sein de DIV modérément dégénérés, présentant des grades de Pfirrmann évalués à 2 ou 3, l'injection d'un volume de 200µl s'est avérée possible pour l'ensemble des DIV injectés. Le taux d'hydratation moindre des DIV dégénérés rendrait alors possible l'injection d'un tel volume. Ces observations confirment celles réalisées au cours d'expérimentations *in vivo* réalisées par le laboratoire dans le cadre de projets de thérapie cellulaire. Par ailleurs, l'utilisation d'un pousse-seringue électrique pourrait constituer une alternative intéressante permettant de standardiser l'injection au sein des études réalisées dans les modèles *ex vivo* et éviter les différences d'injection inter-individus.

Finalement, à la suite de la mise en place au laboratoire du modèle *ex vivo* de culture d'organe au long terme de DIV ovins, nous avons évalué la preuve de concept du système à libération séquentielle de facteurs biologiques composé de microbilles de pullulane séparément adsorbées en CCL5, TGF- β 1 et GDF-5 (*Figure 4 de l'article expérimental*). Afin d'explorer les effets de ce système sur la migration cellulaire et la synthèse d'une nouvelle MEC saine au sein du

microenvironnement d'un DIV dégénéré, cette étude a été réalisée au sein de DIV naturellement dégénérés. Les DIV utilisés pour cette étude provenaient de brebis âgées de 3 à 7 ans, et présentaient tous des grades de Pfirrmann de 2 à 3, témoignant d'une dégénérescence modérée du tissu (*Figure 26*).

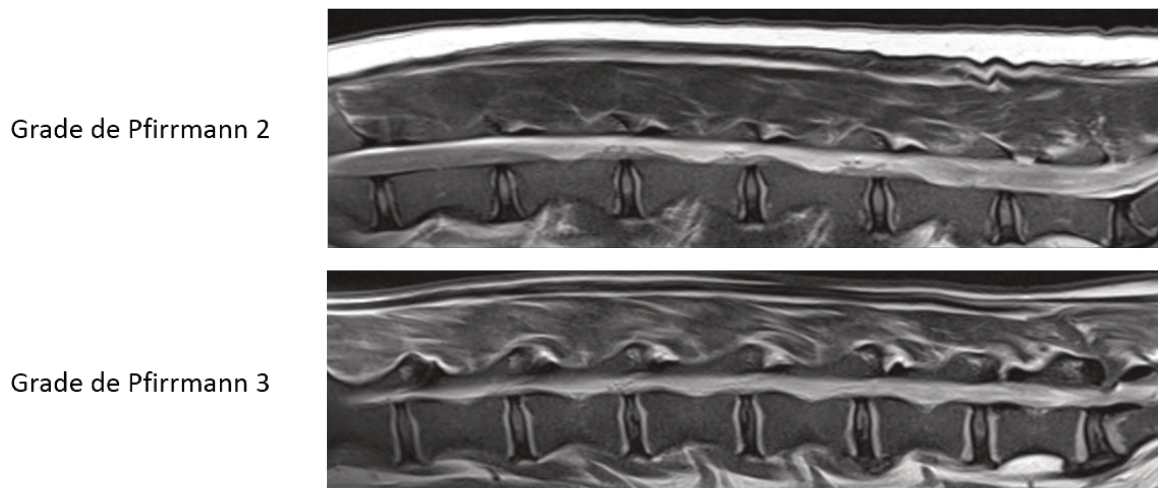


Figure 26 : Imageries à Résonance Magnétique (IRM) représentatives des rachis de brebis (3-7 ans) utilisées pour le modèle *ex vivo* ovin de DD spontanée.

Au contraire, les études préalablement publiées portant sur des stratégies similaires, ont quant à elles évalué la migration cellulaire et le remodelage de la MEC discale au sein de modèles *ex vivo* de DIV isolés de queues de jeunes bovins présentant une dégénérescence induite par nucléotomie (Pereira et al. 2014, 2018). Le recours à un tissu naturellement dégénéré est, à notre connaissance, une première dans l'évaluation de stratégies de recrutement cellulaire suivi de réparation endogène du DIV. L'avantage de disposer d'un tel modèle concerne la similitude des processus de dégénérescence avec ceux se déroulant chez l'Homme. En effet, comme chez l'Homme, la brebis présente une dégénérescence discale naturelle qui survient avec le vieillissement (Alini et al. 2008; Nisolle et al. 2016). De plus, contrairement à ce que l'utilisation d'un animal quadrupède pourrait laisser penser, la répartition des contraintes mécaniques auxquelles est soumis un DIV de brebis est relativement proche de celles reçues par un DIV humain (Wilke, Kettler, and Claes 1997; Wilke et al. 1997). Ainsi, par ce modèle *ex vivo* de DIV ovins naturellement dégénérés, nous testons notre système dans un microenvironnement proche de la réalité. Ce modèle est dans ce sens un atout majeur de notre étude. Cependant l'utilisation d'un tissu naturellement dégénéré est également associée à plusieurs contraintes techniques, qui compliquent alors les différentes étapes du protocole, du prélèvement à l'analyse histologique du tissu. En effet, l'isolement du rachis, puis des DIV lombaires s'est avéré beaucoup plus complexe chez les brebis âgées. La

taille et la résistance des os de celles-ci ont entraîné des difficultés lors de l'isolement du rachis puis des DIV. De plus, l'importance de l'ablation des corps vertébraux (CV) mais de la conservation des plateaux cartilagineux (PC) a été démontrée comme essentielle à la culture au long terme des DIV. Ainsi, dans certains cas, la finesse des PC et la présence d'ostéophytes aux jonctions entre les PC et les CV a rendu particulièrement difficile l'isolement des DIV, sans lésion de ceux-ci. Concernant l'analyse histologique, malgré la fixation puis la décalcification des DIV après la culture *ex vivo* et avant le traitement histologique du tissu, la présence d'ostéophytes ou de calcifications a gêné la coupe de certains tissus. De nombreux problèmes de décollement des coupes durant les colorations et immunohistochimies ont également été rencontrés. Malgré toutes ces difficultés techniques, l'évaluation de la migration et de la régénérescence matricielle du tissu a pu être réalisée. Nous avons ainsi démontré que les systèmes CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs permettent de recruter des CSA humaines des PC vers le NP (*Figure 5 de l'article expérimental*). Une augmentation de la distance de migration des CSA ensemencées ($n=3$; donneurs D, E et G) comparée aux DIV non injectés en PMBs chargées a été évaluée ($5,8 \pm 1,3$ mm vs $3,5 \pm 1,8$ mm à J28) (*Figure 5.C de l'article expérimental*). De plus, une augmentation de la densité cellulaire au sein des NP a été observée après 7 jours et 28 jours de culture dans les cas de DIV ensemencés en CSA humaines et injectées en PMBs chargées, par rapport aux DIV contrôles (*Figure 6.C de l'article expérimental*).

Nous pouvons alors émettre les hypothèses suivantes :

- soit cette augmentation peut être due à la migration des CSA ensemencées des PC vers les NP,
- soit cette augmentation peut être due à la migration des cellules souches endogènes des structures périphériques du DIV vers le NP,
- soit cette augmentation peut être due à une prolifération des NPCy résidents.

Afin de valider ou infirmer ces hypothèses, certaines analyses immunohistochimiques peuvent être envisagées et devront être par la suite réalisées. Il s'agit notamment d'évaluer la présence d'antigènes de type anti-mitochondrie humaine afin de différencier les cellules humaines ensemencées, des cellules endogènes du tissu ; et anti-KI67, marqueur de la prolifération cellulaire permettant de comparer les activités prolifératives au niveau du NP selon les conditions. Dans l'idéal un co-marquage de ces deux antigènes permettrait de réellement identifier la nature et l'origine des cellules identifiées. De plus la réalisation d'analyses

immunohistochimiques spécifiques des marqueurs de migration cellulaire semble également très intéressante à réaliser. Il s'agit notamment des marqueurs SNAIL1 et SLUG, qui ont été mis en évidence au niveau de DIV de lapins (H. B. Henriksson et al. 2012).

En parallèle de ces résultats, des analyses immunohistochimiques anti-Tie2 ont été réalisées, permettant d'évaluer la présence et la localisation de cellules progénitrices dans les DIV cultivés *ex vivo*. Étonnamment, de nombreuses cellules Tie2 positives ont été observées sur l'ensemble des coupes de DIV dégénérés, pour chaque groupe, après 3 jours de culture *ex vivo* au niveau des zones de transitions (ZT) et des NP (*Figure 8 de l'article expérimental*). Cependant, après 7 jours de culture, nous avons observé une diminution de la présence de cellules Tie2 positives au niveau des NP des groupes sans CSA humaines ensemencées (groupes DIV intacts et PMBs chargées) et du groupe ensemencé en CSA humaines mais non injecté en PMBs chargées (groupe hCSA). Au contraire, dans le groupe des DIV ensemencés avec des CSA humaines puis injectés avec des PMBs chargées, de nombreuses cellules Tie2 positives ont été mises en évidence à chaque temps de culture (3, 7 et 28 jours), en particulier au niveau des NP. Le récepteur Tie2, est présent au sein des NP de DIV humains, de souris et de chien (Sakai et al. 2018). Cependant, la diminution de son expression avec le vieillissement et la DD a été décrite (Sakai et al. 2012). Les résultats obtenus ici, démontrent le maintien de la présence de ce marqueur des cellules progénitrices, avec le temps de culture *ex vivo*, au sein de DIV dégénérés, injectés en PMBs chargées en CCL5, TGF- β 1 et GDF-5, et ensemencés avec des CSA humaines. Nous pouvons alors émettre les hypothèses suivantes :

- soit ce maintien peut être dû à la migration des CSA humaines ensemencées des PC vers les NP,
- soit ce maintien peut être dû à la migration de cellules Tie2 positives endogènes des structures périphériques du DIV vers les NP,
- soit ce maintien peut être dû à la maintenance de l'expression du récepteur Tie2 par les cellules progénitrices du NP.

La réalisation de co-marquages anti-Tie2 et anti-mitochondrie humaine permettrait de valider ou infirmer la première hypothèse.

Enfin, nous avons évalué l'effet des facteurs de croissance libérés des PMBs sur la stimulation de la synthèse d'une nouvelle MEC saine de type nucléopulpogénique. Les colorations au bleu alcian réalisées, ont permis de suggérer la présence d'une quantité supérieure de GAG au sein

des NP, en présence des PMBs chargées (*Figure 6.A de l'article expérimental*). Cette augmentation pourrait être due à la synthèse d'une nouvelle MEC par stimulation des activités anaboliques des cellules discales résidentes ou des CSA humaines ensemencées puis recrutées. De plus, les analyses immunohistochimiques anti-collagène de type II et anti-agrécan ont démontré un marquage plus important et intense, respectivement, au niveau de la MEC ou des cellules du NP, des DIV injectés en PMBs chargées et ensemencés en CSA humaines, par rapport au DIV intact (*Figure 7 de l'article expérimental*). L'analyse du remodelage de la MEC reste encore à approfondir et l'impact des facteurs sur l'orientation des cellules souches ayant migrées en cellules de type NPCy est en cours d'évaluation avec la réalisation d'analyses immunohistochimiques anti-OVOS2, PAX1 et CD24 (marqueurs spécifiques des NPCy étudiés au cours des analyses *in vitro*). De plus des dosages de GAG et collagène pourraient constituer une prochaine étape à l'exploration de la synthèse d'une nouvelle MEC saine au sein des DIV traités, nécessitant cependant une nouvelle étude avec prélèvement de nouveaux DIV.

Finalement, il est important de se rappeler que l'évaluation d'un potentiel effet régénératif n'est possible que par le biais d'études *in vivo* permettant de comparer le tissu avant et après traitement par la même méthode, l'imagerie médicale. En effet, la complexité de l'analyse de ces résultats relève également du fait de l'importante variabilité des paramètres à prendre en compte. De façon identique aux autres études *ex vivo* portant sur des stratégies de régénérescence semblables, les DIV comparés diffèrent sur plusieurs points. Ils proviennent d'étages lombaires variés et d'individus distincts présentant des âges différents et finalement des états de dégénérescence unique. L'idéal serait de pouvoir comparer chaque DIV à lui-même avant et après traitement, ce que ne nous permet pas ce type d'étude *ex vivo*. Un modèle *ex vivo* de dégénérescence discale induite présente l'avantage d'être plus reproductible qu'un tissu naturellement dégénéré. En parallèle de cette étude, un travail que j'ai pu encadrer a été réalisé par un second étudiant en Master 2, neurochirurgien également de formation. Son sujet portait sur la mise en place d'un modèle *ex vivo* de DIV ovin présentant une dégénérescence discale induite à l'aide d'un laser (Edouard Samarut, RMeS, INSERM U1229, 2018-2019). Le choix de la méthode d'induction de la dégénérescence a été discuté. Il s'agissait de choisir entre 2 techniques préalablement testées au laboratoire, chez le lapin (Fusellier et al. 2016) :

- La technique de déshydratation du NP par laser

- La technique enzymatique par traitement du NP avec de la hyaluronidase

Bien que ces deux techniques aient démontré une induction de la DD au niveau de la MEC du NP, l'induction au laser plus progressive permettrait de mimer davantage les mécanismes de DD. De plus, une induction ponctuelle par laser nous semble plus adaptée à l'étude de la migration cellulaire au sein du microenvironnement discal. Les enzymes présentent des effets au long terme potentiellement toxiques pour les cellules, ce qui pourrait biaiser ainsi l'étude de leur migration. Ainsi les DIV lombaires d'une brebis jeune (1 an) ont été prélevés puis l'induction par le laser a été réalisée. La culture *ex vivo* a été réalisée durant 14 (2 DIV) et 21 (2 DIV) jours. L'analyse histologique de la DD matricielle est en cours de réalisation. La mise en place de ce modèle permettra alors de réitérer la preuve de concept dans un modèle *ex vivo* de DIV dégénéré plus contrôlable et reproductible et ainsi compléter les analyses d'ores et déjà réalisées dans le modèle *ex vivo* de DD spontanée. De plus, le recours à un bioréacteur, permettant de simuler les contraintes mécaniques soumises *in vivo* par le DIV, semble intéressant pour la suite de notre étude, afin d'étudier les effets des contraintes mécaniques sur la migration cellulaire et sur le remodelage de la MEC.

Finalement, une limite commune avec les autres études travaillant sur le développement de thérapies basées sur l'existence de ces cellules souches discales, concerne la nécessité d'utiliser des cellules modèles et non les cellules souches discales cibles. En effet, ces dernières étant difficiles d'accès, l'ensemble des expérimentations effectuées dans cette étude ont été réalisées avec des CSA humaines en tant que cellules modèles, mimant les cellules souches discales. Les études de caractérisation des cellules souches discales ont mis en évidence l'expression de marqueurs des cellules souches et leur capacité à se différencier dans la voie mésenchymateuse. Les similitudes des cellules souches discales avec des CSM ont alors souvent été décrites. Ainsi, les études préalables qui évaluent les capacités de migration cellulaire au sein de modèle *ex vivo* de DIV, se sont tournées principalement vers l'utilisation de CSM issues de la moelle osseuse. Cependant ces dernières présentent également des difficultés d'accessibilité, liées à des morbidités au niveau du site donneur et à une faible quantité de ces CSM. Dans cette étude, nous avons alors décidé de travailler avec des CSM humaines provenant du tissu adipeux (CSA). L'accessibilité et la plus grande quantité de ces CSA en font des candidates prometteuses. Pour ces raisons, les CSA humaines ont déjà été utilisées dans les travaux antérieurs étudiant l'association des PMBs avec les facteurs de

croissance TGF- β 1 et GDF-5 et ceux évaluant le rôle de ces deux facteurs de croissance dans la mise en place du protocole de différenciation nucléopulpogénique.

Ainsi, la réalisation d'études *in vivo* sur le long terme reste nécessaire afin d'évaluer le réel potentiel régénératif de ce système de microbilles chargées en chimiokines et facteurs de croissance. A court terme, le laboratoire envisage la réalisation d'une étude *in vivo* d'injection intradiscale par voie trans-annulaire des systèmes CCL5/PMBs, TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs. Cette étude serait réalisée chez des brebis âgées d'environ 5 ans, présentant une DD modérée (grade de Pfirrmann entre 2 et 3), avec des temps d'études de 3 et 6 mois. Préalablement à l'injection et à chaque temps d'étude, la réalisation d'IRM et de radiologies du rachis sera effectuée afin de comparer le niveau d'hydratation et la hauteur discale des DIV inclus dans cette étude, avant et après traitement. Cette étude permettra de faire la preuve de concept de la capacité de migration des cellules endogènes et de leur utilisation en tant que cellules régénératrices en vue d'une réparation endogène du DIV. En perspective de ces futurs essais pré-cliniques, l'ensemble des expérimentations *in vitro* de migration cellulaire a été également réalisé, de manière similaire aux CSA humaines, avec des CSA de brebis (*Figure 27*). Ces études ont permis de démontrer l'effet sur la migration cellulaire *in vitro* du CCL5 d'origine humaine sur des CSM de brebis.

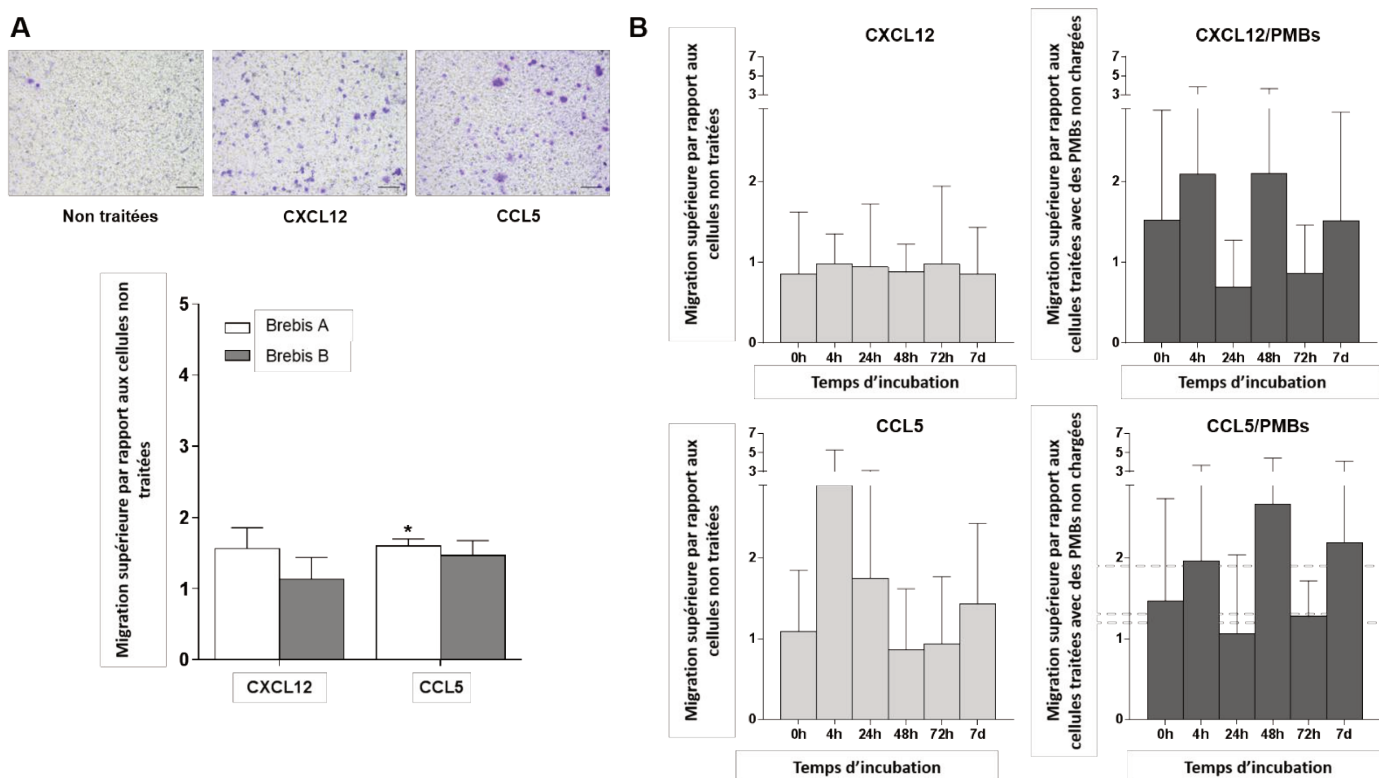


Figure 27 : Evaluation de la bioactivité in vitro des chimiokines CXCL12 et CCL5 sur la migration de CSA ovines.

(A) Effet du CXCL12 ou du CCL5 sur la migration des CSA ovines. La migration in vitro des CSA ovines traitées avec du CXCL12 (250 ng/mL dans du DMEM/0,1 % p/v BSA) ou du CCL5 (250 ng/mL dans du DMEM/0,1 % p/v BSA), ou des cellules non traitées (DMEM/0,1 % p/v BSA) pendant 4 heures est présentée. Images microscopiques représentatives de la face inférieure des inserts, montrant des cellules recrutées colorées par le cristal violet (barre d'échelle 100 μ m). Les résultats sont des expressions relatives pour chacune des 2 brebis par rapport à leur propre groupe témoin (cellules non traitées) et sont présentés sous forme de valeurs moyennes $\pm$ écart-type des expériences en trois exemplaires, (B) Bioactivité prolongée du CXCL12 ou du CCL5 libéré des PMBs. L'effet des chimiokines libres et des chimiokines libérées des PMB a été évalué sur les CSA ovines en fonction du temps d'incubation. Du CXCL12 libre (4 μ g/mL), CCL5 libre (4 μ g/mL), des CXCL12/PMBs (concentration de charge initiale 4 μ g/mL) ou des CCL5/PMBs (concentration de charge initiale 4 μ g/mL), tous dans du DMEM/0,1 % p/v BSA, ont été incubés à 37°C. À des temps précis (solution ou suspension fraîche, 4h, 24h, 48h, 72h et 7 jours d'incubation), les CSA ovines sont ensemencées sur les inserts de Transwell, puis un test de migration est effectué pendant 4 heures, avec les cellules en contact avec les chimiokines libres incubées (à gauche) ou les microbilles chargées en CXCL12 ou CCL5 (CXCL12/PMB ou CCL5/PMB) (à droite). Les résultats sont des expressions relatives du nombre de cellules ayant migrées par rapport aux cellules non traitées, à chaque temps donné, regroupées pour les deux brebis. Pour les chimiokines libres et les chimiokines chargées sur les PMBs, les cellules non traitées ont été incubées soit avec du DMEM/0,1 % p/v BSA, soit avec des PMB non chargés, respectivement. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes $\pm$ écart-type de 2 brebis, toutes les expériences sont réalisées en triple exemplaire. * représente une différence significative avec les cellules non traitées, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA bidirectionnelle, post-test de Bonferroni, # représente une différence significative avec CXCL12, ## $p < 0,01$, ANOVA bidirectionnelle, post-test de Bonferroni. Abréviations : CXCL12 : ligand 12 de chimiokine (motif CXC) ; CCL5 : Chimiokine (motif C-C) ligand 5 ; CSA : Cellules souches adipeuses ; BSA : Albumine de sérum bovin ; PMBs : Microbilles de Pullulane.

Cependant la réalisation de tels essais *in vivo* pré-cliniques chez l'ovin, nécessite l'évaluation préalable de l'existence de cellules souches discales, de manière similaire à l'humain, le lapin, le rat et le porc (H. Henriksson et al. 2009). Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé des analyses immunohistochimiques anti-Oct3/4, marqueur de l'auto-renouveaulement et des capacités de multipotence des cellules souches, sur des coupes de DIV ovins. Ces évaluations préliminaires ont permis d'observer quelques cellules Oct4 positif dans un DIV lombaire issus d'une jeune brebis (1 an). Ces analyses sont à poursuivre sur plusieurs DIV provenant de différentes brebis. En parallèle, les marquages du récepteur Tie2 réalisés ont également permis de détecter la présence de cellules Tie2 positives au sein des DIV lombaires issus de brebis âgées (3 à 7 ans). Ces premiers résultats encourageants restent à approfondir, notamment par l'analyse des facteurs des cellules souches / progénitrices discales mis en évidence chez l'humain, tels que les marqueurs CD90, CD44, CD105 ou CD73. Ces analyses devront être effectuées sur des DIV sains et dégénérés provenant de brebis d'âges jeunes et élevés. Ces évaluations permettront alors de vérifier si les cellules souches / progénitrices discales diminuent avec le vieillissement, de manière identique à chez l'humain, et si la réalisation d'études précliniques chez la brebis âgées sont possible.

Durant ma thèse j'ai également participé à une étude pré-clinique réalisée chez la brebis âgée de 5 ans, dans le cadre de l'ANR REMEDIV et des thèses de Nora Bouhsina et Cyrille Decante (RMeS, INSERM UMR1229, 2018-2021). Cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet une stratégie de thérapie cellulaire combinant CSA humaines et PMBs chargées en facteurs de croissance (TGF- β 1 et GDF-5), le tout mélangé à un hydrogel injectable d'HPMC-Si. L'hydrogel d'HPMC-Si présente différentes caractéristiques. Il est auto-réculant et injectable. Sa biocompatibilité a été démontrée ainsi que sa biofonctionnalité en particulier dans la cadre d'indications liées au cartilage articulaire (Vinatier et al. 2009; Portron et al. 2013). Cette chimie a fait l'objet de plusieurs brevets (Weiss et al. 2011, 2016) et sujets de thèse (Xavier Bourges, Ahmed Fatimi, Xavier Guillory) et les hydrogels formulés par cette réaction chimique ont été utilisés dans de nombreux autres projets (Claire Vinatier, Nela Buchtová, Nina Henry, Christophe Merceron, Pauline Chichiricco et Eva Mathieu pour n'en citer qu'une partie). Au regard de sa composition (polysaccharide, hautement hydraté) et les similitudes avec la MEC du NP, cet hydrogel d'HPMC-Si représente un candidat prometteur pour une utilisation discale (Henry et al. 2017). L'association des PMBs chargées en facteurs de croissance à cet hydrogel

avait déjà fait l'objet d'une caractérisation préalable au laboratoire (Nina Henry, RMeS, INSERM U1229, 2013-2017 et Constantin Moraru, RMeS, INSERM U1229, 2017-2018). Les contrôles réalisés pour l'étude *in vivo*, consistaient à injecter des PMBs chargées en facteurs de croissance seules, ou combinées à de l'HPMC-Si. Leurs analyses nous permettront alors d'avoir une première évaluation de la régénérescence du tissu discal par ce système de libération de TGF- β 1 et GDF-5.

PARTIE IV : CONCLUSIONS GENERALES

En conclusion de ce travail, le développement d'une stratégie de réparation endogène du DIV basée sur l'utilisation des cellules souches / progénitrices récemment découvertes, apparaît comme une alternative prometteuse. Cette approche permettrait de re-peupler le NP tout en évitant l'injection de cellules exogènes non adaptées au microenvironnement complexe du DIV. Cela permettrait également de lever quelques obstacles technique, technologique et réglementaire. Dans cet objectif, le recrutement de cellules souches discales présentes au sein de niches périphériques vers le centre du tissu dégénéré, le NP, constitue la première étape essentielle à la mise en place d'une telle stratégie. Cependant, la DD entraîne un dérèglement profond de l'homéostasie discale, avec une perte des fonctions anaboliques du tissu et une dégradation importante de la MEC du NP. Il semble alors primordial de stimuler ces cellules recrutées en vue de la synthèse d'une nouvelle MEC de type nucléopulpogénique (riche en agrécan et collagène de type II). Ainsi, la libération séquentielle d'une chimiokine telle que le CCL5, suivie de la libération prolongée dans le temps des deux facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5, par un système de microbilles de pullulane a été étudiée dans ce travail. Les résultats *in vitro* ont permis d'observer la mise en place d'un système à libération séquentielle et prolongée de ces différents facteurs biologiques. Le maintien de la bioactivité des facteurs libérés des PMBs a ensuite été étudié *in vitro*. Nous avons pu démontrer le maintien de la stimulation de la migration cellulaire par le système CCL5/PMBs, ainsi que la stimulation de la synthèse par les CSA d'une MEC de type nucléopulpogénique par l'association des systèmes TGF- β 1/PMBs et GDF-5/PMBs. A la suite de ces résultats *in vitro*, la preuve de concept dans un modèle *ex vivo* ovin de DD naturelle a été effectuée, par ensemencement de CSA humaines sur la partie supérieure d'un des plateaux cartilagineux. Les prochaines étapes consistent à confirmer la présence de cellules souches / progénitrices au sein des DIV de brebis et ensuite de réaliser une étude *in vivo* pré-clinique chez la brebis présentant une dégénérescence discale spontanée. Le système de libération séquentielle ici développé et étudié, composé de la chimiokine CCL5 et des facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5 chargés dans des microbilles de pullulane, constitue une approche prometteuse dans la mise en place d'une stratégie de réparation endogène des DIV précocement et modérément dégénérés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acosta, Frank L., Lionel Metz, Huston Davis Adkisson, Jane Liu, Ellen Carruthers-Liebenberg, Curt Milliman, Michael Maloney, and Jeffrey C. Lotz. 2011. "Porcine Intervertebral Disc Repair Using Allogeneic Juvenile Articular Chondrocytes or Mesenchymal Stem Cells." *Tissue Engineering Part A* 17: 23-24. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0229>.
- Adams, Michael A., Polly Lama, Uruj Zehra, and Patricia Dolan. 2015. "Why Do Some Intervertebral Discs Degenerate, When Others (in the Same Spine) Do Not?" *Clinical Anatomy* 28:195–204. <https://doi.org/10.1002/ca.22404>.
- Adams, Michael A., and Peter J. Roughley. 2006. "What Is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It?" *Spine* 31 (18): 2151–61. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c>.
- Agrawal, A., A. Guttapalli, S. Narayan, T. J. Albert, I. M. Shapiro, and M. V. Risbud. 2007. "Normoxic Stabilization of HIF-1 Drives Glycolytic Metabolism and Regulates Aggrecan Gene Expression in Nucleus Pulposus Cells of the Rat Intervertebral Disk." *AJP: Cell Physiology* 293 (2): C621–31. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00538.2006>.
- Aguiar, Dean J., Sandra L. Johnson, and Theodore R. Oegema. 1999. "Notochordal Cells Interact with Nucleus Pulposus Cells: Regulation of Proteoglycan Synthesis." *Experimental Cell Research* 246 (1): 129–37. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4287>.
- Ahn, Sang Ho, Yoon Woo Cho, Myun Whan Ahn, Sung Ho Jang, Yoon Kyung Sohn, and Hee Sun Kim. 2002. "MRNA Expression of Cytokines and Chemokines in Herniated Lumbar Intervertebral Discs." *Spine* 27(9):911-917. <https://doi.org/10.1097/00007632-200205010-00005>.
- Aigner, T, K R Gresk-otter, J C Fairbank, K von der Mark, and J P Urban. 1998. "Variation with Age in the Pattern of Type X Collagen Expression in Normal and Scoliotic Human Intervertebral Discs." *Calcified Tissue International* 63 (3): 263–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701632>.
- Ain, David L, David P Slovt, Ravi Kamath, and Michael R Jaff. 2012. "The Association between Peripheral Artery and Lumbar Spine Disease: A Single-Center Study." *The American Journal of Medicine* 125 (4): 411–15. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.09.008>.
- Airaksinen, O., J. I. Brox, C. Cedraschi, J. Hildebrandt, J. Klaber-Moffett, F. Kovacs, A. F. Mannion, et al. 2006. "Chapter 4: European Guidelines for the Management of Chronic Nonspecific Low Back Pain." *European Spine Journal* 15 (2) 192-300. <https://doi.org/10.1007/s00586-006-1072-1>.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2014. "Cell Junction and the Extracellular Matrix. Molecular Biology of the Cell." *Elsevier Current Trends*, no. 6.
- Alini, Mauro, Stephen M. Eisenstein, Keita Ito, Christopher Little, A. Annette Kettler, Koichi Masuda, James Melrose, Jim Ralphs, Ian Stokes, and Hans Joachim Wilke. 2008. "Are Animal Models Useful for Studying Human Disc Disorders/Degeneration?" *European Spine Journal* 17, pages2–19. <https://doi.org/10.1007/s00586-007-0414-y>.
- Anaes. 2000. "Diagnostic , Prise En Charge et Suivi Des Malades Atteints de Lombalgie Chronique Décembre 2000." *Anaes*, 95 69 (3) 183-344. <https://doi.org/10.1016/S1169->

8330(02)00303-4.

- Anderson, D. Greg, and Chadi Tannoury. 2005. "Molecular Pathogenic Factors in Symptomatic Disc Degeneration." *Spine Journal* 5 (6) S2260-S266. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2005.02.010>.
- Andersson, Gunnar B J. 1999. "Epidemiological Features of Chronic Low-Back Pain." *The Lancet* 354 (9178): 581–85. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01312-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01312-4).
- Andronis, Lazaros, Philip Kinghorn, Suyin Qiao, David G. T. Whitehurst, Susie Durrell, and Hugh McLeod. 2017. "Cost-Effectiveness of Non-Invasive and Non-Pharmacological Interventions for Low Back Pain: A Systematic Literature Review." *Applied Health Economics and Health Policy* 15 (2): 173–201. <https://doi.org/10.1007/s40258-016-0268-8>.
- Arndt, Joseph, Yann Philippe Charles, Christelle Koebel, Ioan Bogorin, and Jean-Paul Steib. 2012. "Bacteriology of Degenerated Lumbar Intervertebral Disks." *Journal of Spinal Disorders & Techniques* 25 (7): E211–16. <https://doi.org/10.1097/BSD.0b013e318269851a>.
- Bartels, E M, J C Fairbank, C P Winlove, and J P Urban. 1998. "Oxygen and Lactate Concentrations Measured in Vivo in the Intervertebral Discs of Patients with Scoliosis and Back Pain." *Spine* 23(1):8. <https://doi.org/10.1097/00007632-199801010-00002>.
- Battié, Michele C., Tapio Videman, Jaakko Kaprio, Laura E. Gibbons, Kevin Gill, Hannu Manninen, Janna Saarela, and Leena Peltonen. 2009. "The Twin Spine Study: Contributions to a Changing View of Disc Degeneration†." *Spine Journal* 9(1):47-59. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2008.11.011>.
- Bechmann, Ingo, Gil Mor, Jon Nilsen, Mariel Eliza, Robert Nitsch, and Frederick Naftolin. 1999. "FasL (CD95L, Apo1L) Is Expressed in the Normal Rat and Human Brain: Evidence for the Existence of an Immunological Brain Barrier." *GLIA* 27 (1): 62–74. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199907\)27:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199907)27:1).
- Bedore, Jake, Andrew Leask, and Cheryle A. Séguin. 2014. "Targeting the Extracellular Matrix: Matricellular Proteins Regulate Cell-Extracellular Matrix Communication within Distinct Niches of the Intervertebral Disc." *Matrix Biology* 37: 124–30. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.05.005>.
- Bellgrau, D, D Gold, H Selawry, J Moore, A Franzusoff, and R C Duke. 1995. "A Role for CD95 Ligand in Preventing Graft Rejection." *Nature* 377, 630–632. <https://doi.org/10.1038/377630a0>.
- Berenbaum, Francis, and Jérémie Sellam. 2008. "Obesity and Osteoarthritis: What Are the Links?" *Joint Bone Spine* 75 (6) 667-668. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2008.07.006>.
- Blanco, Juan F., Ignacio F. Graciani, Fermin M. Sanchez-Guijo, Sandra. Muntión, Pilar. Hernandez-Campo, Carlos. Santamaria, Soraya. Carrancio, et al. 2010. "Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Degenerated Nucleus Pulposus: Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells from the Same Subjects." *Spine* 35 (26): 2259–65. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181cb8828>.
- Blanquer, S. B G, D. W. Grijpma, and A. A. Poot. 2015. "Delivery Systems for the Treatment of

- Degenerated Intervertebral Discs." *Advanced Drug Delivery Reviews* 84: 172–87. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.024>.
- Bono, Christopher M, and Steven R Garfin. 2004. "History and Evolution of Disc Replacement." *The Spine Journal : Official Journal of the North American Spine Society* 4 (6 Suppl): 145S-150S. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2004.07.005>.
- Boos, Norbert, Sabine Weissbach, Helmut Rohrbach, Christoph Weiler, Kevin F. Spratt, and Andreas G. Nerlich. 2002. "Classification of Age-Related Changes in Lumbar Intervertebral Discs: 2002 Volvo Award in Basic Science." *Spine* 27(23):2631-2644. <https://doi.org/10.1097/00007632-200212010-00002>.
- Borenstein, David. 2013. "Mechanical Low Back Pain - A Rheumatologist's View." *Nature Reviews Rheumatology* 9: 643–653. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.133>.
- Brisby, Helena, Nikolaos Papadimitriou, Camilla Brantsing, Peter Bergh, Anders Lindahl, and Helena Barreto Henriksson. 2013. "The Presence of Local Mesenchymal Progenitor Cells in Human Degenerated Intervertebral Discs and Possibilities to Influence These In Vitro: A Descriptive Study in Humans." *Stem Cells and Development* 22 (5): 804–14. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0179>.
- Buckwalter, J A, R R Cooper, and J A Maynard. 1976. "Elastic Fibers in Human Intervertebral Discs." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 58-A (1): 73–76. <http://jbjs.org/content/58/1/73.abstract>.
- Buttle, D J. 2007. "Factors Controlling Matrix Turnover in Health and Disease." *Biochemical Society Transactions* 35 (Pt 4): 643–46. <https://doi.org/10.1042/BST0350643>.
- Campisi, Judith, Julie K. Andersen, Pankaj Kapahi, and Simon Melov. 2011. "Cellular Senescence: A Link between Cancer and Age-Related Degenerative Disease?" *Seminars in Cancer Biology* 21 (6): 354-359. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2011.09.001>.
- Chelberg, M K, G M Banks, D F Geiger, and T R Oegema. 1995. "Identification of Heterogeneous Cell Populations in Normal Human Intervertebral Disc." *Journal of Anatomy* 186 (Pt 1): 43–53.
- Chen, J., W. Yan, and L. A. Setton. 2005. "Molecular Phenotypes of Notochordal Cells Purified from Nucleus Pulposus via Fluorescence-Activated Cell Sorting." In *European Cells and Materials*, 15 (Suppl3): 303-311. <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0088-x>.
- Cheung, Kenneth M. C., Jaro Karppinen, Danny Chan, Daniel W. H. Ho, You-Qiang Song, Pak Sham, Kathryn S. E. Cheah, John C. Y. Leong, and Keith D. K. Luk. 2009. "Prevalence and Pattern of Lumbar Magnetic Resonance Imaging Changes in a Population Study of One Thousand Forty-Three Individuals." *Spine* 34 (9): 934–40. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181a01b3f>.
- Choi, Hyowon, Zariel I Johnson, and Makarand V Risbud. 2015. "Understanding Nucleus Pulposus Cell Phenotype: A Prerequisite for Stem Cell Based Therapies to Treat Intervertebral Disc Degeneration." *Current Stem Cell Research & Therapy* 10 (4): 307–16. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3380>.
- Chou, Roger, Amir Qaseem, Vincenza Snow, Donald Casey, Thomas J. Cross, Paul Shekelle, and Douglas K. Owens. 2007. "Diagnosis and Treatment of Low Back Pain: A Joint Clinical

- Practice Guideline from the American College of Physicians and the American Pain Society.” *Annals of Internal Medicine* 147(7):478-491. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-147-7-200710020-00006>.
- Chujo, Takehide, Howard S. An, Koji Akeda, Kei Miyamoto, Carol Muehleman, Mohamed Attawia, Gunnar Andersson, and Koichi Masuda. 2006. “Effects of Growth Differentiation Factor-5 on the Intervertebral Disc - In Vitro Bovine Study and in Vivo Rabbit Disc Degeneration Model Study.” *Spine* 31 (25): 2909–17. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000248428.22823.86>.
- Clouet, Johann, Marion Fusellier, Anne Camus, Catherine Le Visage, and Jérôme Guicheux. 2018. “Intervertebral Disc Regeneration: From Cell Therapy to the Development of Novel Bioinspired Endogenous Repair Strategies.” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146: 306-324. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.017>.
- Clouet, Johann, Claire Vinatier, Christophe Merceron, Marianne Pot-Vaucel, Olivier Hamel, Pierre Weiss, Gaël Grimandi, and Jérôme Guicheux. 2009. “The Intervertebral Disc: From Pathophysiology to Tissue Engineering.” *Joint Bone Spine* 76 (6): 614-618. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.07.002>.
- Colombier, Pauline. 2016. “Médecine Régénératrice Du Disque Intervertébral: Intérêt Des Cellules Souhes Mésenchymateuses et Pluripotentes Induites.”
- Colombier, Pauline, Johann Clouet, Cécile Boyer, Maëva Ruel, Gaëlle Bonin, Julie Lesoeur, Anne Moreau, et al. 2016. “TGF-B1 and GDF5 Act Synergistically to Drive the Differentiation of Human Adipose Stromal Cells toward Nucleus Pulposus-like Cells.” *Stem Cells* 34 (3): 653–67. <https://doi.org/10.1002/stem.2249>.
- Colombier, Pauline, Johann Clouet, Olivier Hamel, Laurent Lescaudron, and Jérôme Guicheux. 2013. “The Lumbar Intervertebral Disc: From Embryonic Development to Degeneration.” *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme* 81 (2): 125–29. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.07.012>.
- D’Este, Matteo, David Eglin, and Mauro Alini. 2018. “Lessons to Be Learned and Future Directions for Intervertebral Disc Biomaterials.” *Acta Biomaterialia* 15 (78): 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.004>.
- Deyo, Richard A., and Sohail K. Mirza. 2006. “Trends and Variations in the Use of Spine Surgery.” In *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 443: 139–46. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000198726.62514.75>.
- Dionne, Clermont E., Kate M. Dunn, and Peter R. Croft. 2006. “Does Back Pain Prevalence Really Decrease with Increasing Age? A Systematic Review.” *Age and Ageing* 35 (3): 229-234. <https://doi.org/10.1093/ageing/afj055>.
- Donald A. Neumann. 2010. *Kinesiology of the Musculoskeletal System, Foundations for Rehabilitation*. Ebook Elsevier 9780323527996.
- Dudhia, J. 2005. “Aggrecan, Aging and Assembly in Articular Cartilage.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (19-20): 2241-2256. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5217-x>.
- Eerenbeemt, Karin D. Van Den, Raymond W. Ostelo, Barend J. Van Royen, Wilco C. Peul, and Maurits W. Van Tulder. 2010. “Total Disc Replacement Surgery for Symptomatic

- Degenerative Lumbar Disc Disease: A Systematic Review of the Literature." *European Spine Journal* 19 (8): 1262-1280. <https://doi.org/10.1007/s00586-010-1445-3>.
- Elliott, Dawn M., Chandra S. Yerramalli, Jesse C. Beckstein, John I. Boxberger, Wade Johannessen, and Edward J. Vresilovic. 2008. "The Effect of Relative Needle Diameter in Puncture and Sham Injection Animal Models of Degeneration." *Spine* 33(6):588-596. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318166e0a2>.
- Elsaid, K. A., G. D. Jay, M. L. Warman, D. K. Rhee, and C. O. Chichester. 2005. "Association of Articular Cartilage Degradation and Loss of Boundary-Lubricating Ability of Synovial Fluid Following Injury and Inflammatory Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 52 (6): 1746–55. <https://doi.org/10.1002/art.21038>.
- Engelhardt, Britta, Peter Vajkoczy, and Roy O. Weller. 2017. "The Movers and Shapers in Immune Privilege of the CNS." *Nature Immunology* 18: 123–131. <https://doi.org/10.1038/ni.3666>.
- Erwin, W. Mark. 2008. "The Notochord, Notochordal Cell and CTGF/CCN-2: Ongoing Activity from Development through Maturation." *Journal of Cell Communication and Signaling* 2: 59-65. <https://doi.org/10.1007/s12079-008-0031-5>.
- Erwin, W. Mark, Keith Ashman, Paul O'Donnel, and Robert D. Inman. 2006. "Nucleus Pulposus Notochord Cells Secrete Connective Tissue Growth Factor and Up-Regulate Proteoglycan Expression by Intervertebral Disc Chondrocytes." *Arthritis and Rheumatism* 54 (12): 3859–67. <https://doi.org/10.1002/art.22258>.
- Fairbank, Jeremy, Helen Frost, James Wilson-MacDonald, Ly Mee Yu, Karen Barker, and Rory Collins. 2005. "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." *British Medical Journal* 330 (7502): 1233–39. <https://doi.org/10.1136/bmj.38441.620417.8F>.
- Feng, Chencheng, Huan Liu, Yang Yang, Bo Huang, and Yue Zhou. 2015. "Growth and Differentiation Factor-5 Contributes to the Structural and Functional Maintenance of the Intervertebral Disc." *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 35: 1-16. <https://doi.org/10.1159/000369670>.
- Feng, Gang, Xinlin Yang, Hulan Shang, Ian W. Marks, Francis H. Shen, Adam Katz, Vincent Arlet, Cato T. Laurencin, and Xudong Li. 2010. "Multipotential Differentiation of Human Anulus Fibrosus Cells: An in Vitro Study." *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 92 (3): 675–85. <https://doi.org/10.2106/JBJS.H.01672>.
- Fontana, Gianluca, Eugene See, and Abhay Pandit. 2015. "Current Trends in Biologics Delivery to Restore Intervertebral Disc Anabolism." *Advanced Drug Delivery Reviews* 84: 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.008>.
- Fournier, L. Le, M. Fusellier, B. Halgand, J. Lesoeur, O. Gauthier, Philippe Menei, Claudia Montero-Menei, Jérôme Guicheux, and Johann Clouet. 2017. "The Transpedicular Surgical Approach for the Development of Intervertebral Disc Targeting Regenerative Strategies in an Ovine Model." *European Spine Journal* 26 (8): 1272-2083. <https://doi.org/10.1007/s00586-017-5199-z>.

- Frapin, Leslie, Johann Clouet, Vianney Delplace, Marion Fusellier, Jérôme Guicheux, and Catherine Le Visage. 2019. "Lessons Learned from Intervertebral Disc Pathophysiology to Guide Rational Design of Sequential Delivery Systems for Therapeutic Biological Factors." *Advanced Drug Delivery Reviews* 149-150: 49-71. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.08.007>.
- Freemont, A. J. 2009. "The Cellular Pathobiology of the Degenerate Intervertebral Disc and Discogenic Back Pain." *Rheumatology* 48 (1): 5-10. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken396>.
- Friedenstein, A J, K V Petrakova, A I Kurolesova, and G P Frolova. 1968. "Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematopoietic Tissues." *Transplantation* 6 (2): 230-47. <https://doi.org/10.1097/00007890-196803000-00009>.
- Fusellier, Marion, Pauline Colombier, Julie Lesoeur, Samy Youl, Stéphane Madec, Olivier Gauthier, Olivier Hamel, Jérôme Guicheux, and Johann Clouet. 2016. "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 Research International* 2016: 12. <https://doi.org/10.1155/2016/5498271>.
- Gantenbein, Benjamin, Thijs Grünhagen, Cynthia R. Lee, Corrinus C. Van Donkelaar, Mauro Alini, and Keita Ito. 2006. "An in Vitro Organ Culturing System for Intervertebral Disc Explants with Vertebral Endplates: A Feasibility Study with Ovine Caudal Discs." *Spine* 31(23):2665-2673. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000244620.15386.df>.
- Gao, F, S M Chiu, D A L Motan, Z Zhang, L Chen, H-L Ji, H-F Tse, Q-L Fu, and Q Lian. 2016. "Mesenchymal Stem Cells and Immunomodulation: Current Status and Future Prospects." *Cell Death & Disease* 7, 2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>.
- Gluais, Maude, Johann Clouet, Marion Fusellier, Cyrille Decante, Constantin Moraru, Maeva Dutilleul, Joëlle Veziers, et al. 2019. "In Vitro and in Vivo Evaluation of an Electrospun-Aligned Microfibrous Implant for Annulus Fibrosus Repair." *Biomaterials* 205: 81-96. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.010>.
- Gordon, Allan, Saifudin Rashid, Dwight E Moulin, Alexander J Clark, André D Beaulieu, John Eisenhoffer, Paula S Piraino, Patricia Quigley, Zoltan Harsanyi, and Andrew C Darke. 2010. "Buprenorphine Transdermal System for Opioid Therapy in Patients with Chronic Low Back Pain." *Pain Research & Management : The Journal of the Canadian Pain Society = Journal de La Société Canadienne Pour Le Traitement de La Douleur* 15 (3): 169-78. <https://doi.org/10.1155/2010/216725>.
- Grad, Sibylle, C. Bow, J. Karppinen, K. D.K. Luk, K. M.C. Cheung, M. Alini, and D. Samartzis. 2016. "Systemic Blood Plasma CCL5 and CXCL6: Potential Biomarkers for Human Lumbar Disc Degeneration." *European Cells and Materials* 31: 1-10. <https://doi.org/10.22203/eCM.v031a01>.
- Griffith, T. S., T. Brunner, S. M. Fletcher, D. R. Green, and T. A. Ferguson. 1995. "Fas Ligand-Induced Apoptosis as a Mechanism of Immune Privilege." *Science* 270 (5239): 1189-92. <https://doi.org/10.1126/science.270.5239.1189>.
- Gruber, H E, H J Norton, and E N Hanley. 2000. "Anti-Apoptotic Effects of IGF-1 and PDGF on

- Human Intervertebral Disc Cells in Vitro." *Spine* 25 (17): 2153–57. <https://doi.org/10.1097/00007632-200009010-00002>.
- Gruber, Helen E., Gretchen L. Hoelscher, Jane A. Ingram, Synthia Bethea, H. James Norton, and Edward N. Hanley. 2014. "Production and Expression of RANTES (CCL5) by Human Disc Cells and Modulation by IL-1- β and TNF- α in 3D Culture." *Experimental and Molecular Pathology* 96 (2): 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.01.002>.
- Gruber, Helen E., Frank E. Riley, Gretchen L. Hoelscher, Jane A. Ingram, Letitia Bullock, and Edward N. Hanley. 2016. "Human Annulus Progenitor Cells: Analyses of This Viable Endogenous Cell Population." *Journal of Orthopaedic Research* 34 (8): 1351–60. <https://doi.org/10.1002/jor.23319>.
- Gruber, Helen E, Gretchen L Hoelscher, Jane A Ingram, Synthia Bethea, and Edward N Jr Hanley. 2015. "Autophagy in the Degenerating Human Intervertebral Disc: In Vivo Molecular and Morphological Evidence, and Induction of Autophagy in Cultured Annulus Cells Exposed to Proinflammatory Cytokines-Implications for Disc Degeneration." *Spine* 40 (11): 773–82. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000000865>.
- Gruber, Helen E, Jane a Ingram, H James Norton, and Edward N Hanley. 2007. "Senescence in Cells of the Aging and Degenerating Intervertebral Disc: Immunolocalization of Senescence-Associated Beta-Galactosidase in Human and Sand Rat Discs." *Spine* 32 (3): 321–27. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000253960.57051.de>.
- Grunhagen, Thijs, Aboulfazl Shirazi-Adl, Jeremy C.T. Fairbank, and Jill P.G. Urban. 2011. "Intervertebral Disk Nutrition: A Review of Factors Influencing Concentrations of Nutrients and Metabolites." *Orthopedic Clinics of North America* 42 (4): 465–477. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2011.07.010>.
- Gunja-Smith, Zeenat, and J. Frederick Woessner. 1993. "Activation of Cartilage Stromelysin-1 at Acid PH and Its Relation to Enzyme PH Optimum and Osteoarthritis." *Agents and Actions* 40 (3–4): 228–31. <https://doi.org/10.1007/BF01984067>.
- Guyer, Richard D, Paul C McAfee, Stephen H Hochschuler, Scott L Blumenthal, Ira L Fedder, Donna D Ohnmeiss, and Bryan W Cunningham. 2004. "Prospective Randomized Study of the Charite Artificial Disc: Data from Two Investigational Centers." *The Spine Journal : Official Journal of the North American Spine Society* 4 (6 Suppl): 252S–259S. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2004.07.019>.
- Hadjipavlou, A. G., M. N. Tzermiadianos, N. Bogduk, and M. R. Zindrick. 2008. "The Pathophysiology of Disc Degeneration: A CRITICAL REVIEW." *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume* 90-B (10): 1261–70. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.90B10.20910>.
- Hardingham, Timothy E. 1998. "Cartilage: Aggrecan - Link Protein - Hyaluronan Aggregates." *Glycoforum* 2 (A5).
- Harrop, James S., Jim A. Youssef, Mitch Maltenfort, Peggy Vorwald, Pascal Jabbour, Christopher M. Bono, Neil Goldfarb, Alexander R. Vaccaro, and Alan S. Hilibrand. 2008. "Lumbar Adjacent Segment Degeneration and Disease after Arthrodesis and Total Disc Arthroplasty." *Spine* 33 (15): 1701–7. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31817bb956>.

- Hayes, A. J., M. Benjamin, and J. R. Ralphs. 2001. "Extracellular Matrix in Development of the Intervertebral Disc." *Matrix Biology* 20 (2): 107-121. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00125-1).
- Hee, Hwan Tak, Yon Jin Chuah, Bryan Hsi Ming Tan, Tony Setiobudi, and Hee Kit Wong. 2011. "Vascularization and Morphological Changes of the Endplate After Axial Compression and Distraction of the Intervertebral Disc." *Spine* 36 (7): 505–11. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181d32410>.
- Henriksson, Helena Barreto, Emilia Svala, Eva Skioldebrand, Anders Lindahl, and Helena Brisby. 2012. "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 (9): 722–32. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318231c2f7>.
- Henriksson, Helena, Maria Thornemo, Camilla Karlsson, Olle Hägg, Katarina Junevik, Anders Lindahl, and Helena Brisby. 2009. "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 (21): 2278–87. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181a95ad2>.
- Henry, Nina, Johann Clouet, Jean Le Bideau, Catherine Le Visage, and Jérôme Guicheux. 2018. "Innovative Strategies for Intervertebral Disc Regenerative Medicine: From Cell Therapies to Multiscale Delivery Systems." *Biotechnology Advances* 36 (1): 281-294. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.009>.
- Henry, Nina, Johann Clouet, Audrey Fragale, Louise Griveau, Claire Chédeville, Joëlle Véziers, Pierre Weiss, Jean Le Bideau, Jérôme Guicheux, and Catherine Le Visage. 2017. "Pullulan Microbeads/Si-HPMC Hydrogel Injectable System for the Sustained Delivery of GDF-5 and TGF- β 1: New Insight into Intervertebral Disc Regenerative Medicine." *Drug Delivery* 24 (1): 999–1010. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1340362>.
- Henry, Nina, Pauline Colombier, Laurent Lescaudron, Olivier Hamel, Jean Le Bideau, Jérôme Guicheux, and Johann Clouet. 2014. "Regenerative Medicine of the Intervertebral Disc: From Pathophysiology to Clinical Application." *Médecine Sciences : M/S* 30 (12): 1091–1100. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143012012>.
- Hohaus, C., T. M. Ganey, Y. Minkus, and H. J. Meisel. 2008. "Cell Transplantation in Lumbar Spine Disc Degeneration Disease." In *European Spine Journal* 17 (S4): 492-503. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0750-6>.
- Honczarenko, Marek, Yi Le, Marcin Swierkowski, Ionita Ghiran, Aleksandra M Glodek, and Leslie E Silberstein. 2006. "Human Bone Marrow Stromal Cells Express a Distinct Set of Biologically Functional Chemokine Receptors." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (4): 1030–41. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0319>.
- Horner, H A, and J P Urban. 2001. "2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of Nutrient Supply on the Viability of Cells from the Nucleus Pulposus of the Intervertebral Disc." *Spine* 26 (23): 2543–49. <https://doi.org/10.1097/00007632-200112010-00006>.
- Hostin, Richard, Michael O'Brien, Ian McCarthy, Shay Bess, Munish Gupta, and Eric Klineberg. 2016. "Retrospective Study of Anterior Interbody Fusion Rates and Patient Outcomes of

- Using Mineralized Collagen and Bone Marrow Aspirate in Multilevel Adult Spinal Deformity Surgery." *Clinical Spine Surgery* 29 (8): 384–E388. <https://doi.org/10.1097/BSD.0b013e318292468f>.
- Hoy, Damian, Lyn March, Peter Brooks, Fiona Blyth, Anthony Woolf, Christopher Bain, Gail Williams, et al. 2014. "The Global Burden of Low Back Pain: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 Study." *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204428>.
- Hsieh, Adam H., and Julianne D. Twomey. 2009. "Cellular Mechanobiology of the Intervertebral Disc: New Directions and Approaches." *Journal of Biomechanics* 43 (1): 137–45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.019>.
- Huang, Yong Can, Jill P.G. Urban, and Keith D.K. Luk. 2014. "Intervertebral Disc Regeneration: Do Nutrients Lead the Way?" *Nature Reviews Rheumatology* 10, 561–566. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.91>.
- Hunter, C.J., J.R. Matyas, and N.A. Duncan. 2003. "The Notochordal Cell in the Nucleus Pulposus: A Review in the Context of Tissue Engineering." *Tissue Engineering* 9 (4): 667–77. <https://doi.org/10.1089/107632703768247368>.
- Hunter, Christopher J., John R. Matyas, and Neil A. Duncan. 2004. "Cytomorphology of Notochordal and Chondrocytic Cells from the Nucleus Pulposus: A Species Comparison." *Journal of Anatomy* 205 (5): 357–62. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2004.00352.x>.
- Hunter, Christopher J, John R Matyas, and Neil a Duncan. 2004. "The Functional Significance of Cell Clusters in the Notochordal Nucleus Pulposus: Survival and Signaling in the Canine Intervertebral Disc." *Spine* 29 (10): 1099–1104. <https://doi.org/00007632-200405150-00010> [pii].
- Illien-Jünger, Svenja, Girish Pattappa, Marianna Peroglio, Lorin M. Benneker, Martin J. Stoddart, Daisuke Sakai, Joji Mochida, Sibylle Grad, and Mauro Alini. 2012. "Homing of Mesenchymal Stem Cells in Induced Degenerative Intervertebral Discs in a Whole Organ Culture System." *Spine* 37 (22): 1865–73. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182544a8a>.
- Inui, Yoshihiro, Kotaro Nishida, Minoru Doita, Toru Takada, Hiroshi Miyamoto, Shinichi Yoshiya, and Masahiro Kurosaka. 2004. "Fas-Ligand Expression on Nucleus Pulposus Begins in Developing Embryo." *Spine* 29 (21): 2365–69. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000143172.07771.fc>.
- Ishii, T., H. Tsuji, A. Sano, Y. Katoh, H. Matsui, and N. Terahata. 1991. "Histochemical and Ultrastructural Observations on Brown Degeneration of Human Intervertebral Disc." *Journal of Orthopaedic Research* 9 (1): 78–90. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090111>.
- Itaba, Noriko, Yoshiaki Matsumi, Kaori Okinaka, An Afida Ashla, Yohei Kono, Mitsuhiro Osaki, Minoru Morimoto, et al. 2015. "Human Mesenchymal Stem Cell-Engineered Hepatic Cell Sheets Accelerate Liver Regeneration in Mice." *Scientific Reports* 5. <https://doi.org/10.1038/srep16169>.
- Jeffries, Leah J, Steve F Milanese, and Karen A Grimmer-Somers. 2007. "Epidemiology of Adolescent Spinal Pain: A Systematic Overview of the Research Literature." *Spine* 32 (23):

- 2630–37. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318158d70b>.
- Johnstone, B, J P Urban, S Roberts, and J Menage. 1992. "The Fluid Content of the Human Intervertebral Disc. Comparison Between Fluid Content and Swelling Pressure Profiles of Discs Removed at Surgery and Those Taken Postmortem." *Spine* 17(4):412–416. <https://doi.org/10.1097/00007632-199204000-00006>.
- Jünger, Svenja, Benjamin Gantenbein-Ritter, Patrick Lezuo, Mauro Alini, Stephen J. Ferguson, and Keita Ito. 2009. "Effect of Limited Nutrition on in Situ Intervertebral Disc Cells under Simulated-Physiological Loading." *Spine* 34 (12): 1264–1271. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181a0193d>.
- Kalson, NS, S Richardson, and JA Hoyland. 2008. "Strategies for Regeneration of the Intervertebral Disc." *Regenerative Medicine* 3 (5): 717–29. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.5.717>.
- Kauppila, L I. 2009. "Atherosclerosis and Disc Degeneration/Low-Back Pain--a Systematic Review." *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery : The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 37 (6): 661–670. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2009.02.006>.
- Kawaguchi, Y, R Osada, M Kanamori, H Ishihara, K Ohmori, H Matsui, and T Kimura. 1999. "Association between an Aggrecan Gene Polymorphism and Lumbar Disc Degeneration." *Spine* 24 (23): 2456–60. <https://doi.org/10.1097/00007632-199912010-00006>.
- Kawaguchi, Yoshiharu, Masahiko Kanamori, Hirokazu Ishihara, Kazuo Ohmori, Hisao Matsui, and Tomoatsu Kimura. 2002. "The Association of Lumbar Disc Disease with Vitamin-D Receptor Gene Polymorphism." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 84-A (11): 2022–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429765>.
- Kepler, Christopher K., Dessislava Z. Markova, Florian Dibra, Sanjay Yadla, Alexander R. Vaccaro, Makarand V. Risbud, Todd J. Albert, and David Greg Anderson. 2013. "Expression and Relationship of Proinflammatory Chemokine RANTES/CCL5 and Cytokine IL-1 β in Painful Human Intervertebral Discs." *Spine* 38 (11): 873–880. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318285ae08>.
- Kern, Susanne, Hermann Eichler, Johannes Stoeve, Harald Klüter, and Karen Bieback. 2006. "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue." *Stem Cells* 24 (5): 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>.
- Khoromi, Suzan, Lihong Cui, Lisa Nackers, and Mitchell B. Max. 2007. "Morphine, Nortriptyline and Their Combination vs. Placebo in Patients with Chronic Lumbar Root Pain." *Pain* 130 (1–2): 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.10.029>.
- Kim, Ki Won, Ha Na Chung, Kee Yong Ha, Jun Seok Lee, and Young Yul Kim. 2009. "Senescence Mechanisms of Nucleus Pulposus Chondrocytes in Human Intervertebral Discs." *Spine Journal* 9 (8): 658–66. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2009.04.018>.
- Kongsted, A., and C. Leboeuf-Yde. 2009. "The Nordic Back Pain Subpopulation Program - Individual Patterns of Low Back Pain Established by Means of Text Messaging: A Longitudinal Pilot Study." *Chiropractic & Osteopathy* 27 (8): 493–502.

- <https://doi.org/10.1016/j.jmpt.2004.08.001>.
- Kovac, V. 2018. "Failure of Lumbar Disc Surgery: Management by Fusion or Arthroplasty?" *Int Orthop* 43(4):981-986. doi: 10.1007/s00264-018-4228-9.
- Kuritzky, Louis, and George P. Samraj. 2012. "Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Treatment of Low Back Pain." *Journal of Pain Research* 2012 (5): 579—590. <https://doi.org/10.2147/JPR.S6775>.
- Lack, Stéphane, Virginie Dulong, Didier Le Cerf, Luc Picton, Jean François Argillier, and Guy Muller. 2004. "Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with Sodium Trimetaphosphate (STMP): Rheological Study." *Polymer Bulletin* 52 (6): 429-436. <https://doi.org/10.1007/s00289-004-0299-4>.
- Leckie, Steven K., Bernard P. Bechara, Robert A. Hartman, Gwendolyn A. Sowa, Barrett I. Woods, Joao P. Coelho, William T. Witt, et al. 2012. "Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the Nucleus Pulposus Slows the Course of Intervertebral Disc Degeneration in an in Vivo Rabbit Model." *Spine Journal* 12 (1): 7-20. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2011.09.011>.
- Lee, Cynthia R., Daisuke Sakai, Tomoko Nakai, Kanae Toyama, Joji Mochida, Mauro Alini, and Sibylle Grad. 2007. "A Phenotypic Comparison of Intervertebral Disc and Articular Cartilage Cells in the Rat." *European Spine Journal* 16 (12): 2174–85. <https://doi.org/10.1007/s00586-007-0475-y>.
- Le Maitre, Christine L., Judith A. Hoyland, and Anthony J. Freemont. 2007. "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 Research and Therapy* 9. <https://doi.org/10.1186/ar2282>.
- Le Maitre, Christine L, Anthony J Freemont, and Judith Alison Hoyland. 2009. "Expression of Cartilage-Derived Morphogenetic Protein in Human Intervertebral Discs and Its Effect on Matrix Synthesis in Degenerate Human Nucleus Pulposus Cells." *Arthritis Research and Therapy* 11 (5): R137. <https://doi.org/10.1186/ar2808>.
- Le Maitre, Christine Lyn, Jennie Frain, Jane Millward-Sadler, Andrew P. Fotheringham, Anthony John Freemont, and Judith Alison Hoyland. 2009. "Altered Integrin Mechanotransduction in Human Nucleus Pulposus Cells Derived from Degenerated Discs." *Arthritis and Rheumatism* 60 (2): 460–69. <https://doi.org/10.1002/art.24248>.
- Leung, Victor Y.L., Wilson C.W. Chan, Siu-Chun Hung, Kenneth M.C. Cheung, and Danny Chan. 2009. "Matrix Remodeling During Intervertebral Disc Growth and Degeneration Detected by Multichromatic FAST Staining." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 57 (3): 249–56. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952184>.
- Li, Shi Wu, Darwin J. Prockop, Heikki Helminen, Reinhard Fässler, Tuomo Lapveteläinen, Kari Kiraly, Alpo Peltarri, et al. 1995. "Transgenic Mice with Targeted Inactivation of the Col2a1 Gene for Collagen II Develop a Skeleton with Membranous and Periosteal Bone but No Endochondral Bone." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.9.22.2821>.
- Li, Siyuan, Victor C. Duance, and Emma J. Blain. 2008. "Zonal Variations in Cytoskeletal Element

- Organization, mRNA and Protein Expression in the Intervertebral Disc." *Journal of Anatomy* 213 (6): 725–32. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00998.x>.
- Li, Xiao-Chuan, Yong Tang, Jian-Hong Wu, Pu-Shan Yang, De-Li Wang, and Di-Ke Ruan. 2017. "Characteristics and Potentials of Stem Cells Derived from Human Degenerated Nucleus Pulposus: Potential for Regeneration of the Intervertebral Disc." *BMC Musculoskeletal Disorders* 18 (1): 242. <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1567-4>.
- Liang, Cheng Zhen, Hao Li, Yi Qing Tao, Li Hua Peng, Jian Qing Gao, Jing Jun Wu, Fang Cai Li, Jian Ming Hua, and Qi Xin Chen. 2013. "Dual Release of Dexamethasone and TGF- β 3 from Polymeric Microspheres for Stem Cell Matrix Accumulation in a Rat Disc Degeneration Model." *Acta Biomaterialia* 9 (12): 9423–33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.019>.
- Lindvall, Olle, Zaal Kokaia, and Alberto Martinez-Serrano. 2004. "Stem Cell Therapy for Human Neurodegenerative Disorders-How to Make It Work." *Nature Medicine* 10 (7): S42–50. <https://doi.org/10.1038/nm1064>.
- Liu, Chen, Qianping Guo, Jun Li, Shenghao Wang, Yibin Wang, Bin Li, and Huilin Yang. 2014. "Identification of Rabbit Annulus Fibrosus-Derived Stem Cells." *PLoS ONE* 9 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108239>.
- Liu, G., JH. Tan, C. Yang, J. Ruiz, and HK. Wong. 2016. "A Computed Tomography Analysis of the Success of Spinal Fusion Using Ultra-Low Dose (0.7 Mg per Facet) of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 in Multilevel Adult Degenerative Spinal Deformity Surgery." *Asian Spine Journal* 12 (6): 1010-1016. doi: 10.31616/asj.2018.12.6.1010..
- Liu, Lan Tao, Bo Huang, Chang Qing Li, Ying Zhuang, Jian Wang, and Yue Zhou. 2011. "Characteristics of Stem Cells Derived from the Degenerated Human Intervertebral Disc Cartilage Endplate." *PLoS ONE* 6 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026285>.
- Liu, Shuhao, Haifeng Liang, Soo Min Lee, Zheng Li, Jian Zhang, and Qinming Fei. 2017. "Isolation and Identification of Stem Cells from Degenerated Human Intervertebral Discs and Their Migration Characteristics." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 49 (2): 101-109. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw121>.
- Liu, Zongchao, Chuan Ma, Jieliang Shen, Dawu Wang, Jie Hao, and Zhenming Hu. 2016. "SDF-1/CXCR4 Axis Induces Apoptosis of Human Degenerative Nucleus Pulposus Cells via the NF- κ B Pathway." *Molecular Medicine Reports* 14 (1): 783–89. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5341>.
- Livshits, Gregory, Maria Popham, Ida Malkin, Philip N. Sambrook, Alex J. MacGregor, Timothy Spector, and Frances M.K. Williams. 2011. "Lumbar Disc Degeneration and Genetic Factors Are the Main Risk Factors for Low Back Pain in Women: The UK Twin Spine Study." *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.137836>.
- Lotz, Jeffrey C. 2004. "Animal Models of Intervertebral Disc Degeneration: Lessons Learned." *Spine* 29(23):2742-2750. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146498.04628.f9>.
- Luoma, K, H Riihimäki, R Luukkonen, R Raininko, E Viikari-Juntura, and A Lamminen. 2000. "Low Back Pain in Relation to Lumbar Disc Degeneration." *Spine* 25 (4): 487–92. <https://doi.org/10.1097/00007632-200002150-00016>.

- Ma, K., S. Chen, Z. Li, X. Deng, D. Huang, L. Xiong, and Z. Shao. 2018. "Mechanisms of Endogenous Repair Failure during Intervertebral Disc Degeneration." *Osteoarthritis and Cartilage*, 2018 7 (1): 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.08.021>.
- Maier, Jennifer A., and Brian D. Harfe. 2011. "Nuclei Pulposi Formation From the Embryonic Notochord Occurs Normally in GDF-5-Deficient Mice." *Spine* 36 (24): E1555–61. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318210eec4>.
- Maroudas, A, R A Stockwell, A Nachemson, and J Urban. 1975. "Factors Involved in the Nutrition of the Human Lumbar Intervertebral Disc: Cellularity and Diffusion of Glucose in Vitro." *Journal of Anatomy* 120 (Pt 1): 113–30. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=1184452&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- Martin, Brook I., Richard A. Deyo, Sohail K. Mirza, Judith A. Turner, Bryan A. Comstock, William Hollingworth, and Sean D. Sullivan. 2008. "Expenditures and Health Status among Adults with Back and Neck Problems." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 299 (6): 656–64. <https://doi.org/10.1001/jama.299.6.656>.
- Martin, Brook I., Sohail K. Mirza, Bryan A. Comstock, Darryl T. Gray, William Kreuter, and Richard A. Deyo. 2007. "Are Lumbar Spine Reoperation Rates Falling with Greater Use of Fusion Surgery and New Surgical Technology?" *Spine* 32 (19): 2119–26. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318145a56a>.
- Masuoka, Kazunori, Arthur J. Michalek, Jeffrey J. MacLean, Ian A. F. Stokes, and James C. Iatridis. 2007. "Different Effects of Static Versus Cyclic Compressive Loading on Rat Intervertebral Disc Height and Water Loss In Vitro." *Spine* 32 (18): 1974–79. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318133d591>.
- Meisel, Hans Joerg, Timothy Ganey, William C. Hutton, Jeanette Libera, Yvonne Minkus, and Olivera Alasevic. 2006. "Clinical Experience in Cell-Based Therapeutics: Intervention and Outcome." In *European Spine Journal* 15 (S3): 397-405. <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0169-x>.
- Meisel, Hans Jörg, Vilma Siodla, Timothy Ganey, Yvonne Minkus, William C. Hutton, and Olivera J. Alasevic. 2007. "Clinical Experience in Cell-Based Therapeutics: Disc Chondrocyte Transplantation. A Treatment for Degenerated or Damaged Intervertebral Disc." *Biomolecular Engineering* 24 (1 SPEC. ISS.): 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.07.002>.
- Merceron, Christophe, Laura Mangiavini, Alexander Robling, Tremika Leshan Wilson, Amato J. Giaccia, Irving M. Shapiro, Ernestina Schipani, and Makarand V. Risbud. 2014. "Loss of HIF-1 α in the Notochord Results in Cell Death and Complete Disappearance of the Nucleus Pulposus." *PLoS ONE* 9 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110768>.
- Modic, M T, P M Steinberg, J S Ross, T J Masaryk, and J R Carter. 1988. "Degenerative Disk Disease: Assessment of Changes in Vertebral Body Marrow with MR Imaging." *Radiology* 166 (1): 193–99. <https://doi.org/10.1148/radiology.166.1.3336678>.
- Mwale, F., P. Roughley, J. Antoniou, M. Alini, A. Hollander, T. Kirsch, and I. Stokes. 2004. "Distinction between the Extracellular Matrix of the Nucleus Pulposus and Hyaline Cartilage: A Requisite for Tissue Engineering of Intervertebral Disc." *European Cells and*

- Materials* 8: 58–64. <https://doi.org/10.22203/eCM.v008a06>.
- Nisolle, Jean François, Benoît Bihin, Nathalie Kirschvink, Fabienne Neveu, Peter Clegg, Alexandra Dugdale, Xiaoqing Wang, and Jean Michel Vandeweerdt. 2016. "Prevalence of Age-Related Changes in Ovine Lumbar Intervertebral Discs during Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging." *Comparative Medicine* 66(4):300-7.
- O'Halloran, Damien M., and Abhay S. Pandit. 2007. "Tissue-Engineering Approach to Regenerating the Intervertebral Disc." *Tissue Engineering* 13 (8): 1927–54. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.0608>.
- Ohba, Tetsuro, Hirotaka Haro, Takashi Ando, Masanori Wako, Fumiko Suenaga, Yoshinori Aso, Kensuke Koyama, Yoshiki Hamada, and Atsuhito Nakao. 2009. "TNF-Alpha-Induced NF-KappaB Signaling Reverses Age-Related Declines in VEGF Induction and Angiogenic Activity in Intervertebral Disc Tissues." *Journal of Orthopaedic Research* 27 (2): 229–35. <https://doi.org/10.1002/jor.20727>.
- Paesold, Günther, Andreas G. Nerlich, and Norbert Boos. 2007. "Biological Treatment Strategies for Disc Degeneration: Potentials and Shortcomings." *European Spine Journal* 16 (4): 447-468. <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0220-y>.
- Paietta, Rachel C., Evalina L. Burger, and Virginia L. Ferguson. 2013. "Mineralization and Collagen Orientation throughout Aging at the Vertebral Endplate in the Human Lumbar Spine." *Journal of Structural Biology* 184 (2): 310–20. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.08.011>.
- Panjabi, M. M., T. R. Oxland, I. Yamamoto, and J. J. Crisco. 1994. "Mechanical Behavior of the Human Lumbar and Lumbosacral Spine as Shown by Three-Dimensional Load-Displacement Curves." *Journal of Bone and Joint Surgery - Series* 76 (3): 413–424. <https://doi.org/10.2106/00004623-199403000-00012>.
- Park, Jong Beom, In Chul Park, Sung Jin Park, Hyeon Ok Jin, Jin Kyung Lee, and K. Daniel Riew. 2006. "Anti-Apoptotic Effects of Caspase Inhibitors on Rat Intervertebral Disc Cells." *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 88 (4): 771–79. <https://doi.org/10.2106/JBJS.E.00762>.
- Pattappa, G., M. Peroglio, D. Sakai, J. Mochida, L. M. Benneker, M. Alini, and Sibylle Grad. 2014. "CCL5/Rantes Is a Key Chemoattractant Released by Degenerative Intervertebral Discs in Organ Culture." *European Cells and Materials* 27: (124-136). <https://doi.org/10.22203/eCM.v027a10>.
- Pattappa, Girish, Zhen Li, Marianna Peroglio, Nadine Wismer, Mauro Alini, and Sibylle Grad. 2012. "Diversity of Intervertebral Disc Cells: Phenotype and Function." *Journal of Anatomy*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01521.x>.
- Pellis , Ferran, Federico Balagué, Luis Rajmil, Christine Cedraschi, Mario Aguirre, Cesar G Fontecha, Maribel Pasar n, and Montse Ferrer. 2009. "Prevalence of Low Back Pain and Its Effect on Health-Related Quality of Life in Adolescents." *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 163 (1): 65–71. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2008.512>.
- Pereira, Catarina Leite, Raquel M. Gonçalves, Marianna Peroglio, Girish Pattappa, Matteo D'Este, David Eglin, Mário A. Barbosa, Mauro Alini, and Sibylle Grad. 2014. "The Effect of

- Hyaluronan-Based Delivery of Stromal Cell-Derived Factor-1 on the Recruitment of MSCs in Degenerating Intervertebral Discs.” *Biomaterials* 35 (28): 8144–53. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.017>.
- Pereira, Catarina Leite, Graciosa Quelhas Teixeira, Joana Rita Ferreira, Matteo D’Este, David Eglin, Maulo Alini, Sibylle Grad, Mário Adolfo Barbosa, and Raquel Madeira Gonçalves. 2018. “Stromal Cell Derived Factor-1-Mediated Migration of Mesenchymal Stem Cells Enhances Collagen Type II Expression in Intervertebral Disc.” *Tissue Engineering Part A* 24: 23–24. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0131>.
- Pereira, Catarina Leite, Graciosa Q. Teixeira, Cláudia Ribeiro-Machado, Joana Caldeira, Madalena Costa, Francisco Figueiredo, Rui Fernandes, et al. 2016. “Mesenchymal Stem/Stromal Cells Seeded on Cartilaginous Endplates Promote Intervertebral Disc Regeneration through Extracellular Matrix Remodeling.” *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep33836>.
- Pfirrmann, Christian W. A., Alexander Metzdorf, Marco Zanetti, Juerg Hodler, and Norbert Boos. 2001. “Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration.” *Spine* 26 (17): 1873–78. <https://doi.org/10.1097/00007632-200109010-00011>.
- Pluijm, S M F, H W van Essen, N Bravenboer, A G Uitterlinden, J H Smit, H A P Pols, and P Lips. 2004. “Collagen Type I Alpha1 Sp1 Polymorphism, Osteoporosis, and Intervertebral Disc Degeneration in Older Men and Women.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 63 (1): 71–77. <https://doi.org/10.1136/ARD.2002.002287>.
- Pockert, Aneta J., Stephen M. Richardson, Christine L. Le Maitre, Malcolm Lyon, Jonathan A. Deakin, David J. Buttle, Anthony J. Freemont, and Judith A. Hoyland. 2009. “Modified Expression of the ADAMTS Enzymes and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 during Human Intervertebral Disc Degeneration.” *Arthritis and Rheumatism* 60 (2): 482–91. <https://doi.org/10.1002/art.24291>.
- Poiraudau, S, I Monteiro, P Anract, O Blanchard, M Revel, and M T Corvol. 1999. “Phenotypic Characteristics of Rabbit Intervertebral Disc Cells. Comparison with Cartilage Cells from the Same Animals.” *Spine* 24 (9): 837–44. <https://doi.org/10.1097/00007632-199905010-00002>.
- Portron, Sophie, Christophe Merceron, Olivier Gauthier, Julie Lesoeur, Sophie Sourice, Martial Masson, Borhane Hakim Fellah, et al. 2013. “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*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062368>.
- Purmessur, Devina, Anthony J Freemont, and Judith A Hoyland. 2008. “Expression and Regulation of Neurotrophins in the Nondegenerate and Degenerate Human Intervertebral Disc.” *Arthritis Research & Therapy* 10 (4): R99. <https://doi.org/10.1186/ar2487>.
- Purnama, Agung, Rachida Aid-Launais, Oualid Haddad, Muriel Maire, Diego Mantovani, Didier Letourneur, Hanna Hlawaty, and Catherine Le Visage. 2015. “Fucoidan in a 3D Scaffold Interacts with Vascular Endothelial Growth Factor and Promotes Neovascularization in

- Mice." *Drug Delivery and Translational Research* 5 (2): 187–97. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0177-4>.
- Rannou, F., P. Poiraudou, M. Corvol, and M. Revel. 2000. "Biochimie et Biologie Du Disque Intervertébral. Revue Du Rhumatisme." *Revue Du Rhumatisme* 67 (4): 214–18. Elsevier
- Rannou, François, Tzong-Shyuan Lee, Rui-Hai Zhou, Jennie Chin, Jeffrey C Lotz, Marie-Anne Mayoux-Benhamou, Jacques Patrick Barbet, Alain Chevrot, and John Y-J Shyy. 2004. "Intervertebral Disc Degeneration: The Role of the Mitochondrial Pathway in Annulus Fibrosus Cell Apoptosis Induced by Overload." *The American Journal of Pathology* 164 (3): 915–24. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63179-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63179-3).
- Ray, Paramita, Sarah A. Lewin, Laura Anne Mihalko, Sasha Cai Leshner-Perez, Shuichi Takayama, Kathryn E. Luker, and Gary D. Luker. 2012. "Secreted CXCL12 (SDF-1) Forms Dimers under Physiological Conditions." *Biochemical Journal* 442 (2): 433–442. <https://doi.org/10.1042/BJ20111341>.
- Risbud, Makarand V., Asha Guttapalli, Tsung-Ting Tsai, Joon Y. Lee, Keith G. Danielson, Alexander R. Vaccaro, Todd J. Albert, Zulma Gazit, Dan Gazit, and Irving M. Shapiro. 2007. "Evidence for Skeletal Progenitor Cells in the Degenerate Human Intervertebral Disc." *Spine* 32 (23): 2537–44. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318158dea6>.
- Risbud, Makarand V., Zachary R. Schoepflin, Fackson Mwale, Rita A. Kandel, Sibylle Grad, James C. Iatridis, Daisuke Sakai, and Judith A. Hoyland. 2015. "Defining the Phenotype of Young Healthy Nucleus Pulposus Cells: Recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 Annual ORS Meeting." *Journal of Orthopaedic Research* 33 (3): 283–93. <https://doi.org/10.1002/jor.22789>.
- Risbud, Makarand V., and Irving M. Shapiro. 2013. "Role of Cytokines in Intervertebral Disc Degeneration: Pain and Disc Content." *Nature Reviews Rheumatology* 10 (1): 44–56. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.160>.
- Risbud, Makarand V., Asha Guttapalli, David G Stokes, David Hawkins, Keith G Danielson, Thomas P Schaer, Todd J Albert, and Irving M Shapiro. 2006. "Nucleus Pulposus Cells Express HIF-1 Alpha under Normoxic Culture Conditions: A Metabolic Adaptation to the Intervertebral Disc Microenvironment." *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (1): 152–59. <https://doi.org/10.1002/jcb.20765>.
- Roberts, S., J. Menage, V. Duance, S. Wotton, and S. Ayad. 1991. "1991 Volvo Award in Basic Sciences: Collagen Types around the Cells of the Intervertebral Disc and Cartilage End Plate: An Immunolocalization Study." *Spine* 16 (9): 1030–1038. <https://doi.org/10.1097/00007632-199109000-00003>.
- Roberts, S., J. Menage, and J. P. G. Urban. 1989. "Biochemical and Structural Properties of the Cartilage End-Plate and Its Relation to the Intervertebral Disc." *Spine* 14 (2): 166–74. <https://doi.org/10.1097/00007632-198902000-00005>.
- Roberts, S, B Caterson, J Menage, E H Evans, D C Jaffray, and S M Eisenstein. 2000. "Matrix Metalloproteinases and Aggrecanase: Their Role in Disorders of the Human Intervertebral Disc." *Spine* 25 (23): 3005–13. <https://doi.org/10.1097/00007632-200012010-00007>.

- Roberts, Sally, Helena Evans, Jayesh Trivedi, Janis Menage, ., ., ., et al. 2006. "Histology and Pathology of the Human Intervertebral Disc." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 88 Suppl 2 (suppl 2): 10–14. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00019>.
- Roberts, Sally PhD, Stephen M PhD Frcs Eisenstein, Janis H N D Menage, E Helena BSc Evans, and I Karen DPhil Ashton. 1995. "Mechanoreceptors in Intervertebral Discs: Morphology, Distribution, and Neuropeptides." *Spine* 20 (24): 2645–51. <https://doi.org/10.1097/00007632-199512150-00005>.
- Rodriguez, Azucena G., Ana E. Rodriguez-Soto, Andrew J. Burghardt, Sigurd Berven, Sharmila Majumdar, and Jeffrey C. Lotz. 2012. "Morphology of the Human Vertebral Endplate." *Journal of Orthopaedic Research*. <https://doi.org/10.1002/jor.21513>.
- Ronzière, M C, E Perrier, F Mallein-Gerin, and Anne-Marie Freyria. 2010. "Chondrogenic Potential of Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Bio-Medical Materials and Engineering* 20 (3): 145–58. <https://doi.org/10.3233/BME-2010-0626>.
- Runic, Radmila, Charles J. Lockwood, Yuehong Ma, Bruno Dipasquale, and Seth Guller. 1996. "Expression of Fas Ligand by Human Cytotrophoblasts: Implications in Placentation and Fetal Survival." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (8): 3119–22. <https://doi.org/10.1210/jc.81.8.3119>.
- Rutges, J. P H J, J. A. Kummer, F. C. Oner, A. J. Verbout, R. J M Castelein, H. J A Roestenburg, W. J A Dhert, and L. B. Creemers. 2008. "Increased MMP-2 Activity during Intervertebral Disc Degeneration Is Correlated to MMP-14 Levels." *Journal of Pathology* 214 (4): 523–30. <https://doi.org/10.1002/path.2317>.
- Ryan, Jennifer M., Frank P. Barry, J. Mary Murphy, and Bernard P. Mahon. 2005. "Mesenchymal Stem Cells Avoid Allogeneic Rejection." *Journal of Inflammation*. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-2-8>.
- Sakai, Daisuke, and Gunnar B. J. Andersson. 2015. "Stem Cell Therapy for Intervertebral Disc Regeneration: Obstacles and Solutions." *Nature Reviews Rheumatology* 11 (4): 243–56. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.13>.
- Sakai, Daisuke, Yoshihiko Nakamura, Tomoko Nakai, Taishi Mishima, Shunichi Kato, Sibylle Grad, Mauro Alini, et al. 2012. "Exhaustion of Nucleus Pulposus Progenitor Cells with Ageing and Degeneration of the Intervertebral Disc." *Nature Communications* 3: 1264. <https://doi.org/10.1038/ncomms2226>.
- Sakai, Daisuke, Kazuhiro Nishimura, Masahiro Tanaka, Daisuke Nakajima, Sibylle Grad, Mauro Alini, Hiroshi Kawada, Kiyoshi Ando, and Joji Mochida. 2015. "Migration of Bone Marrow-Derived Cells for Endogenous Repair in a New Tail-Looping Disc Degeneration Model in the Mouse: A Pilot Study." *Spine Journal* 15 (6): 1356–65. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.07.491>.
- Sakai, Daisuke, Jordy Schol, Frances C. Bach, Adel Tekari, Nobuho Sagawa, Yoshihiko Nakamura, Samantha C.W. Chan, et al. 2018. "Successful Fishing for Nucleus Pulposus Progenitor Cells of the Intervertebral Disc across Species." *JOR SPINE*. <https://doi.org/10.1002/jsp2.1018>.

- Schnitzer, T J, W L Gray, R Z Paster, and M Kamin. 2000. "Efficacy of Tramadol in Treatment of Chronic Low Back Pain." *The Journal of Rheumatology* 27 (3): 772–78.
- Schwarz, N. 2007. "Retrospective and Concurrent Self-Reports: The Rationale for Real-Time Data Capture." *The Science of Real-Time Data Capture: Self-Reports in Health Research*, 11–26. 10.1201/9781584888901.ch2.
- Seelbach, Ryan J., Peter Fransen, Daniel Pulido, Matteo D'Este, Fabian Duttenehoefer, Sebastian Sauerbier, Thomas M. Freiman, et al. 2015. "Injectable Hyaluronan Hydrogels with Peptide-Binding Dendrimers Modulate the Controlled Release of BMP-2 and TGF-B1." *Macromolecular Bioscience* 15 (8): 1035-1044. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500082>.
- Seki, Shoji, Yumiko Asanuma-Abe, Koichi Masuda, Yoshiharu Kawaguchi, Kunihiro Asanuma, Carol Muehleman, Akiko Iwai, and Tomoatsu Kimura. 2009. "Effect of Small Interference RNA (SiRNA) for ADAMTS5 on Intervertebral Disc Degeneration in the Rabbit Anular Needle-Puncture Model." *Arthritis Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/ar2851>.
- Shen, Weiliang, Xiao Chen, Jialin Chen, Zi Yin, Boon Chin Heng, Weishan Chen, and Hong Wei Ouyang. 2010. "The Effect of Incorporation of Exogenous Stromal Cell-Derived Factor-1 Alpha within a Knitted Silk-Collagen Sponge Scaffold on Tendon Regeneration." *Biomaterials* 31 (28): 7239–49. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.040>.
- Sive, J I, P Baird, M Jeziorsk, A Watkins, J A Hoyland, and A J Freemont. 2002. "Expression of Chondrocyte Markers by Cells of Normal and Degenerate Intervertebral Discs." *Molecular Pathology : MP* 55 (2): 91–97. <https://doi.org/10.1136/mp.55.2.91>.
- Stafford, M. A., Philip Peng, and D. A. Hill. 2007. "Sciatica: A Review of History, Epidemiology, Pathogenesis, and the Role of Epidural Steroid Injection in Management." *British Journal of Anaesthesia* 99 (4): 461-473. <https://doi.org/10.1093/bja/aem238>.
- Stoyanov, J. V., B. Gantenbein-Ritter, A. Bertolo, N. Aebli, M. Baur, M. Alini, and S. Grad. 2011. "Role of Hypoxia and Growth and Differentiation Factor-5 on Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells towards Intervertebral Nucleus Pulposus-like Cells." *European Cells and Materials* 21: 533–47. <https://doi.org/10.22203/eCM.v021a40>.
- Studer, Rebecca K., Lars G. Gilbertson, Helga Georgescu, Gwendolyn Sowa, Nam Vo, and James D. Kang. 2008. "P38 MAPK Inhibition Modulates Rabbit Nucleus Pulposus Cell Response to IL-1." *Journal of Orthopaedic Research* 26 (7): 991–98. <https://doi.org/10.1002/jor.20604>.
- Suffee, N., C. Le Visage, H. Hlawaty, R. Aid-Launais, V. Vanneaux, J. Larghero, O. Haddad, O. Oudar, N. Charnaux, and A. Sutton. 2017. "Pro-Angiogenic Effect of RANTES-Loaded Polysaccharide-Based Microparticles for a Mouse Ischemia Therapy." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13444-7>.
- Sukegawa, Iwasaki, Kasahara, Onodera, Igarashi, and Minami. 2012. "Repair of Rabbit Osteochondral Defects by an Acellular Technique with an Ultrapurified Alginate Gel Containing Stromal Cell-Derived Factor-1." *Tissue Engineering. Part A*.
- Swart, J. F., S. De Roock, F. M. Hofhuis, H. Rozemuller, T. Van Den Broek, P. Moerer, F. Broere,

- et al. 2015. "Mesenchymal Stem Cell Therapy in Proteoglycan Induced Arthritis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (4): 769–77. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204147>.
- Takada, Toru, Kotaro Nishida, Minoru Doita, and Masahiro Kurosaka. 2002. "Fas Ligand Exists on Intervertebral Disc Cells: A Potential Molecular Mechanism for Immune Privilege of the Disc." *Spine* 27 (14): 1526–30. <https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000018955.10564.3B>.
- Takae, R, S Matsunaga, N Origuchi, T Yamamoto, N Morimoto, S Suzuki, and T Sakou. 1999. "Immunolocalization of Bone Morphogenetic Protein and Its Receptors in Degeneration of Intervertebral Disc." *Spine* 24 (14): 1397–1401. <https://doi.org/10.1097/00007632-199907150-00002>.
- Takatalo, Jani, Jaro Karppinen, Jaakko Niinimäki, Simo Taimela, Simo Näyhä, Pertti Mutanen, Roberto Blanco Sequeiros, Eero Kyllönen, and Osmo Tervonen. 2011. "Does Lumbar Disc Degeneration on Magnetic Resonance Imaging Associate with Low Back Symptom Severity in Young Finnish Adults?" *Spine* 36 (25): 2180–2189. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182077122>.
- Tally, WC., HT. Temple, TY. Subhawong, and T. Ganey. 2018. "Transforaminal Lumbar Interbody Fusion With Viable Allograft: 75 Consecutive Cases at 12-Month Follow-Up." *Int J Spine Surg* 12 (1): 76–84.
- Than, Khoi D., Shayan U. Rahman, Monique J. Vanaman, Anthony C. Wang, Chia Ying Lin, Huina Zhang, Frank La Marca, and Paul Park. 2012. "Bone Morphogenetic Proteins and Degenerative Disk Disease." *Neurosurgery* 70 (4). <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318235d65f>.
- Toussiot, Eric, Gérald Streit, and Daniel Wendling. 2007. "The Contribution of Adipose Tissue and Adipokines to Inflammation in Joint Diseases." *Current Medicinal Chemistry* 14 (10): 1095–1100. <https://doi.org/10.2174/092986707780362826>.
- Tran, C M, Z R Schoepflin, D Z Markova, C K Kepler, D G Anderson, I M Shapiro, and M V Risbud. 2014. "CCN2 Suppresses Catabolic Effects of Interleukin-1beta through Alpha5beta1 and AlphaVbeta3 Integrins in Nucleus Pulposus Cells: Implications in Intervertebral Disc Degeneration." *J Biol Chem* 289 (11): 7374–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.526111>.
- Tran, Cassie M., Dessislava Markova, Harvey E. Smith, Bala Susarla, Ravi Kumar Ponnappan, D. Greg Anderson, Aviva Symes, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2010. "Regulation of CCN2/Connective Tissue Growth Factor Expression in the Nucleus Pulposus of the Intervertebral Disc: Role of Smad and Activator Protein 1 Signaling." *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.27445>.
- Trout, J J, J a Buckwalter, and K C Moore. 1982. "Ultrastructure of the Human Intervertebral Disc: II. Cells of the Nucleus Pulposus." *The Anatomical Record* 204 (4): 307–14. <https://doi.org/10.1002/ar.1092040403>.
- Tulder, Maurits W. Van, Tony Touray, Andrea D. Furlan, Sherra Solway, and Lex M. Bouter. 2003. "Muscle Relaxants for Nonspecific Low Back Pain: A Systematic Review within the Framework of the Cochrane Collaboration." *Spine* 28(17):1978-1992.

<https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000090503.38830.AD>.

- Uccelli, Antonio, Lorenzo Moretta, and Vito Pistoia. 2006. "Immunoregulatory Function of Mesenchymal Stem Cells." *European Journal of Immunology* 36 (10): 2566-2573. <https://doi.org/10.1002/eji.200636416>.
- Uccelli, Antonio, Lorenzo Moretta, and Vito Pistoia. 2008. "Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease." *Nature Reviews Immunology* 8: 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>.
- Urban, Jill P.G., Stanton Smith, and Jeremy C.T. Fairbank. 2004. "Nutrition of the Intervertebral Disc." *Spine* 29 (23): 2700-2709. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146499.97948.52>.
- Urban, Jill P G, and Sally Roberts. 2003. "Degeneration of the Intervertebral Disc." *Arthritis Research & Therapy* 5 (3): 120–30. <https://doi.org/10.1186/ar629>.
- Vadalà, Gianluca, Fabrizio Russo, Girish Pattappa, Damiano Schiuma, Marianna Peroglio, Lorin M. Benneker, Sibylle Grad, Mauro Alini, and Vincenzo Denaro. 2013. "The Transpedicular Approach as an Alternative Route for Intervertebral Disc Regeneration." *Spine* 38 (6): E319–E324. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318285bc4a>.
- Vadalà, Gianluca, Fabrizio Russo, Francesca De Strobel, Marco Bernardini, Giulia Maria De Benedictis, Caterina Cattani, Luca Denaro, et al. 2018. "Novel Stepwise Model of Intervertebral Disc Degeneration with Intact Annulus Fibrosus to Test Regeneration Strategies." *Journal of Orthopaedic Research* 36 (9): 2460-2468. <https://doi.org/10.1002/jor.23905>.
- Vadalà, Gianluca, Gwendolyn Sowa, Mark Hubert, Lars G. Gilbertson, Vincenzo Denaro, and James D. Kang. 2012. "Mesenchymal Stem Cells Injection in Degenerated Intervertebral Disc: Cell Leakage May Induce Osteophyte Formation." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 6 (5): 348-355. <https://doi.org/10.1002/term.433>.
- Valat, Jean Pierre, Sylvie Rozenberg, and Laurence Bellaïche. 2010. "Lombalgie. Critères Cliniques et d'imagerie." *Revue Du Rhumatisme Monographies* 77 (2): 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2010.02.003>.
- Vergroesen, P. P A, I. Kingma, K. S. Emanuel, R. J W Hoogendoorn, T. J. Welting, B. J. van Royen, J. H. van Dieën, and T. H. Smit. 2015. "Mechanics and Biology in Intervertebral Disc Degeneration: A Vicious Circle." *Osteoarthritis and Cartilage* 23 (7): 1057-1070. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.028>.
- Videman, T, L E Gibbons, M C Battié, K Maravilla, E Vanninen, J Leppävuori, J Kaprio, and L Peltonen. 2001. "The Relative Roles of Intragenic Polymorphisms of the Vitamin d Receptor Gene in Lumbar Spine Degeneration and Bone Density." *Spine* 26 (3): E7–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11224872>.
- Vinatier, Claire, Carine Bouffi, Christophe Merceron, Jan Gordeladze, Jean-Marc Brondello, Christian Jorgensen, Pierre Weiss, Jerome Guicheux, and Daniele Noel. 2009. "Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-Assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy." *Current Stem Cell Research & Therapy* 4 (4): 318–29. <https://doi.org/10.2174/157488809789649205>.
- Vo, Nam V., Robert A. Hartman, Takashi Yurube, Lloydine J. Jacobs, Gwendolyn A. Sowa, and James D. Kang. 2013. "Expression and Regulation of Metalloproteinases and Their

- Inhibitors in Intervertebral Disc Aging and Degeneration.” *Spine Journal* 13 (3): 331-341. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2012.02.027>.
- Vos, Theo, Abraham D. Flaxman, Mohsen Naghavi, Rafael Lozano, Catherine Michaud, Majid Ezzati, Kenji Shibuya, et al. 2012. “Years Lived with Disability (YLDs) for 1160 Sequelae of 289 Diseases and Injuries 1990-2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.” *The Lancet* 380 (9859): 2163–96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2).
- Wang, Hai, Yue Zhou, Tong Wei Chu, Chang Qing Li, Jian Wang, Zheng Feng Zhang, and Bo Huang. 2016. “Distinguishing Characteristics of Stem Cells Derived from Different Anatomical Regions of Human Degenerated Intervertebral Discs.” *European Spine Journal* 25 (9): 2691–2704. <https://doi.org/10.1007/s00586-016-4522-4>.
- Wang, Hai, Yue Zhou, Bo Huang, Lan-Tao Liu, Ming-Han Liu, Jian Wang, Chang-Qing Li, Zhen-Feng Zhang, Tong-Wei Chu, and Cheng-Jie Xiong. 2014. “Utilization of Stem Cells in Alginate for Nucleus Pulposus Tissue Engineering.” *Tissue Engineering Part A* 20 (5–6): 908–20. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0703>.
- Wang, Wen Jun, Xiao Hua Yu, Cheng Wang, Wei Yang, Wen Si He, Shu Jun Zhang, Yi Guo Yan, and Jian Zhang. 2015. “MMPs and ADAMTSs in Intervertebral Disc Degeneration.” *Clinica Chimica Acta* 448: 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.06.023>.
- Wang, Yong Jun, Qi Shi, Peng Sun, Quan Zhou, Michael Darowish, Tian Fang Li, Yu Feng Dong, William W. Lu, and John C Y Leong. 2006. “Insulin-like Growth Factor-1 Treatment Prevents Anti-Fas Antibody-Induced Apoptosis in Endplate Chondrocytes.” *Spine* 31 (7): 736–41. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000208128.49912.64>.
- Wangler, S., U. Menzel, Z. Li, J. Ma, S. Hoppe, L. M. Benneker, M. Alini, S. Grad, and M. Peroglio. 2019. “CD146/MCAM Distinguishes Stem Cell Subpopulations with Distinct Migration and Regenerative Potential in Degenerative Intervertebral Discs.” *Osteoarthritis and Cartilage* 27 (7): 1094-1105. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.04.002>.
- Weiler, C., A. Nerlich, J. Zipperer, B. Bachmeier, and N. Boos. 2002. “2002 SSE Award Competition in Basic Science: Expression of Major Matrix Metalloproteinases Is Associated with Intervertebral Disc Degradation and Resorption.” *European Spine Journal* 11 (4): 308–20. <https://doi.org/10.1007/s00586-002-0472-0>.
- Weiss, Pierre, Jérôme Guicheux, Emilie Rederstorff, S. Laib, and Gildas Rethore. 2011. Silylated biomolecules, issued 2011 118 (38): 9033-9041. <https://doi.org/10.1021/ja961046o>.
- Weiss, Pierre, Jérôme Guicheux, Gildas Rethore, Emilie Rederstorff, and S. Laib. 2016. Silylated biomolecules, 120 (1): 237-245. <https://doi.org/10.1002/masy.19971200124>.
- Wilke, Hans Joachim, Annette Kettler, and Lutz E. Claes. 1997. “Are Sheep Shines a Valid Biomechanical Model for Human Spines?” *Spine* 22: 2365–74. <https://doi.org/10.1097/00007632-199710150-00009>.
- Wilke, Hans Joachim, Annette Kettler, Karl Howard Wenger, and Lutz Eberhardt Claes. 1997. “Anatomy of the Sheep Spine and Its Comparison to the Human Spine.” *Anatomical Record* 247 (4): 542-555. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199704\)247:4<542::AID-AR13>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199704)247:4<542::AID-AR13>3.0.CO;2-P).

- Williams, Maynard M., John A. Hawley, Robin A. McKenzie, and Paula M. Van Wijmen. 1991. "A Comparison of the Effects of Two Sitting Postures on Back and Referred Pain." *Spine* 16 (10): 1185–91. <https://doi.org/10.1097/00007632-199110000-00010>.
- Woo, Kyungsoo, and Paul A. Seib. 1997. "Cross-Linking of Wheat Starch and Hydroxypropylated Wheat Starch in Alkaline Slurry with Sodium Trimetaphosphate." *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00037-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00037-4).
- Xia, Kaishun, Jian Zhu, Jianming Hua, Zhe Gong, Chao Yu, Xiaopeng Zhou, Jingkai Wang, et al. 2019. "Intradiscal Injection of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Nucleus Pulposus-Like Cell-Seeded Polymeric Microspheres Promotes Rat Disc Regeneration." *Stem Cells International* 2019: 14. <https://doi.org/10.1155/2019/6806540>.
- Yoon, S Tim, and Nilpesh M Patel. 2006. "Molecular Therapy of the Intervertebral Disc." *European Spine Journal : Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 15 Suppl 3 (5): S379-88. <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0155-3>.
- Zhang, YeJia, Ana Chee, Eugene J.M.A. Thonar, and Howard S. An. 2011. "Intervertebral Disk Repair by Protein, Gene, or Cell Injection: A Framework for Rehabilitation-Focused Biologics in the Spine." *PM & R : The Journal of Injury, Function, and Rehabilitation* 3 (6S): S88-S94. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2011.04.020>.
- Zhang, Yue Hui, Chang Qing Zhao, Lei Sheng Jiang, Xiao Dong Chen, and Li Yang Dai. 2008. "Modic Changes: A Systematic Review of the Literature." *European Spine Journal* 17 (10): 1289-1299. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0758-y>.

Titre : Libération séquentielle de facteurs biologiques pour la régénérescence endogène du disque intervertébral

Mots clés : Disque intervertébral, Noyaux pulpeux, Microparticules, Chimiokines, Facteurs de croissance, Régénération endogène, Modèle *ex vivo*, Brebis

Résumé : Le disque intervertébral (DIV) assure le maintien de la stabilité et de la dynamique du rachis, tout en amortissant les chocs subis lors des mouvements de l'ensemble du corps. Les sollicitations quotidiennes de celui-ci en font une structure fragile et peuvent conduire à sa dégénérescence, qui peut s'accompagner de lombalgies. Il a été démontré que 40% des cas de lombalgies chroniques seraient dues à une dégénérescence discale qui résulte d'un dérèglement profond de l'homéostasie tissulaire, celle-ci combinant de nombreux processus cellulaires et moléculaires. L'altération du dialogue entre la matrice extracellulaire (MEC) et les cellules résidentes déséquilibre la balance anabolisme / catabolisme. Les stratégies innovantes récentes ont tenté de restaurer la physiologie discale par injection de cellules exogènes dans le

noyau pulpeux (NP) du disque, en espérant obtenir la synthèse d'une nouvelle MEC saine. Ce projet de thèse consiste à utiliser les cellules souches discales récemment mises en évidence en tant que cellules réparatrices afin de stimuler une régénération endogène. L'objectif de ce travail est de développer un système injectable à libération séquentielle de facteurs biologiques afin de i) recruter les cellules souches discales au niveau du NP dégénéré, puis de ii) stimuler l'anabolisme de ces cellules recrutées et induire la synthèse d'une MEC saine. Pour ce faire, les chimiokines CCL5 et CXCL12, ainsi que les facteurs de croissance GDF-5 et TGF- β 1, combinés à des microparticules polysaccharidiques, ont été étudiés. Ce système a été évalué *in vitro* puis *ex vivo* dans un modèle de culture d'organe de DIV ovin spontanément dégénéré.

Title : Sequential release of biological factors for the endogenous regeneration of intervertebral disc

Keywords: Intervertebral disc, *Nucleus pulposus*, Microparticles, Chemokines, Growth Factors, Endogenous regeneration, *Ex vivo* model, Sheep

Abstract: The intervertebral disc (IVD) maintains the stability and dynamics of the spine, absorbs shocks and distributes mechanical loads along the spinal column. It has been shown that 40% of chronic low back pain cases are due to discal degeneration, resulting of a profound disruption of tissue homeostasis. Indeed, a degenerated IVD exhibits dysregulation of its anabolic/catabolic balance and an altered dialogue between the extracellular matrix (ECM) and resident cells. To date, most innovative strategies have aimed to restore the IVD physiology by injection in the *Nucleus pulposus* (NP) of exogenous cells that could synthesize a new healthy ECM.

This project consists of using recently identified IVD stem cells as reparative cells to stimulate endogenous regeneration. The objective of this work is thus to develop an injectable sequential release system of biological factors in order to i) recruit discal stem cells toward the degenerated NP, then ii) stimulate the anabolism of these recruited cells and induce the synthesis of a healthy ECM. To do this, the chemokines CCL5 and CXCL12, as well as the growth factors GDF-5 and TGF- β 1, combined with polysaccharide microparticles, were studied. This system was evaluated *in vitro* and then *ex vivo* in a spontaneously degenerated ovine IVD organ culture model.