

UNIVERSITE DE NANTES
U.F.R D'ODONTOLOGIE

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES

Discipline : Biologie Cellulaire et Ingénierie Tissulaire

Présentée et soutenue publiquement
le Vendredi 26 Novembre 2010 par

Johann CLOUET

**DEVELOPPEMENT DE L'INGENIERIE TISSULAIRE DU
DISQUE INTERVERTEBRAL : DE LA PHYSIOPATHOLOGIE
AUX MODELES ANIMAUX.**

Devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Mr Pascal LE CORRE Professeur, Faculté de Pharmacie, Rennes.
Mr François RANNOU Professeur, Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris.

Examineurs :

Mr Jérôme GUICHEUX Directeur de Recherche INSERM, Nantes.
Mr Pascal ODOU Professeur, Faculté de Pharmacie, Lille.

Directeur de thèse :

Mr Gaël GRIMANDI Professeur, Faculté de Pharmacie, Nantes.

Co-encadrante de thèse :

Mme Claire VINATIER Chercheur associée INSERM, Nantes.

Membres invités :

Mr Jean-Pierre BENOIT Professeur, Faculté de Pharmacie, Angers.
Mr Eric BORD Praticien Hospitalier, CHU de Nantes.
Mr Olivier GAUTHIER Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire-ONIRIS, Nantes.

Par délibération, en date du 6 décembre 1972, le Conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

Citations

Un point de vue unique est toujours faux.

Paul Valéry (écrivain, poète, philosophe).

Vous savez ce que c'est que la recherche : on part sur une question et on trouve en cours de route des faits qui vous en posent une autre.

Philippe Meyer (journaliste chroniqueur).

Quand nous avons soif, il nous semble que nous pourrions boire tout un océan : c'est la foi. Et quand nous nous mettons à boire, nous buvons un verre ou deux : c'est la science.

Anton Tchekhov (écrivain).

Plutôt qu'une vache dans une prairie, une cellule du disque intervertébral est comme un chameau dans le désert

De je ne sais plus qui ???

Le coeur d'un père s'agrandit avec chaque enfant.

Jean Basile Bezroudnoff (journaliste, écrivain)

On est bien peu de choses mon ami la rose.

D'un certain GG !

On est in business !!

Certains le connaissent !

La balle à l'aile la vie est belle !!!

Des gentlemen philosophes !

Publications

1- Articles dans des journaux indexés (revues internationales)

1. C. MERCERON, C. VINATIER, J. CLOUET, S. COLLIEC-JOUAULT, P. WEISS, J. GUICHEUX.

Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering.

Joint Bone Spine (2008) ; 75(6) : 672-4. (Impact factor : 2,25)

2. J. CLOUET, C. VINATIER, C. MERCERON, M. POT-VAUCEL, Y. MAUGARS, P. WEISS, G. GRIMANDI, J. GUICHEUX.

From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage.

Drug Discovery Today (2009) ; 14(19-20) : 913-25. (Impact factor : 6,63)

3. 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.

Joint Bone Spine (2009) ; 76(6) : 614-8. (Impact factor : 2,25)

4. J. CLOUET, G. GRIMANDI, M. POT-VAUCEL, M. MASSON, B. FELLAH, L. GUIGAND, Y. CHEREL, E. BORD, F. RANNOU, P. WEISS, J. GUICHEUX, C. VINATIER.

Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes.

Rheumatology (2009) ; 48(11) : 1447-50. (Impact factor : 4,23)

5. J. CLOUET, M. POT-VAUCEL, C. VINATIER, M. MASSON, J. LESOEUR, B.H. FELLAH, O. GAUTHIER, M. FUSELLIER, Y. CHEREL, Y. MAUGARS, G. GRIMANDI, J. GUICHEUX.

Characterization of the early aging of intervertebral disc by correlation between MRI, histology and gene expression in rabbit.

Spine, Soumis. (Impact factor : 2,2)

2- Revues non-indexées (Publications nationales)

1. J. CLOUET, C.VINATIER, M. POT-VAUCEL, Y. MAUGARS, G. GRIMANDI J. GUICHEUX.

Physiopathogénie de l'arthrose.

Réalités en rhumatologie (2008) ; 6 : 7-12.

2. C. MERCERON, C. VINATIER, J. CLOUET, S. COLIIEC-JOUAULT, P. WEISS, J. GUICHEUX.

Cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux et biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Revue du Rhumatisme (2008) ; 75(10-11) : 942-44.

3. J. CLOUET, C VINATIER, C. MERCERON, M. POT-VAUCEL, O. HAMEL, P. WEISS, G. GRIMANDI, J. GUICHEUX.

Disque intervertébral : des aspects fondamentaux à l'ingénierie tissulaire.

Revue du Rhumatisme (2009) ; 76(10-11) : 959-64.

4. J.CLOUET, C. VINATIER, J. AMEDEE, D. LETOURNEUR, J. GUICHEUX, G. GRIMANDI.

L'Ingénierie tissulaire : du principe aux applications.

Le Moniteur Hospitalier (2009) ; 219 : 31-42.

Activités d'encadrement

Madame Marianne POT-VAUCEL.

Interne de Rhumatologie.

Master II : biologie biotechnologie et recherche thérapeutique, Université de Nantes (Promotion 2007-2008).

Monsieur Olivier LUCAS.

Interne de Neurochirurgie.

Master II : biologie biotechnologie et recherche thérapeutique, Université de Nantes (Promotion 2008-2009).

Mademoiselle Anne BLANCHAIS.

Interne de Rhumatologie.

Master II : biologie cellulaire physiologie pathologie, Université Paris VII (Promotion 2009-2010).

Mademoiselle Pauline COLOMBIER.

Etudiante en Sciences.

Master II : biothérapies tissulaire, cellulaire et génique, Université Paris XIII (Promotion 2010-2011).

Abréviations

<p>AAV : Adeno-Associated Virus ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats AF : <i>Annulus fibrosus</i> AGE : Advance Glycation End-products AINS : Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien ALIF : Anterior Lumbar Interbody Fusion ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé ARNi : ARN interférent ARNT : Aryl Hydrogen Receptor Nuclear Translocator ATP : Adénosine Tri-Phosphate BMP : Bone Morphogenetic Protein CD : Cluster of Differentiation CDH : N-cadhérine CDK : Cycline Dependent-Kinase CILP : Cartilage Intermediate Layer Protein CIMP : CpG Island Methylator Phenotype CoCrCo : Cobalt-chrome-cobalt CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses CSTA : Cellules Souches Mésoenchymateuses du Tissu Adipeux CTGF : Connective Tissue Growth Factor Dhh : Desert hedgehog DIV : Disque Intervertébral EGF : Endothelial Growth Factor FasL : Fas Ligand FDA : Food and Drug Administration FGF : Fibroblast Growth Factor FIH : Facteur Inhibant HIF GAG : Glycosaminoglycane GDF : Growth Differentiation Factor GFP : Green Fluorescent Protein HIF : Hypoxia Inducible Factor HPMC-Si : Hydroxypropylméthylcellulose silanisée HRE : Hypoxia Response Element hTERT : Human Telomerase Reverse Transcriptase HtrA1 : HtrA serine peptidase 1 IGF : Insulin Growth Factor Ihh : Indian hedgehog</p>	<p>IL : Interleukine IRM : Imagerie par Résonance Magnétique MEC : Matrice Extra-Cellulaire MGP : Matrix Gla-Protein miRNA : micro RNA MMP : Matrix Metallo Proteinase NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule NGF : Neural Growth Factor NP : <i>Nucleus pulposus</i> OP : Osteogenic Protein PDGF : Platelet-Derived Growth Factor PDN[®] : Prosthetic Device Nucleus[®] PEEK : PolyEther-EtherKeton PEG : Poly Ethylène Glycol PHD : Propyl Hydroxylase PG : Protéoglycane PGE : Prostaglandin PLIF : Posterior Lumbar Interbody Fusion PRP : Platelet-Rich Plasma Shh : Sonic hedgehog SiRNA : small interfering RNA SNAP : Synaptosomal-Associated Protein SOSTDC : Sclerostin Domain Containing SZP : Superficial Zone Protein TENS : Stimulation Electrique Nerveuse Transcutanée TGF : Transforming Growth Factor THSD2 : Thrombospondine TIMP : Tissue Inhibitors of Metalloproteinases TLIF : Transforaminal Lumbar Interbody Fusion TNF : Tumor Necrosis Factor TRAIL : TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand TWEAK : TNF-like Weak Inducer of Apoptosis UHMWPE : polyéthylène de haut poids moléculaire VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor VHL : Von Hippel-Lindau VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine</p>
---	---

Liste des figures et tableaux

FIGURE 1 : UNITE FONCTIONNELLE RACHIDIENNE ET LIGAMENTS.	- 22 -
FIGURE 2 : ANATOMIE DU SQUELETTE ET DISQUES INTERVERTEBRAUX.	- 23 -
FIGURE 3 : ORGANISATION DU DISQUE INTERVERTEBRAL.	- 24 -
FIGURE 4 : ASPECT EMBRYONNAIRE A 4 SEMAINES DE DEVELOPPEMENT ET COUPE SAGITTALE DE L'EMBRYON.....	- 26 -
FIGURE 5 : DEFINITION DE L'EBAUCHE DU DISQUE INTERVERTEBRAL AU COURS DE LA CINQUIEME SEMAINE D'ORGANOGENESE.	- 27 -
FIGURE 6 : ORGANISATION LAMELLAIRE DE L'ANNULUS FIBROSUS.	- 29 -
FIGURE 7 : SECTION LONGITUDINALE D'UN DISQUE INTERVERTEBRAL LOMBAIRE DE LAPIN.	- 33 -
FIGURE 8 : FONCTION DES FACTEURS INDUITS PAR L'HYPOXIE (HIF)	- 36 -
FIGURE 9 : CLASSIFICATION DE MODIC.	- 44 -
FIGURE 10 : CLASSIFICATION DE THOMPSON	- 46 -
FIGURE 11 : MODIFICATIONS DISCALES AU COURS DU VIEILLISSEMENT ET DE LA DEGENERESCENCE	- 48 -
FIGURE 12 : ASPECT MACROSCOPIQUE DES DISQUES INTERVERTEBRAUX AU COURS DE LA DEGENERESCENCE	- 48 -
FIGURE 13 : PHYSIOPATHOLOGIE DISCALE.	- 50 -
FIGURE 14 : CAGES DE FUSION POUR ARTHRODESE	- 69 -
FIGURE 15 : VOIES D'ABORD CHIRURGICALES POUR ARTHRODESE.....	- 70 -
FIGURE 16 : PROTHESES LOMBAIRES TOTALES.	- 73 -
FIGURE 17 : PROTHESES LOMBAIRES PARTIELLES.....	- 80 -
FIGURE 18 : CHONDROGENESE ET DIFFERENTIATION DES CELLULES MESENCHYMATEUSES EN CELLULES DU NUCLEUS PULPOSUS	- 104 -
FIGURE 19 : PLACE DES DIFFERENTES THERAPIES POUR LA PRISE EN CHARGE DE LA DEGENERESCENCE DISCALE.	- 115 -
FIGURE 20 : INGENIERIE TISSULAIRE APPLIQUEE AU TRAITEMENT DE LA DEGENERESCENCE DU DISQUE INTERVERTEBRAL.....	- 117 -
FIGURE 21 : ANALYSE PHENOTYPIQUE DES CHONDROCYTES NASAUX, DES CELLULES DU NUCLEUS PULPOSUS ET DE L'ANNULUS FIBROSUS EN COMPARAISON DES CHONDROCYTES ARTICULAIRES CHEZ LE LAPIN.	- 126 -

FIGURE 22: SUIVI RADIOGRAPHIQUE DE LA DEGENERESCENCE DISCALE EN FONCTION DU TEMPS, PAR ASPIRATION A L'AIGUILLE ET PAR TRAITEMENT LASER.....	- 138 -
FIGURE 23 : ANALYSE PAR IRM DE LA DEGENERESCENCE DISCALE EN FONCTION DU TEMPS, PAR ASPIRATION A L'AIGUILLE ET PAR TRAITEMENT LASER.....	- 138 -
TABLEAU I : DEFINITION ET CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS TYPES D'ARTICULATIONS.-	24 -
TABLEAU II : RECAPITULATIF DES EVENEMENTS EMBRYONNAIRES ET DES GENES IMPLIQUES AU COURS DE LA FORMATION DU DISQUE INTERVERTEBRAL.	- 28 -
TABLEAU III : DUREE DE VIE DES CELLULES NOTOCHORDALES SELON LES ESPECES.	- 32 -
TABLEAU IV : MARQUEURS PHENOTYPIQUES DES CELLULES DU DISQUE INTERVERTEBRAL..	- 34 -
TABLEAU V : SCORE DE BOOS.....	- 47 -
TABLEAU VI : CLASSIFICATION DES METALLOPROTEINASES ET LEURS SUBSTRATS.	- 52 -
TABLEAU VII : MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES LIEES A L'ATTEINTE CELLULAIRE AU COURS DE LA DEGENERESCENCE ET DU VIEILLISSEMENT DISCAL.	- 54 -
TABLEAU VIII : CARACTERISTIQUES DES PROTHESES LOMBAIRES TOTALES.	- 74 -
TABLEAU IX : ETUDES CLINIQUES RELATIVES A LA PROTHESE DISCALE SB CHARITE III®	- 76 -
TABLEAU X : ETUDES CLINIQUES RELATIVES A LA PROTHESE DISCALE PRODISC-L®	- 77 -
TABLEAU XI: CARACTERISTIQUES DES PROTHESES NUCLEAIRES NON-POLYMERIQUES PREFORMEES.	- 78 -
TABLEAU XII : LES PROTHESES LOMBAIRES PARTIELLES POLYMERIQUES.	- 79 -
TABLEAU XIII : INJECTIONS <i>IN SITU</i> : ETAT DE L'ART.	- 86 -
TABLEAU XIV : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES VECTEURS VIRAUX ET NON-VIRAUX..	- 90 -
TABLEAU XV : ETAT ACTUEL DES AVANCEES EN THERAPIE GENIQUE.....	- 91 -
TABLEAU XVI : ETAT ACTUEL DES AVANCEES EN THERAPIE CELLULAIRE	- 97 -

Table des matières

INTRODUCTION	17
PARTIE I : ETAT DES CONNAISSANCES SUR LE DISQUE INTERVERTEBRAL	21
I- LE DISQUE INTERVERTEBRAL	- 22 -
1- Généralités	- 22 -
2- Formation du disque intervertébral	- 25 -
3- Anatomie du disque intervertébral	- 28 -
4- Vascularisation du disque intervertébral	- 35 -
5- Relations structure-fonction	- 37 -
6- Privilège immunitaire du Nucleus pulposus	- 39 -
II- LA DEGENERESCENCE DU DISQUE INTERVERTEBRAL	- 42 -
1- Aspects cliniques et radiologiques du disque	- 42 -
2- Vieillesse ou dégénérescence discale ?	- 43 -
3- Physiopathologie	- 45 -
4- Problématique des modèles animaux	- 57 -
5- Dégénérescence discale et arthrose : des points communs	- 60 -
 <u>Article 1 : From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage.</u>	
<u>J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, Y. Maugars, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux. Drug Discovery Today. 2009.</u>	
6- Epidémiologie	- 64 -
III- TRAITEMENTS CONVENTIONNELS DE LA DEGENERESCENCE DISCALE ET DES DOULEURS LOMBAIRES	- 66 -
1- Traitements hygiéno-diététiques, pharmacologiques et non-pharmacologiques	- 66 -
2- Traitements chirurgicaux	- 67 -
IV- TRAITEMENTS NOVATEURS DE LA DEGENERESCENCE DISCALE ET DES DOULEURS LOMBAIRES	- 82 -
1- Transplantation de disques intervertébraux	- 82 -
2- Biothérapies	- 83 -

3- *L'ingénierie tissulaire* - 98 -

Article 2 : Intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering.

J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, O. Hamel, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux. Joint Bone Spine, 2009.

4- *Place des traitements novateurs dans l'arsenal thérapeutique* - 113 -

PARTIE II : CONTRIBUTIONS AU DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE

D'INGENIERIE TISSULAIRE 116

I- CONTEXTE..... - 117 -

II- CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES CELLULES DU DISQUE INTERVERTEBRAL ... - 119 -

1- *Problématique* - 119 -

2- *Article 3 : Identification de marqueurs phénotypiques spécifiques des cellules du disque intervertébral et des chondrocytes articulaires* - 121 -

Article 3 : Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes.

J. Clouet, G. Grimandi, M. Pot-Vaucel, M. Masson, H.B. Fella, L. Guigand, Y. Cherel, E. Bord, F. Rannou, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier. Rheumatology, 2009.

3- *Discussion* - 123 -

III- MODELE ANIMAL DE DEGENERESCENCE DISCALE SPONTANEE - 127 -

1- *Problématique* - 127 -

2- *Article 4 : Caractérisation du vieillissement précoce du disque intervertébral chez le lapin par corrélation entre l'IRM, l'histologie et l'analyse phénotypique.* - 129 -

Article 4 : Characterization of the early aging of intervertebral disc by correlation between MRI, histology and gene expression in rabbit.

J. Clouet, M. Pot-Vaucel, C. Vinatier, M. Masson, J. Lesoeur, B.H. Fella, O. Gauthier, M. Fusellier, Y. Chérel, Y. Maugars, G. Grimandi, J. Guicheux. Spine, soumis.

3- *Discussion* - 132 -

IV- DISCUSSION GENERALE - 135 -

PARTIE III : CONCLUSIONS GENERALES – PERSPECTIVES..... 139

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 144

Introduction

Introduction

L'architecture de la colonne vertébrale allie complexité et ingéniosité. Elle repose sur l'assemblage de 23 unités, constituées elles-mêmes d'une vertèbre et d'un disque intervertébral. Le disque intervertébral est l'objet d'attentions particulières en raison de son rôle central et fondamental dans la mobilité du rachis grâce à une organisation interne unique qui lui confère élasticité et résistance. Il permet aux vertèbres cervicales, thoraciques et lombaires du rachis de se déplacer les unes par rapport aux autres. Véritablement indispensable à l'équilibre postural qui régit la position debout de l'être humain, il est aussi capable d'amortir, de transférer et de répartir les contraintes auxquelles il est régulièrement exposé.

Les sollicitations quotidiennes sur ce disque intervertébral font de celui-ci une structure fragile, en particulier aux étages lombaires de la colonne vertébrale. En effet, situé dans les niveaux inférieurs du rachis, il subit les charges compressives les plus importantes, issues de la masse corporelle et des efforts musculaires. Au cours de son vieillissement, le disque intervertébral lombaire montre souvent des signes de dégénérescence. Ceux-ci s'accompagnent parfois de lombalgie, un problème épidémiologique majeur puisqu'elle touche 80% de la population à un moment ou un autre de la vie.

S'intéresser à la lombalgie, c'est donc s'intéresser au disque intervertébral, aux processus qui mènent à sa dégénérescence et aux moyens que nous offre la médecine pour la contrecarrer ou tout au moins diminuer les douleurs qui en découlent. L'observation d'un disque intervertébral, composé d'un anneau fibreux (*Annulus fibrosus*) qui englobe un noyau pulpeux (*Nucleus pulposus*), montre qu'il est beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît. Cette complexité se manifeste à différents niveaux en particulier structural et fonctionnel. Le disque intervertébral partage également certaines caractéristiques avec d'autres tissus spécialisés du corps humain, à savoir une absence de vascularisation et une protection vis à vis du système immunitaire. Malheureusement, une certaine fragilité de ce tissu peut conduire à sa dégénérescence. Les mécanismes conduisant à la dégénérescence

Introduction

discale sont aujourd'hui de mieux en mieux connus mais des incertitudes persistent. Ils mettent en avant le rôle du disque intervertébral lui-même, mais également de structures adjacentes (os sous-chondral et plateaux vertébraux). Ces avancées récentes apportent de nouveaux espoirs pour la prise en charge des patients lombalgiques. Celle-ci est actuellement centrée sur le traitement des douleurs par l'utilisation, notamment, de traitements médicamenteux, mais également chirurgicaux. Ces derniers occupent une place importante avec deux techniques aux principes opposés : l'arthrodèse et l'arthroplastie. L'origine réelle de la maladie n'est malheureusement pas ciblée et les douleurs finissent souvent par réapparaître. Ainsi, le développement de nouvelles approches thérapeutiques est en cours. L'objectif de ces nouvelles approches est basé sur la restauration du tissu natif en traitant l'étiologie de la dégénérescence discale. Il s'agit en particulier des approches de thérapie génique, de thérapie cellulaire et d'ingénierie tissulaire. Celles-ci restent actuellement au stade d'évaluation pré-clinique mais devrait être mises à disposition des cliniciens et des patients dans un futur relativement proche.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au développement pré-clinique d'une approche d'ingénierie tissulaire. La première étape de ce travail a été consacrée à la caractérisation du disque intervertébral et en particulier à la détermination du phénotype des cellules du *Nucleus pulposus* et de l'*Annulus fibrosus* qui le composent. Dans un second temps, nous nous sommes attachés à mettre en évidence l'existence d'une dégénérescence spontanée chez le lapin. Ce modèle spontané permettra d'entreprendre les futures études de faisabilité du concept d'ingénierie tissulaire dans un modèle préclinique pertinent.

Introduction

Ainsi, ce mémoire de thèse s'articule en trois parties :

- L'état des connaissances actuelles de la physiopathologie du disque intervertébral sera réalisé ainsi qu'une présentation des modalités de prise en charge des patients lombalgiques. Les approches novatrices seront ensuite traitées avec un état de l'art pour chacune d'entre elles.
- Une présentation et une analyse de la contribution de ce travail au développement d'une approche d'ingénierie tissulaire seront ensuite réalisées avec la présentation de deux articles expérimentaux. Le premier traite de la caractérisation phénotypique des cellules du disque intervertébral et le second s'intéresse au lapin, modèle de dégénérescence discale spontanée.
- Une conclusion et les perspectives de ce projet seront finalement abordées.

PARTIE I :
**Etat des connaissances sur le disque
intervertébral**

I- Le disque intervertébral

1- Généralités

Une unité fonctionnelle rachidienne est constituée de deux vertèbres adjacentes reliées entre elles par un disque intervertébral (DIV) en position antérieure, les deux processus articulaires en position postérieure, et le système ligamentaire (Figure 1). Des plateaux cartilagineux localisés au niveau des vertèbres recouvrent la structure discale au-dessus et en-dessous. Le système ligamentaire est constitué de sept ligaments : jaune, capsulaire, interépineux, supraépineux, longitudinal antérieur, longitudinal postérieur et intertransverse (Figure 1).

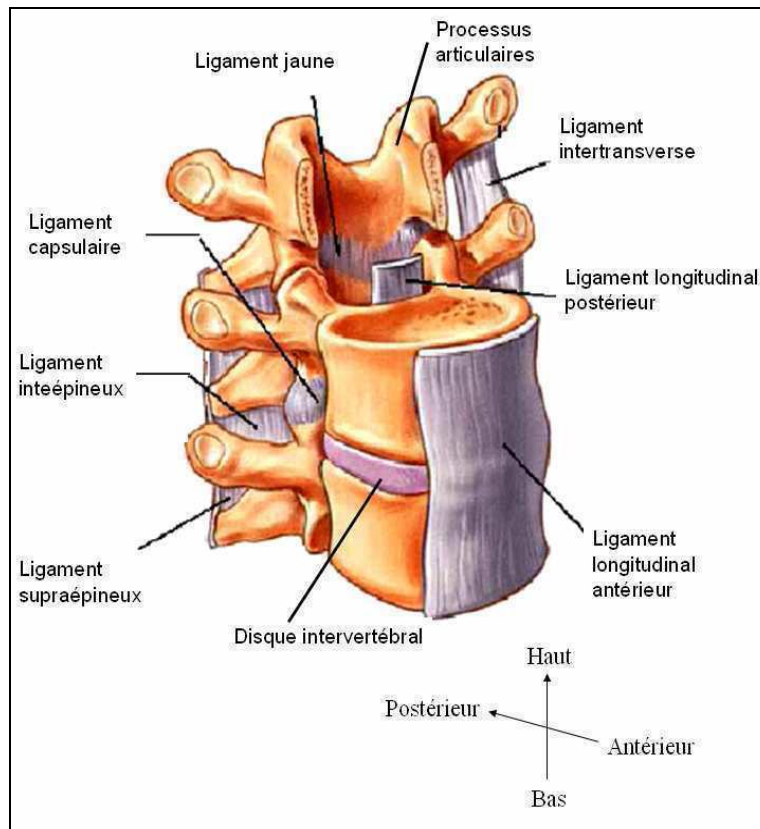


Figure 1 : Unité fonctionnelle rachidienne et ligaments (Source : Anatomie clinique du rachis lombaire et sacré. Nikolai BOGDUK. 2005. Ed. Lavoisier).

La colonne vertébrale humaine est composée de 23 DIV représentant un quart de sa hauteur [1] et distribués de la façon suivante : 6 au niveau cervical, 12 au niveau thoracique et 5 au

niveau lombaire (Figure 2). Seule l'articulation entre l'atlas et l'axis au niveau cervical supérieur en est exempte.

Les DIV sont des articulations semi-mobiles (amphiarthroses) [2] qui participent activement à la cinématique rachidienne (Tableau I). Chaque DIV présente 6 degrés de liberté et peut-être comparé à une rotule : flexion-extension, latéroflexion droite et gauche, rotation droite et gauche, glissements antéropostérieur et transversal [3].

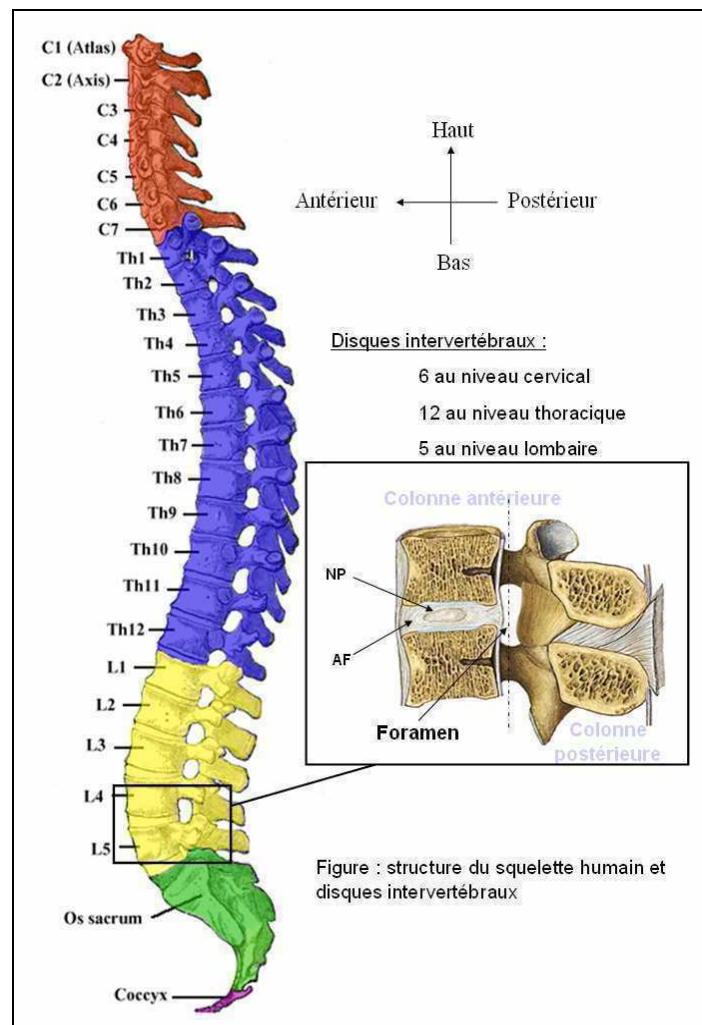


Figure 2 : Anatomie du squelette et disques intervertébraux (source : Anatomie clinique du rachis lombaire et sacré. Nikolai BOGDUK. 2005. Ed. Lavoisier).

Les DIV ont une hauteur de 7 à 10 mm pour un diamètre moyen de 40 mm [2] (Figure 3), mais des variations importantes existent en fonction de leur localisation. Ainsi, les DIV

lombaires ont un diamètre supérieur à celui des DIV cervicaux. De même, le rapport disco/corporéal varie selon la région : 2/5 dans la région cervicale, 1/5 dans la région thoracique et 1/3 dans la région lombaire.

Tableau I : Définition et caractéristiques des différents types d'articulations.

Amphiarthrose	Articulation semi-mobile dans laquelle les surfaces articulaires sont réunies par des ligaments fibreux ou fibro-cartilagineux.	Symphyse pubienne, disque intervertébral.
Diarthrose	Articulation synoviale mobile.	Vertèbres, coudes, genoux, cheville.
Enarthrose	Articulation à trois axes mobile aux surfaces sphériques, l'une étant convexe et l'autre concave.	Epaules, hanches.
Synarthrose	Articulation fibreuse fixe entre deux os immobiles.	Sutures crâniennes.

La coupe macroscopique d'un DIV permet de distinguer les trois structures essentielles du DIV : l'*Annulus fibrosus* ou anneau fibreux (AF) qui entoure le *Nucleus pulposus* ou noyau pulpeux (NP) et les plateaux vertébraux (Figure 3).

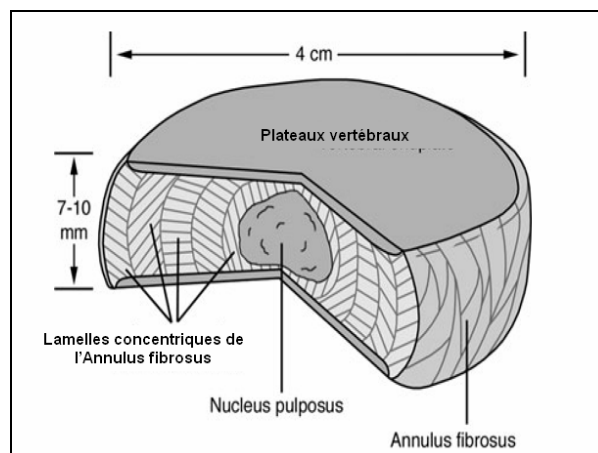


Figure 3 : Organisation du disque intervertébral (d'après Marchand et al, Spine 1990 [4]).
L'Annulus fibrosus entoure le Nucleus pulposus au centre du disque intervertébral. Les plateaux vertébraux se trouvent au-dessus et en-dessous.

2- Formation du disque intervertébral

L'ensemble du squelette, de l'appareil locomoteur et des parois se constitue à partir des somites dérivés du mésoblaste para-axial (ou mésoderme) pendant la troisième semaine du développement embryonnaire. Les cellules qui dérivent du mésoderme, par opposition à l'endoderme et à l'ectoderme, forment les organes internes à l'exception du système nerveux (dérivant de l'ectoderme) et des organes des systèmes digestif et respiratoire (issus de l'endoderme).

La formation du squelette axial débute au cours de la quatrième semaine. Au cours de cette quatrième semaine (Figure 4), certaines cellules du sclérotome migrent vers la région axiale de l'embryon et entourent complètement la notochorde. Il en résulte, à la fin de la quatrième semaine, une colonne mésoblastique dense centrée par la notochorde constituée de blocs de sclérotome (un par métamère) séparés les uns des autres par du mésenchyme intra-embryonnaire très lâche. La notochorde commence alors à définir l'axe longitudinal du squelette final. Des interactions communes entre colonne mésoblastique (cellules mésenchymateuses) et notochorde (cellules notochordales) ont lieu. Deux gènes, *Pax1* et *Pax9*, sont précocement exprimés par les cellules mésenchymateuses et notochordales avec des profils d'expression qui varient dans le temps [5, 6]. Le rôle pivot de *Pax1* pour le développement du squelette axial est aujourd'hui bien démontré au regard des anomalies du squelette des souris déficientes pour ce gène [7]. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui régulent à leur tour des gènes cibles [8]. En association avec *Pax1* et *Pax9*, le gène *Shh* (Sonic hedgehog), qui n'est exprimé que par les cellules notochordales, jouerait également un rôle important. En effet, la protéine Shh produite par les cellules notochordales va stimuler l'expression de *Pax1* par les cellules mésenchymateuses.

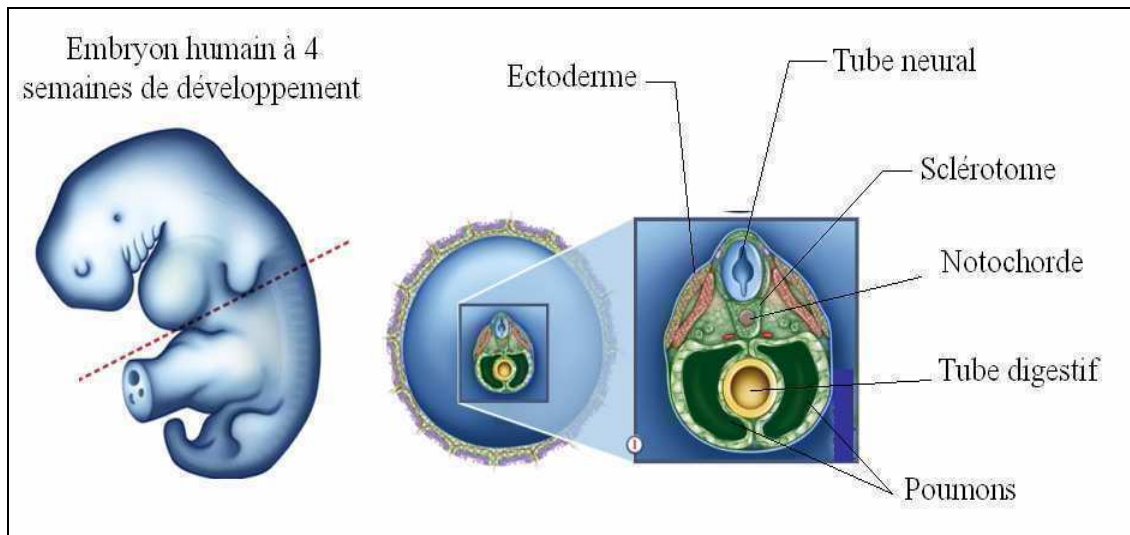


Figure 4 : Aspect embryonnaire à 4 semaines de développement et coupe sagittale de l'embryon (Source : Embryologie. Ulrich Dre'ws. 2006. Ed. Flammarion). Le sclérotome dérivé du mésoderme entoure la notochorde qui va définir l'axe longitudinal du squelette final.

A partir de la cinquième semaine (Figure 5), il apparaît au niveau de chacun de ces blocs de sclérotome deux zones plus denses, crâniale et caudale séparées par une zone à prolifération cellulaire moins active. La partie caudale de chaque bloc sclérotomial métamérique prolifère activement et s'accroche à la partie crâniale du bloc sclérotomial sous-jacent. Il résulte de cette migration la formation d'un amas cellulaire dense constituant un corps vertébral précartilagineux dont l'origine est donc intersegmentaire (à cheval sur deux métamères). Les cellules inférieures de la partie crâniale, moins denses, remplissent l'espace situé entre deux corps vertébraux et forment l'ébauche du DIV qui reste situé au niveau métamérique. De nombreux facteurs exercent un contrôle sur ce processus de différenciation du sclérotome et en particulier le gène *Brachyury* (appartenant à la famille des facteurs de transcription T-box) ainsi que *Noggin*, *Pax1* et *Shh* [9]. Lorsque le sclérotome est formé, la notochorde est influencée, en plus de *Brachyury*, par d'autres facteurs de transcription : les gènes *Sox5*, *Sox6* et *Sox9*. Ces gènes sont bien décrits pour le rôle pivot qu'ils jouent au cours de la chondrogénèse [10]. Les anomalies observées chez des souris déficientes pour *Sox5* et *Sox6* confirment leur importance pour le développement de la notochorde et du NP [11].

La segmentation vertébrale qui découle des différentes étapes ci-dessus est également sous le contrôle des gènes du complexe Hox [12]. Ces gènes interviennent dans la disposition et la forme des vertèbres selon des modalités très précises et complexes encore imparfaitement comprises.

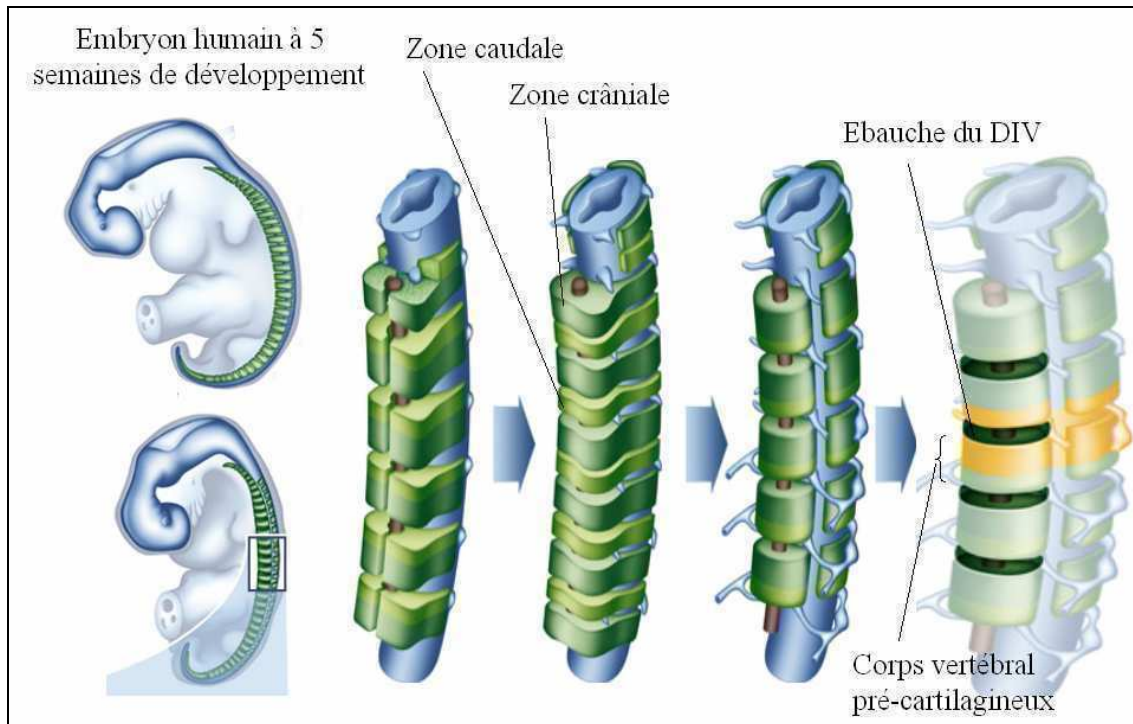


Figure 5 : Définition de l'ébauche du disque intervertébral au cours de la cinquième semaine d'organogénèse (Source : Embryologie. Ulrich Dre'ws. 2006. Ed. Flammarion). Les zones crâniale et caudale fusionnent pour former un corps vertébral pré-cartilagineux. Les cellules de la zone crâniale inférieure se placent entre deux corps vertébraux et forment l'ébauche du disque intervertébral.

A partir de la fin du deuxième mois, le corps vertébral se transforme en cartilage notamment sous l'influence de Sox5, Sox6 et Sox9 [11]. La notochorde régresse, sauf au niveau du DIV, où les restes notochordaux s'étaient et constituent l'ébauche du NP. Ainsi, le NP et l'AF se trouvent enchâssés sur les plateaux vertébraux (inférieur et supérieur) [13], le NP au centre de l'AF.

La mise en oeuvre de ces différentes étapes embryologiques est critique car toute erreur pendant leur déroulement peut conduire à des anomalies de la colonne vertébrale [14], telles que certaines scoliozes de l'enfant.

Le tableau II résume l'ensemble des points énoncés précédemment.

Tableau II : récapitulatif des événements embryonnaires et des gènes impliqués au cours de la formation du disque intervertébral.

Période du dév. embryonnaire	Evènements	Gènes impliqués
4 ^{ème} semaine	Migration des cellules du sclérotome. Notochorde entourée par la colonne mésoblastique constituée de blocs de sclérotome.	Expression précoce de Pax 1 et 9 par les CM et les CN. Expression du gène Shh par les CN. La protéine Shh diffuse et stimule l'expression de Pax1 par les CM.
5 ^{ème} semaine	Les blocs de sclérotome sont à l'origine de la formation d'un corps vertébral précartilagineux (1). Les cellules inférieures de la zone caudale constituent l'ébauche du NP (2). Segmentation vertébrale (3).	Brachyury (1,2,3) Noggin (1) Pax1 (1) Shh (1) Sox5, Sox6 et Sox9 (2) Complexe Hox (3)
Au 2 ^{ème} mois	Le cartilage vertébral prend forme au niveau des vertèbres. La régression de la notochorde permet la formation du NP.	Sox5, Sox6 et Sox9.

CM : Cellules Mésenchymateuses ; CN : Cellules notochordales ; Shh : Sonic hedgehog.

3- Anatomie du disque intervertébral

3-1 *L'Annulus fibrosus*

L'AF possède une matrice extracellulaire (MEC) constituée d'un réseau de fibres de collagène formant une structure qui encercle le NP. Ce réseau de fibres de collagène prend la forme de lamelles concentriques disposées de façon lemniscatoire respectant des angles bien précis [13]. Au sein d'une même couche, les fibres de collagène sont obliques et orientées d'environ 30 degrés par rapport au plan transverse (Figure 6), mais des variations locales importantes peuvent être observées [4, 15]. Le nombre de couches distinctes varie avec la circonférence, avec un maximum en position latérale (25 couches) et un minimum en position postérieure (20 en moyenne) [4].

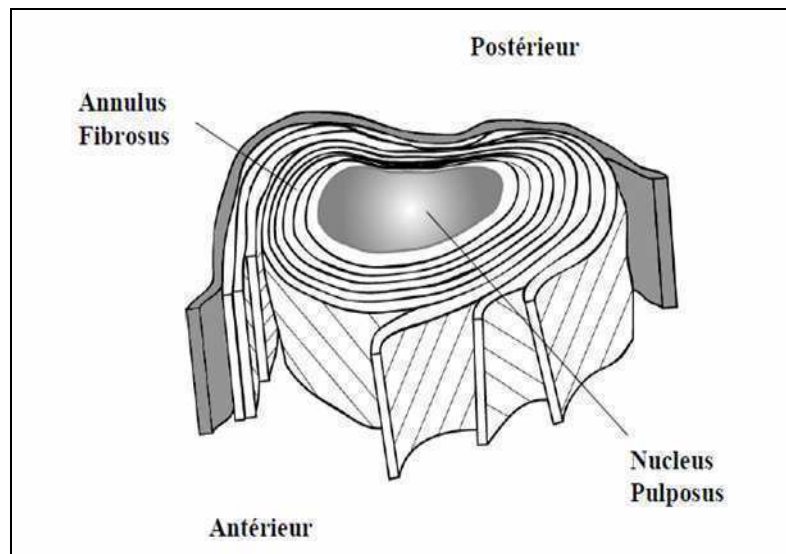


Figure 6 : Organisation lamellaire de l'Annulus fibrosus (d'après Marchand et al, Spine 1990 [4]). Les lamelles concentriques s'enchaînent de façon lanniscatoire. Le nombre de lamelles est maximal au niveau antérieur.

L'analyse du contenu de ces fibres montre la présence majoritaire des collagènes de type I (80%) et II (20%) [16-18]. La présence de collagènes de type III (aux âges précoces puis remplacé par du collagène de type II), V, VI, IX et XI a été aussi décrite mais en proportion très faible [16-19]. A mesure que l'on progresse du centre du DIV vers sa périphérie, la proportion de collagène de type I augmente, pour devenir prédominante dans l'AF externe [17]. Ainsi, cette partie est plus fibreuse, mieux ordonnée, et présente une résistance en tension supérieure à l'AF interne. Celui-ci, proche du NP, est moins organisé et moins rigide. Inversement, la proportion en eau décroît de l'AF interne vers l'AF externe [20]. Les cellules de l'AF produisent au niveau intralamellaire une glycoprotéine, la lubricine, connue pour son rôle lubrifiant des articulations diarthrodiales [21]. Cette protéine interviendrait dans la gestion des frottements que le DIV subi [22, 23].

La densité cellulaire au niveau de l'AF est de 9000 cellules/mm³ [2, 13, 24] et le phénotype des cellules de l'AF est classiquement assimilé à celui de fibroblastes [2, 13, 24].

3-2 Le Nucleus pulposus

Le NP constitue un tissu hautement hydraté. Sa MEC est faiblement organisée par rapport à celle de l'AF. Elle est composée essentiellement de protéoglycanes (PGs) [25]. Il s'agit en majorité d'agrécane chargé négativement intervenant dans la rétention hydrique et l'état d'hyperhydratation du NP. Le collagène présent majoritairement au niveau du NP est de type II [25] contrairement à l'AF. Les autres collagènes minoritaires sont de type I, III (aux âges précoces puis remplacé par du collagène de type II), VI et IX [19, 25]. Des fibres d'élastine orientées radialement sont également présentes [16-18, 26]. La lubricine est aussi présente au niveau du NP. De façon intéressante, la présence de la lubricine au niveau de l'AF et du NP n'existe pas chez les quadrupèdes. Selon Shine, sa présence au niveau de l'AF et du NP serait une caractéristique propre à l'homme [23].

La densité cellulaire du NP est, chez l'homme jeune, de 3000 cellules/mm³. Le phénotype chondrocytaire des cellules est communément admis [2, 13, 24, 27-29] mais fait actuellement l'objet d'un débat sur lequel nous reviendrons.

Une caractéristique majeure du NP est la présence concomitante au sein de celui-ci, tout du moins chez un sujet jeune, de deux types cellulaires : des cellules au phénotype « chondrocytaire » et des cellules notochordales [16-18]. La morphologie particulière des cellules notochordales permet de les distinguer des cellules chondrocytaires. Elles sont plus larges et présentent des vacuoles de taille importante. Les cellules notochordales disparaissent progressivement à partir de l'âge de 16 ans chez l'homme [30]. Cet âge coïnciderait également avec l'apparition des premiers signes de dégénérescence observables chez l'homme. Ainsi, le rôle possible des cellules notochordales dans la prévention ou l'initiation de la maladie discale est aujourd'hui suggéré, mais n'est que partiellement élucidé [31, 32]. Il faut souligner le fait que ces cellules notochordales persistent chez certaines espèces animales même après l'acquisition de la maturité squelettique (souris, rat, chiens non-

chondrodystrophiques). Cette caractéristique constitue une difficulté supplémentaire à l'élucidation de leur rôle [30] qui doit être pris en compte lors de l'analyse des résultats des études animales (Tableau III). Les travaux de Hunter et de Aguiar émettent l'hypothèse que ces cellules notochordales participent au maintien de l'équilibre métabolique de la MEC du NP grâce à la production de signaux paracrines [31, 32]. Ces signaux sont partiellement identifiés mais ils permettent d'assimiler la cellule notochordale à une réserve de facteurs de croissance. Un de ces signaux fait l'objet depuis quelques temps d'investigations complémentaires. Il s'agit du CTGF/CCN2 (Connective Tissue Growth Factor). A l'origine considéré comme un facteur de croissance, il jouerait finalement un rôle modulateur de signaux transmis par d'autres molécules comme le TGF- β que ce soit lors du développement de la notochorde ou de sa maturation [33]. Différentes propriétés lui sont attribuées que ce soit comme facteur pro- ou anti-apoptotique et comme facteur de transcription. *In vitro*, la sécrétion du CTGF/CCN2 permet de stimuler la synthèse de PGs par les cellules chondrocytaires du NP [34]. La relation entre le CTGF/CCN2 et les cellules notochordales semble majeure au regard de la sécrétion de celui-ci au sein des DIV de chiens non-chondrodystrophiques qui présentent la particularité de posséder des cellules notochordales tout au long de leur vie [35].

Depuis plus de 60 ans, l'origine notochordale du NP semblait ne laisser planer aucun doute et les résultats des études chez le rat en attestaient [36]. Des études plus récentes ont néanmoins suggérées que le NP est issu partiellement de la notochorde. Les colorations histologiques de DIV de lapins en fonction de l'âge réalisées par Kim et al. suggèrent que les cellules chondrocytaires du NP sont issues de la migration de cellules des plateaux vertébraux [37]. L'absence du facteur de transcription Brachyury, spécifique des cellules notochordales, au sein des cellules de NP adultes s'oppose également à l'hypothèse selon laquelle les cellules chondrocytaires seraient issues de la notochorde [38]. L'identification et le suivi *in vivo* de précurseurs des cellules du NP et en particulier des cellules notochordales ainsi que

l'utilisation de modèles animaux de chordome, tumeur bénigne résultant de la persistance de résidus notochordaux, ont apporté certains éléments de réponse à cette question. Très récemment, le développement par Choi et *al.* de souris déficientes pour le gène Shh des cellules notochordales a contribué à rendre la réponse de nouveau floue en démontrant que le NP adulte était composé entièrement de cellules descendantes de la notochorde [39]. Ces données contradictoires confirment bien la complexité du DIV que ce soit au niveau de son origine ou de son évolution au cours du vieillissement. L'obtention de ces réponses, pouvant ouvrir de nouvelles voies de réflexion sur les processus de dégénérescence et la mise en œuvre de nouvelles voies de traitement, est nécessaire et passera par une meilleure connaissance des mécanismes embryologiques à l'origine de la formation de la notochorde et de ceux qui contribuent à la disparition des cellules notochordales au cours du temps.

Tableau III : Durée de vie des cellules notochordales selon les espèces (d'après Hunter et al, Tissue Eng. 2003 [30]).

Espèce	Age de la maturité squelettique	Age de disparition des cellules notochordales	Age des premiers signes de dégénérescence discale
Homme	20 ans	12 ans	30-50 ans
Boeuf	3 ans	12 mois	Non-rapporté
Chat	2 ans	18 ans	Rare
Cheval	5 ans	Naissance	Non-rapporté
Chien chondrodystrophique	12 mois	6 mois	2 ans
Chien non-chondrodystrophique	12 mois	5 ans	7 ans
Lapin	6 mois	6 mois	12 mois
Rat	2 mois	12 mois	12 mois
Souris	4 mois	12 mois	Non-rapporté

Le NP et le cartilage articulaire présentent des similitudes. En effet, ils sont avasculaires et non-innervés. Ils présentent des cellules d'aspect sphérique capables de synthétiser une MEC riche en collagène de type II et en agrécane. Ces propriétés les classent dans la catégorie de cellules de type chondrocytaire [2, 13, 40]. Néanmoins, l'origine embryologique différente du NP (notochordale) et du cartilage articulaire (mésodermique), décrite précédemment, impose de nuancer le caractère cartilagineux du NP [32]. Ainsi, l'organisation tissulaire de ces deux

tissus et la composition de leurs MEC (rapport protéoglycane/collagène chez l'homme : 27/1 *versus* : 2/1 [41]) confortent cette idée. Dans ce contexte, des études menées ces dernières années ont confirmé l'existence de différences phénotypiques entre des chondrocytes articulaires et des cellules du NP [42-44, 45 , 46 , 47]. Des marqueurs spécifiques des cellules du NP ont été mis en évidence et sont résumés dans le tableau IV. Ces études souffrent néanmoins d'un biais potentiel lié à l'utilisation de différentes espèces rendant hasardeuses toutes extrapolations à l'homme [48-50]. Très peu de données chez l'homme sont disponibles. Ceci est lié en grande partie aux difficultés d'obtention de prélèvements de DIV « sains » [50]. La Figure 7 résume la composition de la MEC des trois zones (AF externe, AF interne, NP) du DIV.

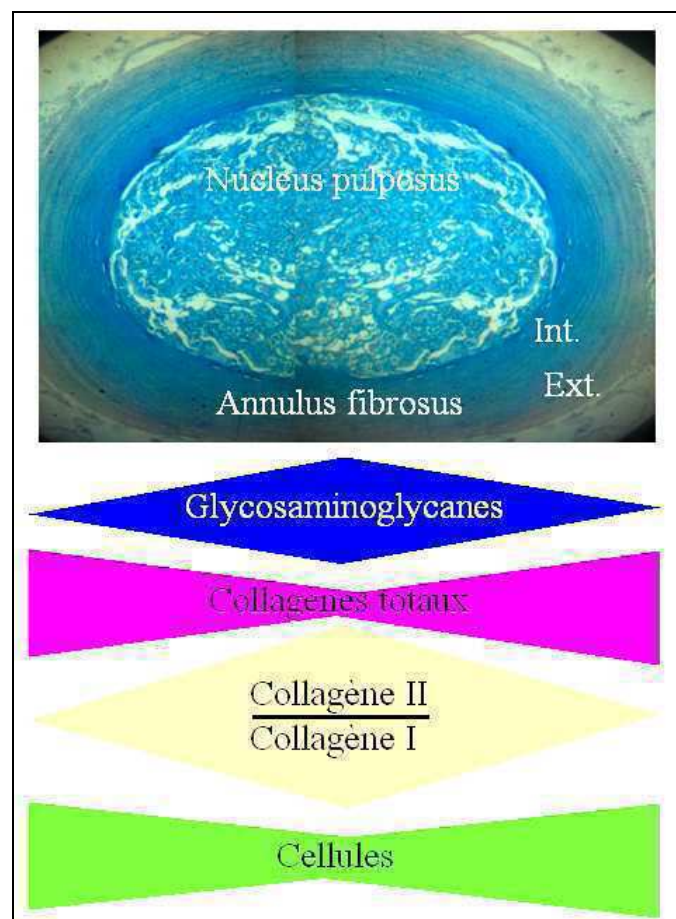


Figure 7 : Section longitudinale d'un disque intervertébral lombaire de lapin. Répartition des constituants de la matrice extra-cellulaire. Int : interne, Ext : externe.

Tableau IV : Marqueurs phénotypiques des cellules du disque intervertébral.

Marqueurs	Description	Echantillons	Bibliographie
CD24	Protéine de surface (Glycosylphosphatidylinositol-anchored)	Rat, homme (chordome)	Fujita [42]
HIF-1 α	Facteur régulateur de l'hypoxie (Hypoxia Inducible Factor-1 α)	Homme Rat	Ha [44] Rajpurohit [45]
GLUT-1	Transporteur de glucose	Rat	Rajpurohit [45]
MMP-2	Métalloprotéinase matricielle	Rat	Rajpurohit [45]
Annexine A3	Protéine de fixation du calcium et des phospholipides	Rat	Lee [46]
Glypican 3	Protéoglycane sulfaté. Récepteur de surface de l'héparine.	Rat Chien	Lee [46] Sakai [49]
Cytokératine 8	Filament intermédiaire typiquement co-exprimé avec la vimentine.	Boeuf et homme	Minogue [48] Gilson [51]
Cytokératine 18		Boeuf et homme Chien	Minogue [48] Sakai [49]
Cytokératine 19		Rat Homme	Lee [46, 50]
Pléiotrophine	Héparin-binding multi-fonctionnel protéine	Rat	Lee [46]
MGP	Protéine Gla matricielle : inhibiteur de minéralisation	Rat Chien	Lee [46] Sakai, Rutges [49, 50]
Versican	Protéoglycane de haut poids moléculaire	Homme	Sztrolovics [47]
CDH2	Glycoprotéine d'adhésion cellulaire (N-cadhérine)	Boeuf et homme	Minogue [48]
SOSTDC1	Régulateur de BMP-7 (Sclerostin domain containing 1)	Boeuf et homme	Minogue [48]
SNAP25	Fusion membranaire et exocytose	Boeuf et homme	Minogue [48]
α -2-macroglobuline		Chien	Sakai [49]
Desmocollin-2		Chien	Sakai [49]
NCAM-1 (=CD56)	Molécule d'adhésion aux cellules neurales-1	Chien	Sakai [49]

3-3 Les plateaux vertébraux

Les plateaux vertébraux, d'une épaisseur de 0,6 mm environ, recouvrent la structure discale au-dessus et en dessous et font partie intégrante du DIV. Ils sont de nature cartilagineuse et participe à la nutrition du DIV [52]. Les concentrations relatives des constituants de la MEC des plateaux vertébraux sont comparables à celle d'un cartilage articulaire classique : une teneur en PGs et donc en eau importante pour la partie en contact avec le NP d'une part, du collagène et de l'eau pour la partie en contact avec l'AF d'autre part [52]. Les fibres de collagène sont orientées horizontalement et parallèlement à la surface du corps vertébral. Du

fait de cette composition, les plateaux sont souples et sont les premiers à subir une déformation lorsqu'un segment vertébral est sous tension.

4- Vascularisation du disque intervertébral

Le DIV est avascularisé ce qui conduit ses cellules à s'adapter métaboliquement à ces conditions environnementales particulières : pauvreté en nutriments et tension en oxygène basse (hypoxie). Cette tension en oxygène est évaluée à 1% au niveau du DIV contrairement à des cellules d'autres tissus, comme les cellules musculaires, qui possèdent 15% de tension en oxygène (normoxie) [53]. Les cellules du DIV chez l'homme se trouvent à une distance de 8 mm environ du vaisseau sanguin le plus proche susceptible de lui fournir de l'oxygène [54]. Ainsi, les cellules du NP doivent utiliser préférentiellement le métabolisme anaérobie par la voie de la glycolyse faiblement consommatrice d'oxygène. L'oxygène consommé ne sert que très peu à la synthèse d'ATP ce qui conduit à l'acidification du milieu extra-cellulaire (par l'intermédiaire de l'acide lactique néoformé). Des pH de l'ordre de 6,9 à 7,2 ont ainsi été rapportés [25].

Depuis quelques années, les connaissances dans le domaine du cartilage articulaire ont permis de mieux comprendre le rôle clef d'une famille de facteurs de transcription dans l'adaptation des chondrocytes articulaires aux conditions hypoxiques environnantes [55]. Cette même famille de facteurs de transcription a été identifiée au sein du DIV [45]. Il s'agit de la famille des facteurs induits par l'hypoxie (HIF : Hypoxia Inducible Factor). Les protéines appartenant à cette famille agissent comme facteurs de transcription dans tous les tissus et sont régulées par le taux d'oxygène [56]. HIF est un hétérodimère (basic-helix-loop-helix-PAS) regroupant deux sous-unités (HIF-1 α et -2 α) et un récepteur transnucléaire ARNT (Aryl Hydrogen Receptor Nuclear Translocator) qui constitue lui-même une sous-unité appelée HIF-1 β . A noter l'existence également de HIF-3 α dont la présence au sein du DIV n'a pas été identifiée à ce jour. Il jouerait un rôle dans les autres cellules en diminuant l'activité de HIF-1 α [57]. Le

mode de régulation en fonction de la tension en oxygène, dans les cellules cartilagineuses notamment, répond aux étapes résumées sur la figure 8.

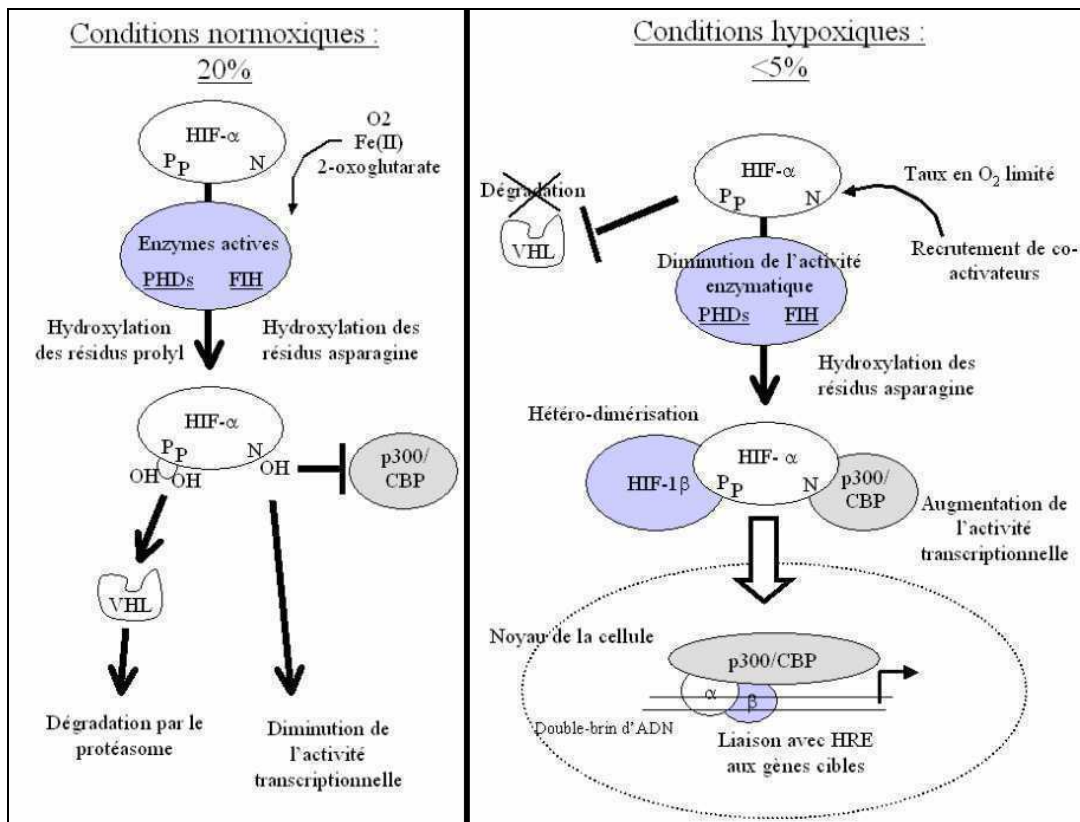


Figure 8 : Fonction des Facteurs Induits par l'Hypoxie (HIF) (d'après Murphy et al. *Arthritis Res Ther*, 2009 [58]). Les membres de la famille de HIF sont des facteurs de transcription régulés post-transcriptionnellement par le taux d'oxygène dans la cellule. L'hydroxylation spécifique de leurs résidus proline et asparagine est assurée par des hydroxylases (PHD : propyl hydroxylase domaine). Ces hydroxylases spécifiques de HIF sont des capteurs d'oxygène moléculaire (associé à du fer et de l'oxoglutarate). PHD cible spécifiquement HIF- α qui après hydroxylation va être dégradé par le protéasome après sa liaison à la sous-unité Von Hippel-Lindau (VHL). En parallèle, le facteur inhibant HIF (FIH : Factor inhibiting HIF) hydroxyle un résidu asparagine. Cette hydroxylation empêche le recrutement du co-activateur p300/CBP et diminue ainsi l'activité transcriptionnelle de HIF. Lorsque la teneur en oxygène diminue (hypoxie), l'activité de PHD et FIH est inhibée. La dégradation de HIF- α n'a pas lieu ce qui lui permet de s'hétérodimeriser avec HIF-1 β et de migrer dans le noyau. La translocation dans le noyau active la transcription des gènes cibles en se liant aux séquences HRE, élément de réponse de l'hypoxie.

De nombreux gènes sont la cible de HIF et sont notamment impliqués dans le métabolisme du glucose, de l'angiogénèse et de la différenciation des cellules chondrocytaires. Curieusement, une dégradation de HIF-1 α dans des conditions normoxiques au sein du cartilage n'est pas

retrouvée au sein des cellules du NP. Ainsi, quelque soit la teneur en oxygène, HIF-1 α est stabilisé au sein de ces cellules [43]. Cette stabilisation a des conséquences métaboliques et les cellules du DIV utilisent exclusivement la glycolyse anaérobie pour produire de l'énergie [59]. Il s'agit d'une spécificité de l'environnement discal à l'origine d'une adaptation des cellules du DIV par rapport aux autres cellules comme celles présentes au sein du cartilage articulaire.

Une dérégulation de ce système est aujourd'hui évoquée pour expliquer les modifications de la MEC au cours de la dégénérescence de certains tissus [60]. De même, le rôle de l'hypoxie et de HIF dans le maintien du phénotype chondrocytaire est probablement à prendre en compte pour le développement des thérapeutiques du DIV et du cartilage articulaire [61, 62]. Nous reviendrons ultérieurement plus en détails sur ces deux points.

5- Relations structure-fonction

La structure très particulière du DIV lui permet de résister à des contraintes mécaniques compressives élevées avec néanmoins des variations selon les étages rachidiens. Le NP transmet ces charges à l'AF sous forme de contraintes radiales et tangentielles. Par ce mécanisme de transmission radiale de la charge, le NP et l'AF interne subissent une compression, tandis que les fibres de l'AF externe se trouvent en tension. Un DIV lombaire augmente en moyenne son rayon de 0,75 mm pour une force de compression d'environ 100 kilogrammes [63]. La quantité de fluide à l'intérieur du DIV n'est pas constante mais dépend de la pression externe appliquée. En position couchée, les contraintes plus faibles sur le DIV lui permettent d'absorber l'eau et les substances nutritives. En position debout, l'écoulement de fluide se poursuit jusqu'à obtention d'un équilibre osmotique où la contrainte externe est alors égalée. Sous compression prolongée (position debout avec une charge en mains), le NP peut perdre jusqu'à 20% d'eau et donc présente une diminution de sa hauteur. Inversement, lorsque la charge est diminuée, le DIV réabsorbe le liquide pour atteindre un nouvel équilibre

osmotique [20]. Le disque s'hydrate lors des changements de position et du mouvement, à la façon d'une éponge soumise à des variations de pression. Ceci explique qu'une personne soit plus grande le matin d'un à deux centimètres.

Ces différents mécanismes d'écoulement des fluides au sein du DIV permettent de définir le comportement rhéologique du DIV comme celui d'un liquide viscoélastique. Ce comportement viscoélastique est transmis par la MEC et notamment celle du NP. La MEC absorbe les forces de compression par l'intermédiaire des variations de la pression osmotique du liquide interstitiel et des PGs présents en son sein [13]. Dans ce contexte, la qualité structurelle de la MEC conditionne la bonne résistance du DIV aux contraintes qu'il subit. Le temps de renouvellement des constituants de la MEC représente l'élément critique pour assurer la continuité dans le temps des propriétés biomécaniques. Les résultats des travaux de Sivan et al. suggèrent que la demi-vie des constituants de la MEC (dans le cas d'un DIV non-pathologique) sont de l'ordre d'une dizaine d'années pour l'agrécan et de 90 ans pour le collagène [64, 65]. Une diminution importante de ces demi-vies a été décrite dans le cas de DIV dégénérés. Elle s'accompagne d'une modification du comportement viscoélastique du DIV avec une augmentation de la viscosité. Ainsi, le temps de relaxation augmente coïncidant avec une diminution des capacités du DIV à absorber les contraintes subies [66].

Ces observations expliquent la place importante que prennent actuellement les études de mécanobiologie et de mécanotransduction dans le domaine de la physiopathologie discale. Elles permettent de mieux comprendre les interactions existantes entre les stimuli mécaniques et les processus biologiques qui en découlent [67-69]. Les résultats récents suggèrent que les cellules du DIV présentent une variabilité de réponse aux stimuli mécaniques qui dépend du type de contrainte appliquée (magnitude, durée, fréquence, point d'impact au niveau du NP...) [70]. Cette variabilité rend complexe l'interprétation des données [3]. Les études sur les mécanismes de mécanotransduction au niveau cellulaire ont permis de montrer l'importance de certains récepteurs transmembranaires (CD44, anchorin II et les intégrines)

[71] et du cytosquelette dans les interactions cellules/MEC [72]. L'importance de l'environnement dans le développement du tissu discal *via* des mécanorécepteurs a également été suggérée [73, 74]. Les structures impliquées sont en particulier des organes tendineux de Golgi (classiquement retrouvés au niveau des muscles) et des corpuscules de Ruffini (classiquement retrouvés au niveau de l'épiderme). Ces mécanorécepteurs renseignent les cellules sur l'intensité et la durée des contraintes et déclenchent des réactions appropriées.

6- Privilège immunitaire du Nucleus pulposus

Le NP présente une propriété particulière appelée privilège immunitaire (ou immun). Cette propriété désigne la capacité d'un tissu à tolérer l'introduction d'antigènes sans apparition d'une réponse immunitaire inflammatoire. Le NP partage cette propriété avec d'autres tissus et organes : le cerveau [75], la rétine [76], les testicules [77] et le fœtus [78]. Il est suggéré que ce privilège immunitaire serait destiné à protéger des structures vitales qui pourraient être lésées lors d'une réaction inflammatoire. Deux éléments vont dans le sens de l'existence de ce privilège immunitaire au sein du NP. Le premier provient de résultats d'études de thérapie génique au sein du DIV et l'utilisation d'adénovirus comme vecteur de la thérapie [79, 80]. Une expression de longue durée du transgène, contrairement à ce qui est observé lors de la transfection d'autres organes ou tissus « immuno-compétents », est observée. Le second élément correspond au fait que le NP lorsqu'il est exposé au système immunitaire, lors d'une hernie discale par exemple, induit une réaction auto-immune [81-85].

Pour expliquer ce privilège immunitaire, la première explication a été basée sur l'existence d'une barrière physique autour de ces tissus, mais les résultats de certains travaux récents suggèrent l'existence de mécanismes moléculaires. Ainsi, il a été démontré que les cellules de ces tissus expriment de façon constitutive et localement Fas-Ligand (FasL ou CD95) [76, 77, 86, 87]. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II appartenant à la famille du TNF. FasL est exprimée par les lymphocytes T activés, les cellules NK, les cellules tumorales et les

cellules des sites immuno-privilégiés [88, 89]. Elle est capable de se fixer à Fas (Apolipoprotéine 1), une protéine transmembranaire de type I qui est exprimée par de très nombreux types cellulaires [88, 89]. Ainsi, au sein d'un tissu immuno-privilégié, les cellules expriment à leur surface FasL. Elles peuvent induire aussi l'apoptose de cellules étrangères par la formation d'un complexe FasL-Fas [90, 91].

La prudence vis-à-vis de la réalité de ces mécanismes moléculaires est néanmoins de mise et nécessite des investigations complémentaires. En effet, comme l'ont évoqué dès 2002 Takada et al. et plus récemment deux équipes chinoises et japonaises, il semble que FasL joue un rôle pivot selon les conditions dans lesquelles se trouvent les cellules [86, 90, 91]. Ainsi, les cellules du NP seraient capables d'empêcher la survie des cellules immunitaires au sein du DIV par couplage avec Fas et l'induction de l'apoptose de ces dernières. Or, au cours de l'expulsion (hernie) du NP, les cellules qui le constituent subiraient l'apoptose induite par les cellules immunitaires. Une des explications avancée pourrait être l'importance de l'association d'une barrière physique et d'une barrière mécanique. Les résultats des travaux de Wang et al. menés sur un modèle de dégénérescence par lésion de l'AF chez le lapin vont dans ce sens [91]. Ils montrent, en effet, que les cellules du NP au sein du DIV non-lésé expriment exclusivement FasL. Au contraire, lors de l'expulsion du NP, les cellules vont exprimer non seulement Fas mais aussi FasL. Pour le moment aucune explication, à notre connaissance, n'a été avancée permettant de comprendre ce phénomène.

Le privilège immunitaire est une propriété majeure du DIV. Il doit être considéré avec intérêt pour son implication potentielle dans le processus dégénératif du DIV. L'absence de réactions antigéniques constitue également un avantage potentiel pour la mise en œuvre de certains traitements, notamment allogéniques.

Partie I : Etat des connaissances sur le disque intervertébral.

L'anatomie complexe du DIV, ses caractéristiques environnementales et immunitaires en font un tissu fragile. Ainsi, il risque de subir une dégénérescence dont les mécanismes font l'objet du chapitre suivant.

II- La dégénérescence du disque intervertébral

1- Aspects cliniques et radiologiques du disque

La lombalgie n'est pas, en soi, une maladie mais un symptôme, qui peut relever de causes variées. La lombalgie se définit comme une douleur ou une gêne fonctionnelle située entre la douzième côte et le pli fessier, associée ou non à des irradiations dans les membres inférieurs [92]. Elle est communément classée en fonction de sa durée d'évolution : aiguës (< 6 semaines), subaiguës (entre 6 et 12 semaines) ou chroniques (>12 semaines). L'origine des douleurs se trouve la plupart du temps au niveau des étages L4-L5 et L5-S1. La cause exacte d'une lombalgie commune est souvent difficile à définir en raison de l'anatomie complexe du rachis [93]. En effet, toutes les structures rachidiennes sont des sources potentielles de douleur (DIV, vertèbres, ligaments, muscles). Ainsi, la distinction entre lombalgie spécifique d'origine rachidienne ou extrarachidienne et non-spécifique (lombalgies communes) d'origine micro-traumatique ou dégénérative [93] est réalisée.

Parmi les causes spécifiques de la lombalgie, la dégénérescence discale est souvent citée. Il est ainsi estimé que 40% des patients qui souffrent de lombalgie présentent une dégénérescence discale avérée [94]. Cette dégénérescence discale, à un stade plus tardif, peut cliniquement se manifester par des radiculopathies, des sténoses spinales ou des hernies [13].

Les techniques modernes d'imagerie ont beaucoup fait progresser le diagnostic des lombalgies symptomatiques, mais n'ont guère permis de progresser dans la physiopathologie des lombalgies communes. Néanmoins, la dégénérescence discale peut être appréciée par radiographie, scanner et imagerie par résonance magnétique (IRM). La radiographie permet uniquement une analyse de critères indirects de cette dégénérescence (hauteur discale et calcification intradiscale). Le scanner permet d'évaluer la morphologie du DIV et d'apprécier son hypodensité. Ces deux techniques d'imagerie ne permettent pas la discrimination véritable des DIV sains et dégénérés au contraire de l'IRM [95]. Cette dernière permet

l'obtention d'images multiplans qui visualisent avec un contraste important le tissu discal. Deux séquences sont disponibles avec des résultats très complémentaires : les séquences en T1 et en T2. La séquence en T1 permet de préciser les modifications au niveau des plateaux vertébraux au cours de la dégénérescence discale. La séquence en T2 reflète l'état d'hydratation du disque. Au cours de la dégénérescence, l'intensité du signal en T2 va diminuer passant d'un blanc net à un dégradé de gris voir noir en cas de dégénérescence tardive [95, 96]. L'association des séquences en T1 et T2 permet de définir la classification du Modic [97, 98] (Figure 9).

Cette classification, qui existe depuis 20 ans, est couramment utilisée par les cliniciens, pour distinguer les patients symptomatiques de ceux qui sont asymptomatiques malgré des signes de dégénérescence à l'IRM. En effet, il est classiquement estimé que seuls 30% des patients qui présentent une dégénérescence à l'IRM sont symptomatiques [99, 100]. Dans ce contexte, le groupe Modic I est particulièrement intéressant. En effet, des études récentes ont montré qu'il s'agirait d'un groupe de patients présentant des lombalgies d'origine dégénérative et qui nécessiteraient une prise en charge précoce. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement car il s'agit d'un élément primordial dans la décision de traiter les patients dans le cadre de la médecine régénérative.

2- Vieillesse ou dégénérescence discale ?

La limite entre le vieillissement et la dégénérescence du DIV est actuellement le sujet de discussions au sein de la communauté scientifique. En effet, ces deux processus ont en commun des modifications structurales comparables au cours du temps [101]. Le délai d'apparition de ces modifications structurales semble être l'élément qui permet de distinguer le vieillissement de la dégénérescence. Le processus de dégénérescence apparaît de façon accélérée [101]. Ainsi, la dégénérescence discale est actuellement définie comme étant une réponse aberrante des cellules du DIV suite à des phénomènes traumatiques et/ou

inflammatoires. Au contraire, le vieillissement correspond à un processus progressif et naturel de l'évolution du DIV [13, 102].

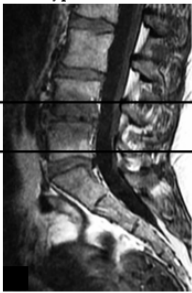


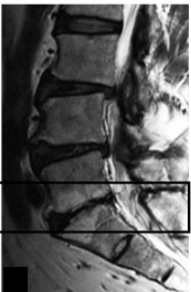
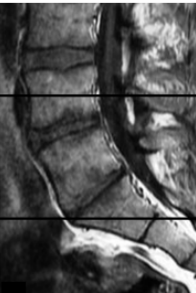
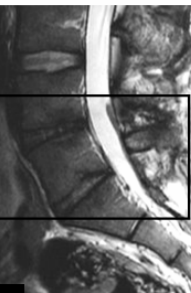
Modic	Nature du tissu et niveau discal	Séquence T1	Séquence T2
I	Inflammatoire L4-L5	Hypointense 	Hyperintense 
II	Graisseux et hypergraisseux L5-S1	Hyperintense 	Hyperintense 
III	Fibreux L4-L5 L5-S1	Hypointense 	Hypointense 

Figure 9 : Classification de Modic [97, 98] (Source iconographique : Dr Joëlle Glemarec, Service Rhumatologie, CHU de Nantes). L'intensité des séquences en T1 et T2 permettent de définir le grade du Modic.

Les études sur le vieillissement s'intéressent au processus de sénescence cellulaire. L'analyse des marqueurs de sénescence permet de définir deux types de mécanismes [103]. Le premier, un phénomène appelé sénescence répllicative, est décrit comme étant le résultat du raccourcissement des télomères au niveau des chromosomes lors des divisions cellulaires successives au cours du vieillissement. Il s'agit dans ce cas d'un phénomène physiologique

inéluçtable. Le second mécanisme, nommé « sénescence prématurée », est induit par le stress en réponse à différents facteurs comme les cytokines ou le stress oxydatif et conduit à une accélération du vieillissement du DIV c'est-à-dire sa dégénérescence [103]. Les marqueurs de sénescence prématurée classiquement augmentés au sein du DIV dégénéré sont p16 et p21 [104-106]. Il s'agit d'inhibiteurs des cyclin-dépendant kinases (CDK), sous-unités catalytiques nécessaires à l'activation des cyclines dont l'expression est périodique au cours du cycle cellulaire. Leur action inhibitrice induit l'arrêt du cycle cellulaire en différents points et est à l'origine d'une diminution de la prolifération cellulaire.

Différentes études menées dans le domaine du cartilage et de l'arthrose corroborent les données ci-dessus. Elles ont permis d'identifier des facteurs de risque qui semblent être tout à fait applicables au DIV : présence de radicaux libres [107], charges mécaniques inadaptées [108], excès en cytokines inflammatoires [109]...

3- Physiopathologie

3-1 Modifications tissulaires et évaluation

Il est très difficile de distinguer les modifications observables au niveau du DIV selon qu'il s'agisse d'un processus de vieillissement ou de dégénérescence. Les conséquences dans les deux cas sont cependant superposables. Ainsi, la connaissance des changements observés au niveau du DIV au cours du vieillissement ou de la dégénérescence bénéficie des résultats des nombreuses études macroscopiques et histologiques menées sur cadavres. Il apparaît clairement que le NP est l'élément touché en premier [110], suivi par l'AF [2]. Les modifications observées ont fait l'objet de classifications, notamment celles de Thompson [111] au niveau macroscopique (Figure 10) et de Boos au niveau histologique (Tableau V) [112].

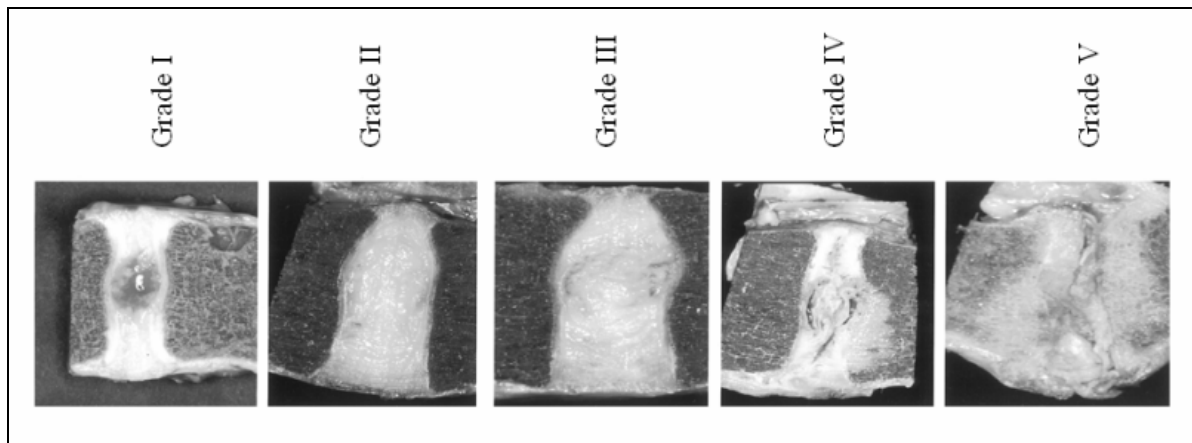


Figure 10 : Classification de Thompson (d'après Thompson et al. Spine. 1990[111]). Elle est constituée de cinq grades de I à V selon la gravité de l'atteinte du disque intervertébral.

La synthèse des modifications qui apparaissent au cours de l'atteinte discale est présentée sur la figure 11. L'atteinte discale conduit le NP à perdre peu à peu son aspect « gélatineux » en faveur d'un aspect fibreux. Cette modification d'aspect est liée à la modification structurale progressive de la MEC [2, 13, 101, 113]. Le contenu en collagènes augmente mais coïncide avec le remplacement du collagène de type II par du collagène de type I à l'origine de cet aspect plus fibreux. En parallèle, le contenu en PGs diminue et ceux présents sont pour la plupart dégradés, engendrant un aspect granulaire du tissu. Une diminution de la pression osmotique est observée [2] entraînant une diminution de la densité cellulaire [114]. A un stade encore plus avancé du vieillissement ou de la dégénérescence, des déchirures et craquelures peuvent apparaître au sein de la MEC du NP. Quant à la MEC de l'AF, ses fibres de collagène sont beaucoup plus irrégulières et fines rendant fragile l'ensemble de la structure [2]. Cette fragilisation conduit à sa déchirure, selon des modes très variables pouvant à terme conduire à l'expulsion du NP (hernie discale). La frontière anatomique entre le NP et l'AF se fait de moins en moins précise (Figure 12). L'apparition de néo-vaisseaux et de nerfs au sein du tissu discal est également un élément clef [115, 116]. Enfin, il faut aussi signaler une acidification non-physiologique (pH proche de 6,6 versus 6,9 à 7,2) de la MEC des DIV dégénérés [117, 118]. Ce processus contribue à une atteinte de l'intégrité des cellules contenues au sein de la

MEC et notamment de leur capacité à synthétiser des PGs [119]. Récemment, l'existence d'un processus de calcification au sein des DIV dégénérés a été rapporté avec une augmentation de l'expression du collagène de type X et de Runx2, deux des marqueurs classiques de l'hypertrophie chondrocytaire [120].

Tableau V : Score de Boos (d'après Boos et al. Spine. 2002 [112])

Disque intervertébral	Plateaux cartilagineux
Cellules 0 = pas de prolifération ; 1 = densité cellulaire augmentée ; 2 = couple de chondrocytes ; 3 = clone de petite taille (2 à 7 cellules) ; 4 = clones de taille modérée (> 8 cellules) ; 5 = clones de taille importante (15 cellules) ; 6 = défaut tissulaire (scar)	Cellules 0 = cellularité normale ; 1 = prolifération cellulaire localisée ; 2 = prolifération cellulaire diffuse ; 3 = prolifération cellulaire étendue ; 4 = défaut tissulaire (scar)
Dégénérescence muqueuse 0 = absent ; 1 = rare ; 2 = intermédiaire ; 3 = abondant ; 4 = défaut tissulaire (scar)	Désorganisation du cartilage 0 = cartilage hyalin bien structuré ; 1 = cartilage irrégulier ; 2 = désorganisation matricielle (finesse) ; 3 = désorganisation complète du cartilage (défauts) ; 4 = défaut tissulaire (scar)
Mort cellulaire 0 = absent ; 1 = rare ; 2 = intermédiaire ; 3 = abondant ; 4 = défaut tissulaire (scar)	Craquelures 0 = absent ; 1 = rare ; 2 = intermédiaire ; 3 = abondant ; 4 = défaut tissulaire (scar)
Formation de déchirures 0 = absent ; 1 = rare ; 2 = intermédiaire ; 3 = abondant ; 4 = défaut tissulaire (scar)	Microfracture 0 = absent ; 1 = présent ; 2 = défaut tissulaire (scar)
Changements granulaires 0 = absent ; 1 = rare ; 2 = intermédiaire ; 3 = abondant ; 4 = défaut tissulaire (scar)	Néoformation osseuse 0 = absent ; 1 = présent ; 2 = défaut tissulaire (scar)
	Sclérose osseuse 0 = absent ; 1 = présent ; 2 = défaut tissulaire (scar)
TOTAL sur 22	TOTAL sur 18

Un nombre important d'études permet aujourd'hui de définir le rôle pivot du DIV mais également de l'os sous-chondral et des plateaux cartilagineux dans la mise en place et la progression du processus de dégénérescence discale. Ces travaux montrent que les interactions entre les cellules et les constituants de la MEC jouent un rôle majeur. Ainsi, comme l'a écrit Buttle, et pour la majorité des maladies dégénératives, une cellule « malade » conduira à la formation d'une MEC « malade », et une MEC « malade » conduira à une atteinte cellulaire à plus ou moins long terme [121].

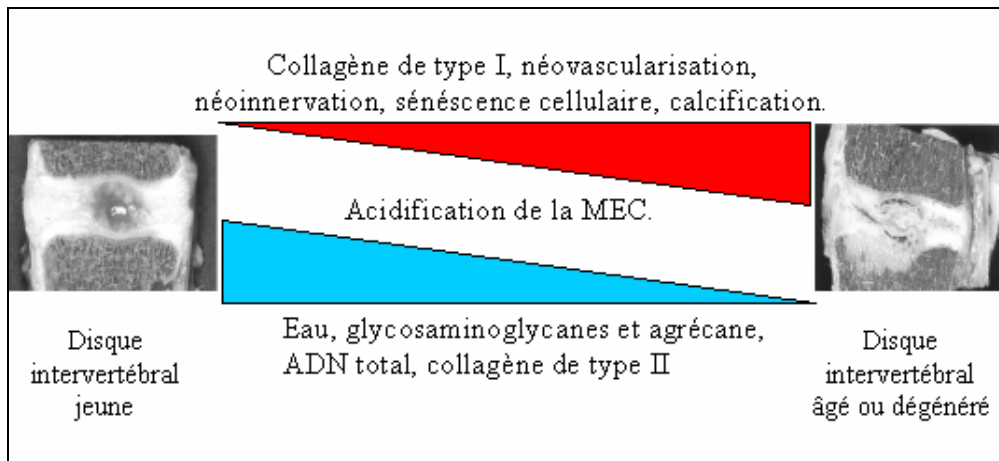


Figure 11 : Modifications discales au cours du vieillissement et de la dégénérescence (Source iconographique : Thompson et al. Spine. 1990 [111]). Le collagène de type II laisse la place à du collagène de type I. En parallèle de la dégradation des glycosaminoglycans et de l'agrécane, l'hydratation du Nucleus pulposus chute. La densité cellulaire diminue et le statut non-vascularisé et non-innervé du disque intervertébral est perdu. Un processus de calcification apparaît.

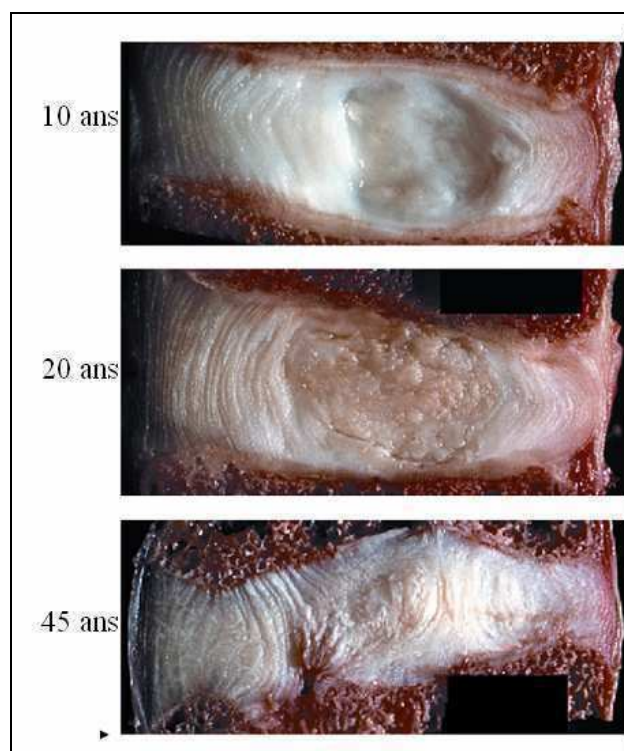


Figure 12 : Aspect macroscopique des disques intervertébraux au cours de la dégénérescence (d'après Adams et al. Matrix Biology. 2009 [4]). La frontière entre le Nucleus pulposus et l'Annulus fibrosus disparaît peu à peu au cours du temps. L'aspect du Nucleus pulposus passe d'un aspect blanc gélatineux visqueux à une structure déshydratée et plus fibreuse.

3-2 Implications du disque intervertébral

La figure 13 résume le processus de dégénérescence discale et les conséquences au niveau de la MEC du DIV.

- Rupture de l'homéostasie métabolique :

L'intégrité du DIV dépend de l'équilibre du métabolisme cellulaire produisant la MEC, l'anabolisme compensant le catabolisme. Les premiers évènements de la dégénérescence discale ainsi que sa progression coïncideraient avec la rupture de l'homéostasie métabolique. Les facteurs initiateurs (anaboliques et/ou cataboliques) de cette rupture ne sont pas parfaitement identifiés mais de multiples médiateurs moléculaires seraient mis en cause. Les recherches *in vitro* ont permis d'identifier les médiateurs suivants.

Parmi les facteurs anaboliques, les cytokines et les membres de la super-famille du TGF- β (Transforming Growth Factor) seraient essentiels [25, 122] : le TGF- β , les BMP-2 (Bone Morphogenetic Proteins) et -7 (ou OP-1 : protéine ostéogénique) ainsi que CIMP-1 (CpG island methylator phenotype). Ces facteurs de croissance, utilisés classiquement *in vitro* comme des facteurs de différenciation chondrogénique, sont capables d'induire l'expression de marqueurs chondrocytaires par les cellules du DIV. Ils augmentent notamment la synthèse de collagène de type II et de PGs [123]. Le TGF- β est également capable d'inhiber l'expression de CTGF, un des médiateurs essentiels de l'angiogénèse. Ainsi, il a été suggéré que durant la dégénérescence discale, l'apparition de vaisseaux sanguins était un événement important [122, 124]. Le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) présenterait un rôle bivalent (anabolique et catabolique) mais participerait à la mise en place du processus de dégénérescence discale [125].

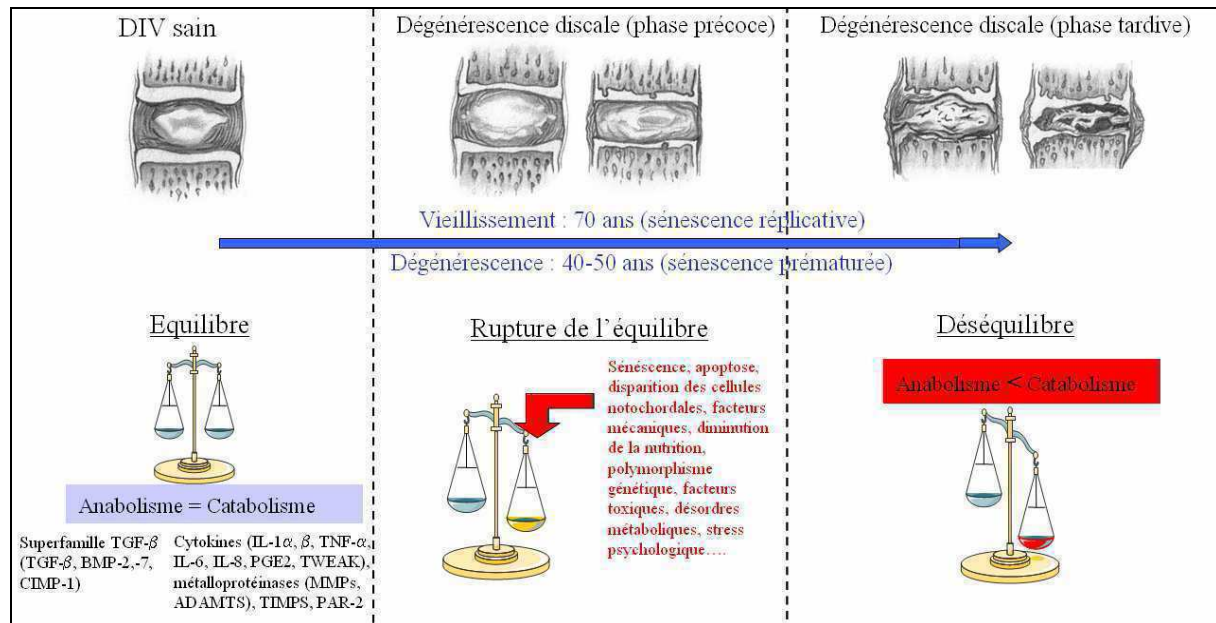


Figure 13 : Physiopathologie discale. Le disque intervertébral constitue le premier acteur de sa dégénérescence. Celle-ci suit un mode d'évolution accélérée en comparaison du vieillissement « physiologique ». Cette différence est expliquée par des mécanismes de sénescence cellulaire différents. L'équilibre entre anabolisme et catabolisme permet le maintien de l'intégrité de la matrice extra-cellulaire. Cet équilibre fragile est rompu progressivement sous l'action de différents facteurs. La matrice extra-cellulaire devient désorganisée. Le disque intervertébral présente peu à peu une néovascularisation et une néoinnervation. La capacité d'absorption des contraintes diminue en parallèle d'une déshydratation qui devient majeure.

Un grand nombre de données est actuellement disponible sur le rôle des facteurs cataboliques qui participe à l'homéostasie de la MEC, et leurs implications dans la dégénérescence discale. Parmi les facteurs cataboliques essentiels, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL (Interleukin)-1α et β ainsi que le TNF (Tumor Necrosis Factor)-α ont fait l'objet de nombreuses études. La sur-expression de ces facteurs cataboliques au cours de la dégénérescence induit une augmentation de la concentration en enzymes cataboliques par les cellules du DIV qui présentent les récepteurs pour l'IL-1 et le TNF-α [25, 103, 126, 127]. Parmi ces enzymes figurent les MMPs (Matrix Metalloproteinases) et les ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats) [25]. Ainsi, différentes études ont montré une augmentation de la concentration en MMP-1 (collagénase-1), -2 (gélatinase A), -3 (stromélysine-1), -7 (matrilysine), -8 (neutrophile collagénase), -9

(gélatinase B), -10 (stromélysine-2), -13 (collagénase-3), -14 ainsi que ADAMTS-1, -4 (agrécane 1), -5 (agrécane 2), -9 et -15 [128, 129, 130, 131]. Toutes ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser des protéines constitutives de la MEC [132] (tableau VI), avec pour conséquence l'altération de son intégrité.

Un rôle important est dévolu à MMP-3 dans la rupture de la balance métabolique au cours de la dégénérescence discale [129, 133-136]. Une des hypothèses pour expliquer son importance dans ce processus dégénératif est la possibilité pour cette enzyme d'être activée à un pH inférieur à 6,9 qui correspond à celui d'un DIV en cours de dégénérescence [137].

Les cathepsines-D et -L, capables de dégrader les collagènes de type I et II ainsi que l'agrécane, voient aussi leurs concentrations augmentées au cours de la dégénérescence discale [138].

En parallèle de l'action de ces enzymes, l'expression par les cellules de leurs inhibiteurs est également dérégulée au cours de la dégénérescence discale. C'est le cas des TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), dont quatre types sont connus (-1, -2, -3 et -4) [134, 139]. Chacun des membres de TIMPs présente une spécificité différente pour un type de MMPs. Ils se fixent de façon covalente, donc irréversible, aux MMPs inhibant leur activité. La dérégulation de ces TIMPs conduit à une augmentation de l'activité des MMPs et donc à une dégradation de la MEC.

L'IL-1 α et β ainsi que le TNF- α sont également capables de stimuler la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, -8 et la PGE₂ (Prostaglandine E₂). Des études récentes ont aussi démontré leur capacité à stimuler la neurogénèse par l'intermédiaire du NGF (Neural Growth Factor) [103] et l'augmentation de la synthèse de la substance P, neuropeptide essentiel intervenant dans la régulation des troubles douloureux [140]. Le DIV perdrait donc le caractère non-innervé qui le caractérisait ce qui expliquerait en partie la douleur liée à la dégénérescence du DIV.

Tableau VI : Classification des métalloprotéinases et leurs substrats.

Collagénases : dégradation des collagènes fibrillaires (type I, II notamment)	MMP-1 MMP-8 MMP-13
Gélatinases : dégradation du collagène de type IV	MMP-2 MMP-9
Stromélysines : clivage des protéines de la MEC mais pas d'atteinte des collagènes fibrillaires	MMP-3 MMP-10
« Membrane-type MMPs »	MMP-4
Matrilysines : dégradation des PGs	MMP-7
Agrécanases : dégradation des PGs	ADAMTS-1, -4, -5, -9, -15

MMP : MAtrix Metalloproteinase, ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats.

Récemment, deux nouveaux facteurs cataboliques potentiellement impliqués dans la physiopathologie de la dégénérescence discale ont été décrits : TWEAK (TNF-like Weak Inducer of Apoptosis), un nouveau membre de la super-famille du TNF- α , et PAR-2 (Proteinase-Activated Receptor-2). Les données relatives à TWEAK montrent qu'il stimule la synthèse de MMP-3, inhibe celle de l'agrécan [141] et diminue l'expression de Sox9 et de versican [142]. L'expression de PAR-2, membre unique d'une nouvelle sous-famille de récepteurs couplés aux protéines G, est stimulée par les cytokines pro-inflammatoires et induit l'activation des MMPs [143].

L'ensemble des médiateurs impliqués ainsi que les conséquences sur l'atteinte discale au cours de la dégénérescence sont résumés dans le tableau VII.

- Atteinte du réseau fibrillaire :

Cette rupture de la balance anabolisme/catabolisme et les modifications au niveau de la MEC qui en découlent s'observent en particulier au niveau du réseau fibrillaire. Celui-ci va perdre ses propriétés de compliance en réponse aux contraintes mécaniques par augmentation des

liaisons entre les fibres de collagènes [131]. Cette stabilisation du réseau fibrillaire s'accompagne d'une diminution de son renouvellement au cours du temps et d'une accumulation de déchets. L'augmentation observée des réactions enzymatiques de glycation conduit à la formation de produits de dégradation (AGEs : Advance Glycation End-products) à l'origine de l'aspect brun du DIV dégénéré opposé à l'aspect blanc d'un DIV sain [13]. Une augmentation de la quantité de composants matriciels habituellement minoritaires est également remarquée. Il s'agit notamment de la fibronectine, de la décorine et du biglycan [2]. Enfin, la présence de néovaisseaux a été montrée, confirmant la profonde modification de la nature du DIV au cours de sa dégénérescence [103]. Récemment Ohba et al. ont démontré que le TNF- α stimulait la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) par les cellules du DIV conduisant à l'apparition de vaisseaux [144].

- Sénescence et apoptose cellulaire :

La rupture de l'homéostasie de la MEC provoque également des modifications du comportement des cellules du DIV. Les mécanismes de la sénescence et de l'apoptose de ces cellules font aujourd'hui l'objet de nombreuses études.

Ainsi la sénescence cellulaire répond à deux mécanismes bien distincts, l'un « physiologique » conduisant au vieillissement naturel du DIV (sénescence réplivative) et l'autre (sénescence prématurée) conduisant à la dégénérescence discale [103] comme nous l'avons décrit précédemment (Chapitre II-2). La sur-expression des inhibiteurs des CDK induit l'arrêt du cycle cellulaire et conduit à la diminution de la densité cellulaire au sein du DIV dégénéré.

Tableau VII : Modifications biochimiques liées à l'atteinte cellulaire au cours de la dégénérescence et du vieillissement discal (Modifié d'après Zhao et al. [145]).

Fonction	Nature	Variation au cours de la dégénérescence et du vieillissement	Répercussions discales
Constituants de la MEC	Collagène de type I	Apparaît et augmente dans le NP	Fibrose du NP
	Type II	Diminue, spécialement dans le NP	Fibrose du NP
	Type III	Augmentation	Tentative de réparation spontanée
	Type IV	Présence entre 16 et 30 ans.	Stade précoce de la dégénérescence.
	Type V	Légère augmentation dans le NP	Indicateur probable de la dégénérescence
	Type VI	Augmentation	Tentative de réparation spontanée
	Type IX	Diminution, similaire au collagène de type II	Fibrose du NP
	Type X	Présence au sein du NP de fœtus et dans des DIV dégénérés (stade tardif)	Stade tardif de dégénérescence
	Fibres élastiques	Diminution	Diminution de l'élasticité du DIV
	Protéoglycanes totaux	Diminution, spécialement dans le NP	Diminution de l'hydratation du NP
	Agrécane	Augmentation transitoire dans l'AF puis diminution dans le DIV	Diminution de l'hydratation du NP
	Décorine	Diminution après l'adolescence	Diminution de l'hydratation du NP
	Versican	Augmentation transitoire dans l'AF puis diminution	Diminution de l'hydratation du NP
	Fibromoduline	Diminution	Altération du réseau fibrillaire
IGF-1	Augmentation dans le DIV dégénéré	Réparation spontanée	
Facteurs de croissance (anabolisme)	TGF- β	Données contradictoires	Remodelage matriciel ?
	IL-1 α	Augmentation dans le DIV dégénéré et hernié	Induction du catabolisme
	MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13	Augmentation	Altération de la MEC
	TIMP-1, 2, 3	Augmentation	Augmentation de l'activité des MMPs : dégradation de la MEC
Facteurs cataboliques	ADAMTS-4	Augmentation	Rôle majeur dans la dégénérescence discale ?
	Cathepsine D, G, K, L	Présence au niveau de l'AF dégénéré	Dégradation de la matrice de l'AF
	BFGF	Augmentation dans le DIV dégénéré et hernié	Lien probable avec une activité protéolytique
	PAR-2	Augmentation dans le DIV dégénéré	Induction du catabolisme
	IL-1 β et IL-6	Augmentation dans le DIV dégénéré et hernié	Induction du catabolisme
Cytokines pro-inflammatoires (catabolisme)	TNF- α	Augmentation dans le DIV dégénéré et hernié	Induction du catabolisme
	TWEAK	Augmentation dans le DIV dégénéré	Induction du catabolisme

L'apoptose, processus par lequel des cellules déclenchent leur mort programmée en réponse à un signal, jouerait également un rôle privilégié dans la mise en place du processus de dégénérescence [146-149]. Ainsi, la présence de signaux extracellulaires, parmi lesquels certains facteurs de croissance déjà décrits précédemment comme acteur de l'homéostasie de la MEC, serait corrélée avec une augmentation de l'apoptose dans des DIV dégénérés. Parmi les voies de signalisation classiques de l'apoptose, le système Fas/FasL, a été décrit comme jouant un rôle majeur [146, 150]. De même, le TNF- α (Tumor necrosis Factor) et le TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) ont également été décrits comme inducteur de l'apoptose au sein de DIV dégénérés [151].

- Implications des cellules notochordales :

Les premiers signes tissulaires de la dégénérescence discale coïncident avec la disparition des cellules notochordales. Leur disparition serait à l'origine d'une diminution de certains signaux cellulaires paracrines indispensables au maintien de l'intégrité discale. Malheureusement, les études *in vitro* portant sur les cellules notochordales souffrent de difficultés relatives à leur isolement, avec la contamination des prélèvements par des cellules « chondrocytaires » du NP. La découverte de marqueurs cellulaires spécifiques, comme la galectine-3 ou certaines intégrines [152, 153], aidera certainement à leur étude.

- Rôle de la famille HIF :

Très récemment, Husa et al. ont émis l'hypothèse de l'existence d'un autre rôle que la régulation de l'hypoxie et en particulier dans les processus de mise en place de l'arthrose [60]. Dans un cartilage sain, HIF-1 α induit la synthèse de collagène de type II et d'agrécan. En parallèle, il régule l'autophagie cellulaire. Au décours de dommages du cartilage, HIF-2 α intervient en inhibant le phénomène autophagique précédent et en induisant une cascade de réactions amenant à l'hypertrophie chondrocytaire et à l'arthrose. Le parallèle entre arthrose et dégénérescence discale n'a pour le moment, à notre connaissance, pas été vérifié.

- Rupture du privilège immunitaire :

Comme nous l'avons vu précédemment, le privilège immunitaire du DIV lui permet de tolérer l'introduction d'antigènes sans provoquer une réponse immunitaire inflammatoire (Chapitre I-6). Récemment, Kaneyama et al. ont émis l'hypothèse d'une possible rupture de ce privilège immunitaire qui expliquerait en partie la dégénérescence discale [90]. Les résultats de cette étude montre une diminution de l'expression de FasL par les cellules au cours de la dégénérescence. Cette diminution entraînerait une perte de la capacité des cellules du NP à se protéger vis-à-vis des cellules immunitaires qui peuvent pénétrer plus facilement au sein du DIV étant donné la néovascularisation existante. Des investigations complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'importance du rôle joué par cette rupture du privilège immunitaire dans le processus de dégénérescence.

3-3 Implications des plateaux vertébraux et de l'os sous-chondral

La plupart des travaux sur l'origine de la dégénérescence discale se focalisent sur l'analyse des désordres observés au niveau du DIV. Néanmoins le rôle potentiel des plateaux vertébraux et de l'os sous-chondral dans la mise en place de la dégénérescence discale commence à être envisagé. En effet, la fonction nutritive des plateaux vertébraux est essentielle au DIV. Leur dégradation entraînerait une altération des capacités de nutrition [154] pouvant conduire à l'atteinte du tissu discal, notamment une réduction de la densité cellulaire et de la capacité des cellules à répondre aux dommages subis. La calcification des plateaux vertébraux participe également à la diminution de la nutrition et à l'accumulation de déchets métaboliques [101, 111, 155]. Ces déchets contribuent à l'acidification de la MEC (pH<6,9) avec les conséquences décrites précédemment [156]. Enfin, des dommages au niveau des plateaux vertébraux exposeraient les molécules antigéniques du NP à la circulation

sanguine et induiraient une réponse immunitaire à l'origine du processus de dégénérescence discale [113].

Très peu de données sont disponibles sur l'os sous-chondral. Cependant, la sclérose de l'os sous-chondral constitue vraisemblablement un élément initiateur de la dégénérescence [101]. Par ailleurs, l'existence d'une composante génétique lors de la dégénérescence ne fait plus aucun doute actuellement. Ainsi, certains polymorphismes génétiques, en particulier pour le gène codant pour le récepteur à la vitamine D essentiel notamment au remodelage osseux et au maintien de l'intégrité squelettique ont été mis en cause [157, 158].

4- Problématique des modèles animaux

Les mécanismes à l'origine du processus de dégénérescence sont aujourd'hui de mieux en mieux connus en grande partie grâce aux études menées chez l'animal. Néanmoins, il est important de souligner que différents modèles de dégénérescence ont été utilisés à l'origine de résultats parfois contradictoires qui peuvent entraîner une certaine confusion sur la compréhension des mécanismes de la dégénérescence.

En effet, les animaux quels qu'ils soient présentent des différences avec l'homme au niveau rachidien. C'est le cas en particulier au niveau anatomique même si la quadrupédie ne semble pas être un obstacle étant donné que les forces qui s'appliquent aux DIV, que ce soit chez les bipèdes et quadrupèdes, sont essentiellement ligamentaires et musculaires. Si les forces gravitationnelles jouent un très faible rôle [159, 160], les différences géométriques sont certaines [161] ainsi que les différences au niveau biomécanique notamment en terme de flexibilité rachidienne. Celles-ci engendrent des différences de contraintes au niveau du rachis selon les animaux [162]. Sur ce dernier point, le rat présenterait des similitudes importantes avec l'homme [163, 164]. Un autre point est l'existence de variations de densité osseuse des vertèbres et une distribution différente de certains constituants de la MEC avec l'homme comme la lubricine [23, 159]. La diffusion au niveau des plateaux vertébraux est également

un paramètre à prendre en compte étant donné les différences importantes observées entre les modèles animaux mais également entre les animaux et l'homme [160, 163]. Des variations de la composition de la MEC des DIV d'animaux sont également un point de discussion [162]. Ainsi, par exemple, le rat ne produit pas MMP-1 pourtant identifiée comme un facteur catabolique majeur de la dégénérescence [162]. Au delà de ces facteurs, la différence majeure avec l'homme est la présence de cellules notochordales tout au long de la vie de certains animaux, contrairement à l'homme. Ainsi, les chiens non-chondrodystrophiques (persistance des cellules notochordales) par opposition aux chiens chondrodystrophiques constituent un très bon exemple. Certes, ils sont intéressants pour étudier le rôle des cellules notochordales dans le processus de dégénérescence mais l'absence de dégénérescence chez ces animaux complique la transposition des résultats à l'homme.

Le choix de l'âge des animaux est également un point majeur à prendre en compte si la volonté est de travailler sur un modèle sans cellules notochordales comme par un exemple un lapin âgé de plus de 6 mois.

Au-delà de ces considérations intrinsèques aux animaux, la technique choisie pour induire la dégénérescence dans un objectif de mieux la comprendre reste souvent inadaptée. Les modèles de dégénérescence peuvent être distingués en 4 catégories :

- Modèles de dégénérescence spontanée :

Etant donné le caractère spontané de la dégénérescence, plus proche théoriquement de la physiopathologie discale humaine, les résultats des études animales paraissent intéressants. Le rat des sables (*Psammomys obesus*), soumis à un régime particulier, présente une dégénérescence spontanée de ses DIV. Il constitue le chef de file de ces modèles [163]. Les autres modèles sont obtenus avec des animaux transgéniques (rat et souris) ayant une mutation d'un gène codant, par exemple pour le collagène de type II [165], IX [166] ou porteur de l'allèle HLA-B27 classiquement retrouvée dans la spondylarthrite ankylosante [167]. Par ailleurs, la petite taille des DIV de ces animaux constitue une réelle limite qui rend

difficile l'obtention de quantités de tissus suffisantes pour permettre des analyses biologiques obligeant la plupart du temps à regrouper le matériel de plusieurs DIV. Cette difficulté peut-être majeure au regard d'actes chirurgicaux complexes.

- Modèles biomécaniques :

Les modèles biomécaniques induisent la dégénérescence en augmentant les contraintes subies par un DIV cible, soit par un dispositif externe de mise en contrainte [168], soit en augmentant ses amplitudes articulaires [169, 170]. Ces modèles induisent un processus relativement proche de la physiopathologie de la dégénérescence du DIV mais au prix de manipulations lourdes et douloureuses pour l'animal. Ils sont néanmoins intéressants pour obtenir des renseignements fiables sur le processus de dégénérescence.

- Modèles par atteinte structurelle directe :

Les lésions structurelles peuvent être réalisées au niveau de l'AF et/ou du NP. Les lésions de l'AF peuvent être obtenues avec une lame de bistouri ou par une perforation de l'AF par une aiguille dont le diamètre est au minimum équivalent à 40% de la hauteur discale moyenne [171, 172]. Dans le cas des lésions du NP, l'aspiration d'une partie du NP est alors réalisée [173]. L'induction de ce type de lésions nécessite une voie d'abord invasive et conduit à un processus dégénératif éloigné de la physiopathologie de la dégénérescence spontanée. L'étude de la physiopathologie par ce type de modèle paraît peu adaptée. Ils trouvent néanmoins, en partie, un intérêt pour les études d'efficacité de thérapeutique sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement.

- Modèles chimiques :

Ces modèles utilisent des substances chimio-nucléolytiques qui induisent une destruction de la MEC, telles que la chondroitinase ABC [174] ou le 5- bromodeoxyuridine [175]. Eloigné du processus « naturel » de la dégénérescence, il paraît inapproprié d'utiliser ce type de modèle pour des études physiopathologiques. En effet, les substances inductrices de la dégénérescence risquent de provoquer des interactions avec les cellules et les constituants de

la MEC. Des études visant à évaluer certaines thérapeutiques semblent cependant possibles en tenant compte toujours d'éventuelles interactions avec la substance inductrice.

Le choix du modèle animal est conditionné par l'objectif de l'étude à mener. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement afin d'évoquer les modèles animaux disponibles pour une évaluation des thérapeutiques nouvelles de prise en charge de la dégénérescence discale.

5- Dégénérescence discale et arthrose : des points communs

La dégénérescence discale présente d'importantes similitudes avec une autre maladie dégénérative : l'arthrose. Cette maladie ou syndrome qui touche les articulations au cours du vieillissement évolue selon un mode comparable à celui de la dégénérescence discale. Contrairement aux données sur la dégénérescence discale, celles relatives à l'arthrose sont actuellement considérables notamment au niveau de la connaissance de sa physiopathologie, de son épidémiologie et des facteurs de risque susceptibles de rendre un patient « arthrosique ». Sa prise en charge bénéficie également de très nombreuses avancées. La connaissance de ces différentes données est fondamentale et permet d'anticiper et de transposer celles-ci au DIV et à la dégénérescence discale. Dans ce contexte, la première étape de ce travail de recherche a consisté à effectuer une revue de la littérature sur ce thème qui a fait l'objet d'une publication en 2009 (Article 1 : From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, Y. Maugars, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux. Drug Discovery Today. 2009).

Nous avons observé que le parallèle entre arthrose et dégénérescence discale a été rarement réalisé bien que les avancées obtenues autour de l'arthrose ont très souvent conduit à des tentatives de transposition des travaux dans le domaine du DIV. L'arthrose se manifeste, comme la dégénérescence discale, par une atteinte de la MEC du cartilage articulaire. Les glycosaminoglycanes et les collagènes, constituants majeurs de la MEC du cartilage

articulaire et du DIV, sont aussi altérés quantitativement et qualitativement. Une sénescence cellulaire est également retrouvée. Les désordres dégénératifs du cartilage articulaire au cours de l'arthrose sont provoqués par un déséquilibre entre les processus de dégradation et les processus de réparation de la MEC en grande partie superposables à ceux décrits précédemment pour la dégénérescence discale. Ainsi, les médiateurs cataboliques et anaboliques impliqués sont en grande partie identiques [176] : TGF- β , BMPs pour les médiateurs anaboliques, cytokines (IL-1 α et β , TNF- α), MMPs et ADAMTS pour les médiateurs cataboliques. Les MMPs 1, 3, 7, 9 et 13 ont pu être identifiés au sein du cartilage et du DIV sains, et montrent une augmentation de leur expression au cours de l'arthrose et de la dégénérescence discale.

Certaines spécificités semblent néanmoins exister entre l'arthrose et la dégénérescence discale [176]. Ainsi, parmi les ADAMTS, seule ADAMTS-1 présente au sein du cartilage et du DIV sains, voit son expression augmentée au cours de la dégénérescence discale. De même, ADAMTS-8 qui jouerait un rôle dans la physiopathologie de l'arthrose n'est pas retrouvé dans la dégénérescence discale. Parmi les TIMPS, des différences sont également suggérées. Au cours de l'arthrose, l'expression de TIMP-1 est diminuée pendant que celles de TIMP-3 et -4 sont augmentées. Ce profil d'expression n'est pas retrouvé au cours de la dégénérescence discale. Les expressions de TIMPs-1 et -2 y sont augmentées contrairement à celle de TIMP-3.

Ces similitudes et différences doivent être prises en compte lors du développement de traitements par ingénierie tissulaire afin d'obtenir un tissu aux caractéristiques proches du DIV et non du cartilage.

Article 1 :

Des traitements de l'arthrose aux futures thérapies régénératives du cartilage.

Après une brève description de l'articulation et du cartilage articulaire, cet article s'attache à décrire les connaissances actuelles sur l'arthrose et les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires qui y conduisent. De plus, cette revue présente une vue globale des traitements pharmacologiques et non-pharmacologiques proposés actuellement. Un point sur les traitements chirurgicaux et leurs indications est ensuite réalisé. Enfin, cette revue discute des nouvelles approches thérapeutiques de prise en charge de l'arthrose et de réparation du cartilage : l'ingénierie tissulaire et la thérapie génique.

Article 1

From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage.

J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, Y. Maugars, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux.

Drug Discovery Today.

2009; 14(19-20) : 913-25.



Therapeutic strategies for the effective management of OA and cartilage defects.

From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage

**Johann Clouet^{1,2}, Claire Vinatier^{1,3}, Christophe Merceron¹,
Marianne Pot-vaucel⁴, Yves Maugars⁴, Pierre Weiss¹,
Gaël Grimandi^{1,2} and Jérôme Guicheux¹**

¹INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), U791, Centre for Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, Group Physiopathology of Skeletal Tissues and Cartilage Engineering, University of Nantes, France

²Pharmacy, University Hospital of Nantes, France

³GRAFTYS SAS, Aix en Provence, France

⁴Department of Rheumatology, University Hospital of Nantes, France

Osteoarthritis (OA) is associated with cartilage degeneration and an accompanying inflammatory syndrome of the synovium in addition to alteration of the subchondral bone. The molecular and cellular events involved in OA have only partially been elucidated. This review provides a global view of the physiopathology of OA, as well as non-pharmacological and pharmacological treatments for the disorder. An update on surgical treatments and their indications is given with an orientation towards the management of OA and cartilage repair by cell-based regenerative therapies. These promising biological technologies will, potentially, play a major role in the treatment of cartilage-associated diseases.

Osteoarthritis (OA) is a public health concern particularly in modern society and is the leading osteoarticular pathology of developed countries. In the United States, OA is the primary reason for medical consultation in persons older than 60 years of age and affects at least 30% of this subpopulation [1]. Population ageing will probably worsen the socio-economic impact of such pathologies. The growing epidemic of obesity is also an exacerbating factor, with an indisputable role in knee OA [2].

The current view is that OA is a complex syndrome that is, in fact, the ultimate outcome of various factors affecting the joint [3]. Once established, OA is characterised by a decrease in articular cartilage (AC) thickness, subchondral bone sclerosis (bone thickening), formation of osteophytes (bone outgrowth on the joint margin) and modification of the synovial fluid composition (Fig. 1). Several joints might be affected by OA but the sites most commonly affected are knees, hips, fingers and the lumbar and cervical spine. Given that many questions, particularly those concerning the physiopathology of OA, remain unanswered, it is not surprising that treatments, either pharmacological or surgical, only partially address the clinical issue.

Corresponding author: Guicheux, J. (jerome.guicheux@inserm.fr)

Johann Clouet was born in Châteaubriant, France, on 26 November 1975. He obtained his doctorate degree in pharmacy in 2006 and his research master's degree in 2007 at the University of Nantes,



(France). Presently he is working in the department of physiopathology of skeletal tissues and cartilage engineering in the centre for osteoarticular and dental tissue engineering (LIOAD-INSERM U791) at the University of Nantes (France). His research work focuses predominantly on the development of scaffolds and the use of stem cells for cartilage tissue engineering.

Jérôme Guicheux was born in Le Mans (France) on 20 February 1970. He obtained his PhD thesis in 1997 and his degree for directing research in 2002. Currently, he is working as a research director/professor at the national institute for health and medical research (INSERM). He is head of the department of physiopathology of skeletal tissues and cartilage engineering in the centre for osteoarticular and dental tissue engineering (LIOAD-INSERM U791) at the University of Nantes (France). His research focuses on the differentiation process of osteoarticular cells and the use of scaffolds and reparative cells for cartilage tissue engineering.



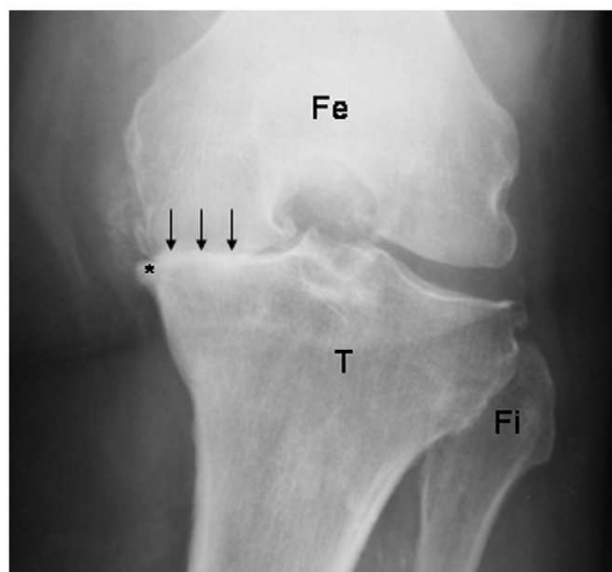


FIGURE 1

X-ray radiographic observation of an osteoarthritic knee (standing anteroposterior view). Characteristic features of advanced osteoarthritis of the medial tibiofemoral joint are shown. Note the joint space narrowing (→) and the formation of osteophytes (*). Femur (Fe); Tibia (T) and fibula (Fi).

For many years, various treatments likely to slow down the OA degenerative process have been assessed in preclinical studies, particularly the Disease-Modifying OsteoArthritis Drugs (DMOADs). In parallel, advances in the field of cell therapy and tissue engineering also deserve to be given major attention.

This review provides a global view of the physiopathology of OA, as well as the non-pharmacological and pharmacological treatments of this debilitating osteoarticular disease.

The joint and the articular cartilage

A diarthrodial joint is a complex structure comprising various connective tissues including AC, synovial membrane, subchondral bone, ligaments and sometimes menisci. All of these structures contribute to joint function and performance. In particular, AC possesses a chemical composition that enables the execution of repetitive loading cycles and a physical structure that allows for essentially frictionless motion.

AC is a slick, white tissue that covers joint surfaces. AC is composed of an extracellular matrix (ECM) produced by chondrocytes, and is characterised by the absence of blood vessels and nerves. Being avascular, cartilage has a low oxygen tension, ranging from 1 to 7%. Chondrocytes are developmentally adapted to these hypoxic conditions by having an enhanced anaerobic glycolysis. Contrary to other mesenchymal tissues (liver, heart, brain, kidney and so on) yet in common with bone, the properties of cartilage are mainly related to its ECM rather than to its cells [4]. Nevertheless, articular chondrocytes play a central role in the equilibrium between ECM synthesis (anabolism) and degradation (catabolism).

AC is organised into four layers according to the type and orientation of collagen fibres, the amount of proteoglycans (PG) and water, as well as the shape and activity of chondrocytes (Fig. 2):

- The outer surface area can be divided into two zones, is in contact with the synovial fluid and provides an essentially frictionless surface. The superficial zone is acellular and contains types I, II and III collagen fibres and low amount of PG. The deepest zone contains ellipsoidal chondrocytes which synthesise lubricin and types I, II and III collagen fibres.
- The transitional area is made up of types II, VI, IX and XI collagen fibres that intersect obliquely in a poorly organised network. This network is less dense and hydrated than that of the outer articular surface. The network of type VI collagen is essentially concentrated around the chondrocytes in the pericellular area [5]. The role of this type VI collagen is not yet clear but certain elements suggest that it interacts with fibres of type II collagen and create a mechanical interface between the chondrocyte and the ECM [6]. The chondrocytes have a round morphology.
- The deep area of the AC contains types II, IX and XI collagen fibres directed perpendicular to the joint surface. Chondrocytes form radial columns aligned along the collagen fibres.
- The calcified area is in contact with the subchondral bone. In this area, cartilage contains a limited number of hypertrophic chondrocytes that synthesise type X collagen. Calcification takes place on collagen fibres, which anchor cartilage to the subchondral bone.

This histological organisation confers the cartilage to its biomechanical properties. The orientation of the collagen fibres decreases shear and compression constraints respectively on the surface and the deep area of the AC.

Physiopathology of osteoarthritis

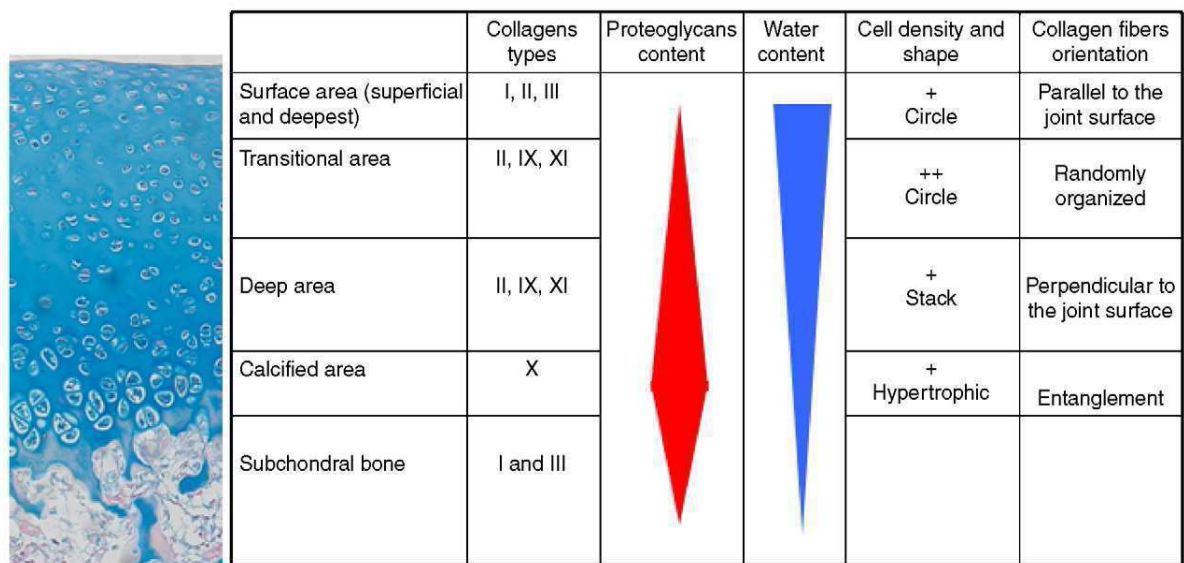
The first physiopathological hypothesis concerning OA was primarily mechanical, based on an age-associated degenerative process of AC. Young joints may, however, also exhibit some clinically benign but erosive lesions of the cartilage, characterised by a slow evolution. The frequency and precocity of these lesions contrast with the slow degenerative process classically described during OA development in elderly patients. This recent consideration makes the physiopathology of OA more complex than a simplistic age-dependent degenerative process of AC and can no longer be regarded as a single disease. It should be seen as a group and perhaps the term osteoarthritic diseases would be more suitable [7]. OA is, therefore, today considered to be a degenerative osteoarticular disease with multiple affected targets including AC, synovium and subchondral bone.

Articular cartilage impairments

During OA degenerative processes, major modifications of AC are observed at the tissue, cellular and molecular levels.

Tissue and cellular levels

Compared with the slick appearance of healthy cartilage, osteoarthritic cartilage surface is rough [3]. The osteoarthritic chondrocyte is obviously activated and exhibits a capacity to divide into clusters. Interestingly, it has also been reported that type IIA



Drug Discovery Today

FIGURE 2

Histological organisation of articular cartilage. Articular cartilage is organised in four zones according to the type and orientation of collagen fibres, amount of proteoglycan and water as well as shape and activity of chondrocytes. A histological section of articular cartilage of the knee stained with Alcian Blue and photographed under a light microscope is shown. +: Moderate cell density, ++: high cell density.

collagen, a splice variant of mature collagen type II mainly expressed during embryologic chondrogenesis, was re-expressed by adult articular chondrocytes in OA cartilage [8]. This data support the hypothesis that OA chondrocytes reverse their phenotype towards a chondroprogenitor phenotype, thereby highlighting the recapitulation of embryonic genes at the adult stage in the pathophysiology of OA [9]. The levels of PG and collagen synthesis are largely increased, at least during the early stage of the disease [10]. It is usually acknowledged that chondrocytes, at this stage, attempt to counterbalance the upregulated catabolic processes. This supraphysiological metabolism precedes the first symptomatic evidence of OA. After these early compensating mechanisms, caspase-mediated chondrocyte apoptosis increases and could therefore contribute to the late mechanisms of cartilage degeneration [11]. With respect to their role in OA, caspases are considered the ultimate messengers of a multiple-step signalling cascade with a variety of upstream activators, notably interleukin-1 (IL-1) and nitric oxide. Inhibition of chondrocyte apoptosis through the caspase signalling pathway could thus be a promising therapeutic target for the management of OA [12].

Molecular level

The destruction of AC and the loss of its biomechanical properties are largely related to the alteration of ECM, particularly the loss of aggrecan. This process results from an imbalance between degradation and synthesis of the matrix components, despite the compensatory activity of chondrocytes (Fig. 3). This point highlights the pivotal role of chondrocytes in the physiopathology of OA.

Among the cartilaginous anabolic factors, Insulin Growth Factor-1 (IGF-1), Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) and Fibroblast Growth Factors

(FGFs) have been extensively described. Interestingly, the level of expression of these factors declines with ageing and advanced OA [13].

An increase in catabolic enzymes responsible for ECM degradation has been reported during OA, predominantly matrix metalloproteinases (MMP-2, -7, -8, -9, -13, -14), A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats-1 (ADAMTS-1) and aggrecanases 1 and 2 (ADAMTS-4 and -5 respectively). IL-1 β and Tumor Necrosis Factor (TNF) have been largely implicated in the increased synthesis of catabolic enzymes by osteoarthritic chondrocytes [14]. Of interest, it has also been reported that a deficit in Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) could also play a pivotal role in the excessive ECM degradation [15].

Several lines of evidence also highlight the role of adipokines in OA [16,17]. Adipokines (leptin, adiponectin and resistin) are proteins produced by white adipose tissue. They are essential regulators of immune and inflammatory responses. All three adipokines have been detected in synovial fluid from OA-affected joints. Fat tissue is, therefore, an active organ that greatly contributes to inflammatory and degenerative processes during OA.

Recently, a role has also been suggested for Wnt/ β -catenin and Smad ubiquitination-related factor 2 (Smurf2) in chondrocyte function and apoptosis [18,19]. Whether the control of these signalling pathways could lead to the development of new therapeutic intervention strategies in OA deserves consideration.

Synovium and subchondral bone alterations

Whilst studies of OA mainly focus on the comprehension of catabolic disorders described in cartilage, a pivotal role for synovium and/or subchondral bone has been recently described. Inflammation of the synovium (synovitis) has often been asso-

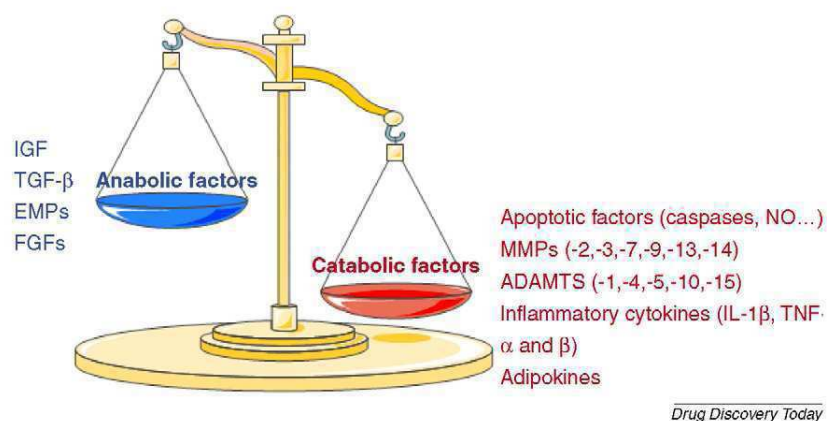


FIGURE 3

Imbalance between anabolic and catabolic factors in the physiopathology of osteoarthritis. This imbalance contributes to the alteration of the biomechanical properties of articular cartilage related to the destruction of its ECM. IGF: Insulin-like Growth Factors, TGF- β : Transforming Growth Factor- β , BMPs: Bone Morphogenetic Proteins, FGFs: Fibroblast Growth Factors, NO: Nitric Oxide, MMPs: Matrix Metalloproteinases, ADAMTS: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats, IL-1 β : Interleukin-1 β , TNF: Tumor Necrosis Factor.

ciated with advanced OA [20]. Synovitis leads to an overexpression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and - β) that in turn contribute to the subsequent catabolic degenerative processes of AC [21]. These cytokines also stimulate the production of nitric oxide by upregulating the expression of iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) and other pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-17, IL-18 and chemokines [22].

The subchondral bone also exhibits noticeable alterations at an early stage of OA with a decrease in osteoblast activity that induces a thinning of the adjacent trabecular bone [3]. At later stages, an excessive bone remodelling is observed in the areas where AC has degraded, which unfortunately results in sclerosis and necrosis of the subchondral bone. This excessive bone remodelling has been suggested to increase the production of cytokines by osteoclasts and could induce the loss or damage of cartilage [23,24]. In addition, the leakage of synovial fluid towards the medullar spaces of the subchondral bone affects the bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), thereby contributing to the formation of osteophytes and cartilage nodules. These deteriorations of the subchondral bone are responsible for joint pain and are largely involved in the progression of OA [25].

Viewed together, these recent advances in the understanding of OA physiopathology clearly indicate that OA is a multi-target disease that affects AC, synovium and subchondral bone. The chronic evolution of OA could consequently be explained by the existence of a vicious circle comprising these three structures.

Risk factors for osteoarthritis

Among the risk factors for OA, it is necessary to distinguish between intrinsic risk factors (age, genetic polymorphisms, sex and hormonal status) and extrinsic risk factors (cartilaginous defects, obesity, microtraumas, joint misalignment, hyperlaxity and tabagism) [26]. Among the intrinsic risk factors, it is clear that age plays a major role in OA. A large body of evidence indicates that the major components of ECM, type II collagen and PGs undergo alterations

in content, composition and structural organisation during ageing. There is also an accumulation of advanced glycation end-products, which enhances collagen cross-linking and contributes to the increase in cartilage stiffness observed with ageing [27]. Their effects are mediated through their direct binding to a specific receptor RAGE (Receptor of Advanced Glycation Endproducts) expressed by chondrocytes. Genetic polymorphisms are also crucial to OA, particularly when they affect genes encoding proteins involved in cartilage biology and ECM structure. Thus, polymorphisms of genes encoding type IX collagen, IGF-1 and vitamin D receptor have been correlated with an increased risk of OA [28]. Among the extrinsic risk factors, cartilaginous defects and obesity are probably the most significant ones. Owing to its poor capacity for spontaneous repair, when AC is damaged, it hardly heals. The traumatic loss of cartilaginous tissue therefore greatly contributes to the subsequent development of osteoarthritic lesions. The deleterious role for obesity in OA is also well established [29] and a prevailing hypothesis is that an increased load on the joint surface because of a large body weight leads to cartilage wear. The most significant link between OA and obesity has been reported for the knee joint (a BMI increase by 1 kg/m² above 27 accounts for an additional 15% increase in risk) [16]. Nevertheless, OA in non-load bearing joints such as metatarsophalangeal joints is also associated with obesity. These data suggest that systemic factors, including adipokines, may be involved in the high prevalence of OA among obese individuals [16,17].

More in-depth research is currently being conducted to evaluate the real impact of polymorphisms, as well as other risk factors, and could end up highlighting the multifactorial nature of OA. Such a multifactorial nature is likely to complicate epidemiological analyses and thereby hamper the development of future treatments.

Treatments for osteoarthritis

The optimal management of OA patients requires a critical combination of both non-pharmacological and pharmacological therapies. Patients who cannot obtain adequate pain relief and functional joint improvement should be considered for the

ultimate OA treatment: the prosthetic replacement of the affected joint.

Non-pharmacological therapies

Non-pharmacological therapies are currently still considered the first intention treatment in OA by the American College of Rheumatology (ACR), EULAR and OARSI guidelines [30–32]. These non-pharmacological treatments are, however, mainly suitable for patients suffering from knee and hip OA. Among the multitude of non-pharmacological modalities, the most widely proposed include weight reduction, education and self-management, referral to a physical therapist, aerobics, muscle strengthening, walking aids, thermal modalities, transcutaneous electrical nerve stimulation and acupuncture.

Pharmacological therapies

For many osteoarthritic patients, the non-pharmacological therapies are not sufficient to produce sustained reduction in the pain and restoration of joint function. Various pharmacological treatments have, therefore, been developed including both the fast- and slow-acting drug families. Some of these drugs are still in development and could be promising for therapeutic intervention, primarily in advanced OA.

The fast-acting drug family

The fast-acting drug family is mainly used for pain relief and includes acetaminophen, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), Cyclooxygenase-2 (Cox-2) inhibitors, glucocorticoids and opioids.

Acetaminophen (otherwise known as paracetamol) significantly reduces pain and increases the quality of life of osteoarthritic patients. The doses of acetaminophen (up to 4 g/day) can, however, trigger adverse hepatic events in patients with hepatic insufficiency [33]. Although OA does not involve systemic inflammation, typical anti-inflammatory compounds such as NSAIDs and Cox-2 inhibitors are largely used as analgesic treatments [34]. They exhibit some adverse effects, however, such as gastrointestinal, renal and cardiovascular toxicity [35]. Today, the association of NSAIDs with gastrointestinal protectors, particularly the proton pump inhibitors, leads to an improved gastrointestinal tolerance. NSAIDs are therefore widely used with adapted doses and are restricted to short-term treatments. For many years, intra-articular injections of glucocorticoids have been successfully administered to prevent pain [26]. They provide, however, only short-term efficacy [36] and exhibit adverse metabolic events. Consequently, the ACR recommended limiting intra-articular glucocorticoid injections to every three or four months. Opioids are considered in the treatment of OA as a final resort when pain is not controlled or for patients with intolerance to other pharmacological treatments [35]. They too, however, exhibit a wide range of adverse effects such as gastrointestinal (nausea, vomiting and constipation), alteration in the cognitive function, dependence and respiratory depression.

The slow-acting drug family

The slow-acting drug family is dedicated to the prevention of pain as well as the slowing down of the cartilage destruction. Several drugs are available, including glucosamine, chondroitin sulfate,

S-adenosyl methionine, avocado/soybean unsaponifiables and hyaluronic acid (HA). Glucosamine and chondroitin sulfate belong to the large family of dietary supplements. Glucosamine is a natural precursor of GAGs that stimulates GAG production by chondrocytes, as well as the synthesis of collagen [37]. The glucosamine found in dietary supplements is usually extracted from the shells of prawns and other crustaceans, or made from maize starch. Positive effects of the oral administration of synthetic glucosamine in OA patients have been demonstrated by a significant reduction in the rate of joint space narrowing [38]. Nevertheless, a direct effect of glucosamine on the prevention of AC erosion has not yet been demonstrated to date [39]. Chondroitin sulfate is one of the major components of cartilaginous ECM. It can be extracted from cartilage of various origins (shark, cow, pig, fish and bird) by chemical treatment. Oral administration of chondroitin sulfate has been reported to decrease the activity of catabolic enzymes in osteoarthritic cartilage and to stimulate the synthesis of GAGs and collagens [40]. The GAIT (Glucosamine/chondroitin Arthritis Intervention Trial) did not, however, demonstrate any effect on pain by comparison with the placebo, when chondroitin sulfate was administered either alone or in association with glucosamine [41]. S-adenosyl methionine (SAM) is a small non-protein metabolite, namely a coenzyme, involved in methyl group transfers between enzymes. Endogenous SAM has been described to exert an antidepressant effect in humans. *In vitro*, SAM increases the synthesis of GAGs in articular chondrocytes, which could suggest that it may be able to aid in the repair of damaged cartilage through this mechanism [42]. Oral administration of SAM induces a significant decrease in pain and an improvement in joint function comparable to that of NSAIDs. In the absence of long-term follow-up, however, it remains difficult to rule out the possibility that the effectiveness of SAM may be related to its antidepressant effect [43]. The evidence for symptomatic efficacy of avocado/soybean unsaponifiable in patients with OA hip or knee available is not clearly established. However, of four studies three studies showed some evidence of efficacy for relief of pain in OA hip and knee [32]. HA is a polysaccharide ubiquitously found in ECMs. It can be extracted from mammalian cartilaginous tissues or produced by bacterial fermentation. The therapeutic concept of visco-supplementation suggests that the intra-articular injections of HA can help restore the viscoelastic and tribologic properties of the synovial fluid. In addition, HA has been proposed as a chondroprotective compound, since it is able to stimulate the production of TIMPs in chondrocytes [44]. Intra-articular injection of HA decreases the symptoms of OA with significant improvements in pain and functional outcomes [45]. This effect appears from 2 to 5 weeks after injection and can persist for up to 12 months. Visco-supplementation is not, however, indicated for patients with advanced OA, or for patients with an articular misalignment [46]. The rare adverse effects of intra-articular HA injection include pain and infection at the injection site, inflammatory responses and hypersensitivity due to excipient components.

Future treatments

To address further the clinical outcome of OA prevention and treatment, several new pharmacological compounds are under intense investigation. On the one hand, novel analgesic and anti-inflammatory drugs able to decrease pain but with reduced

TABLE 1

Analgesics and anti-inflammatory drugs in preclinical development

Targets	Drugs	Clinical status in OA	Company
COX/LOX inhibitor	Licofelone	Phase III beginning in 2008	Merckle
CINODs ^a	Naproxinod SD-6010	Phase III (results in 2009) Phase II–III (results in 2011)	Nicox Pfizer
NSAIDs	IDEA-033	Phase I	Idea Therapeutics
Phospholipase inhibitor	Efipladib	Phase I	Wyeth
TRPV1 ^b	ALGRX-4975 (Adlea) Injectable capsaicin	Phase III (results in 2010)	Adolor
Serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor	Zucapsaicin	Phase I	Winston laboratories
Bradykinin B ₂ receptor antagonist	Icatibant	Preclinical study stopped	Aventis
Unknown	SFPP	Phase I	Mitsubishi Pharmaceuticals
	MK-0686	Phase I	Merck
	Bicifadine	Phase I	XLt Biopharmaceuticals

^aCyclooxygenase-Inhibiting Nitric Oxide Donators.

^bTransient receptor potential vanilloid subfamily 1 receptor agonist.

gastrointestinal and cardiac adverse events are in clinical study. On the other hand, a new class of compounds has been developed, the Disease-Modifying OsteoArthritis Drugs (DMOADs), which may slow down the degenerative process of OA. Finally, the use of growth factors that could have chondroprotective effects is also being contemplated.

Analgesic and anti-inflammatory drugs

Numerous pharmaceutical companies are testing new drugs, especially COX/LOX inhibitors (Cyclooxygenase/Lipoxygenase) and CINODs (Cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donors) [47,48]. The results of a phase III study with the naproxinod (Nicox), the first CINOD, showed an effective anti-inflammatory activity with no detrimental effects on blood pressure and good gastrointestinal tolerability and safety. Table 1 indicates the different drugs currently in development with an update on their clinical status.

Disease-Modifying OsteoArthritis Drugs (DMOADs)

These drugs aim at slowing down the inevitable OA-associated cartilage degeneration by affecting various targets such as catabolic enzymes or cytokine-activated signalling cascades [48,49]. Table 2 illustrates the different drugs currently in development. Studies have been conducted to identify small molecular weight compounds that selectively inhibit the catabolic activity of enzymes from the MMP family. Several investigators have, however, reported some adverse events related to the musculoskeletal system (prinomastat, marimastat, BMS-27591 and PG-116800) with MMP inhibitors during the course of clinical trials in oncology and cardiology [50]. Many anti-cytokines are also under development. The anakinra (KINERET[®], Amgen), an IL-1 receptor antagonist, is indicated for the treatment of rheumatoid arthritis. In OA, this anti-cytokine showed no significant effect on gonarthrosis symptoms [51]. This antagonist also has some drawbacks, primarily its high cost and the necessity of intra-articular injection. The interest of this type of anti-cytokine for the OA therapeutic arsenal is, thus, still difficult to delineate. In parallel, some studies are also being performed to decipher whether humanised monoclonal antibodies (adalimumab HUMIRA[®], Abbott and infliximab REMICADE[®], Schering Plough) that blunt the biologi-

cal activity of TNF- α may be of therapeutic interest in OA. These monoclonal antibodies are well known to block the inflammatory processes in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis and Crohn's disease. In OA, only one study was performed and unfortunately efficacy was not demonstrated [52]. Finally, great attention has also been paid to synthetic inhibitors of various signalling pathways implicated in the physiopathology of OA, such as MAP kinases [48,49]. With respect to the alteration of the subchondral bone in OA [53], bone anti-resorptive agents bisphosphonates calcitonin or licofelone have ultimately been proposed, but with disappointing results [54–56]. In addition, the pivotal role of RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) and osteoprotegerin in bone resorption could also be potential targets and future clinical trials will hopefully be able to provide answers to the efficiency of these treatments [57]. A potential association of anti-resorptive compounds with specific chondroprotective drugs could be of interest in OA and deserves further consideration.

Growth factors

The administration of growth factors, such as basic-Fibroblast Growth Factor (FGF), BMPs (particularly BMP-2 and -7) and TGF- β , is also being considered as a potential therapeutic strategy. The *in vitro* effects of growth factors on chondrocyte function could make them useful for the prevention of cartilage degradation [58]. Among them, FGF-18 stimulates the repair of damaged cartilage in progressive OA in rats [59]. Nevertheless, the direct and repetitive injection of growth factors into the joints does not appear feasible for the management of chronic diseases such as OA. Much attention is therefore being paid to the development of drug delivery systems enabling the sustained delivery of growth factors.

Surgical treatments for osteoarthritis

Surgical treatments are generally considered the ultimate procedure when drug therapy has failed to relieve pain and/or to restore an adapted joint function. All these techniques are mainly dedicated to highly degenerative and advanced OA. Three procedures are currently used: osteotomy, arthrodesis and arthroplasty.

TABLE 2

Update in Disease-Modifying OsteoArthritis Drugs (DMOADs)

Targets	Drugs	Clinical status in OA	Company
MMPs	CPA-926	Preclinical study	Kureha
	PD-0200347		Pfizer
	VX-765	Preclinical study stopped	Vertex
	ONO-4817		Pfizer
	CP-544439	Preclinical study	Pfizer
	S-3536	Preclinical study stopped	Shionogi
	PG-530742	Unknown	Procter and Gamble
	BAY12-9566	Preclinical study stopped	Bayer
	RO32-3555 (cipemastat)		Roche
	RS-130-830		Roche
ADAMTS-5	Doxycycline	Studies stopped	–
	Minocycline		–
	ST109	Unknown	BMS ^g
Cathepsin K	ST154		BMS ^g
	SB-357114		GSK ^h
ICE ^a	SB-462795		GSK ^h
p38 MAP-kinase ^b	Pralnacasan	Preclinical study	Sanofi-Aventis
NF-κB ^c	SB 242235	Preclinical study	GSK ^h
iNOS ^d	NF-κB decoy oligonucleotide		AnGes MG
iNOS activity	<i>N</i> -iminoethyl-L-lysine		–
Caspase	PD-0200347		Pfizer
MEK-1/2 ^e	Isatin sulfonamide		GSK ^h
PPAR γ ^f (agonist)	PD 198306		Pfizer
Bone resorption	Pioglitazone		Takeda
	Bisphosphonates (risedronate)	Phase III in progress	Procter and Gamble
	Calcitonin	Phase III beginning in 2008	Novartis
Anabolism	Ranelate strontium	?	–
	FGF-18	Preclinical study	–

^a IL-1 converting enzyme (=caspase-1).^b Mitogen Activated Protein.^c Nuclear Factor-KappaB.^d Inducible Nitric Oxide Synthase.^e MAP Erk Kinase.^f Peroxisome proliferator activated receptor gamma.^g Bristol Myers Squibb.^h Glaxo Smith Kline.**Osteotomy**

Osteotomy is indicated in OA patients with joint misalignment, such as a valgus or varus knee. It is a surgical procedure that involves the removal of bone. A wedge of bone located near the damaged joint is removed to cause a realignment of the varus/valgus deformity. This realignment reduces mechanical stress on the affected compartment by redistributing load to healthy cartilage. The clinical outcome depends on the angulation of joint axis correction [60]. This procedure remains, however, associated with adverse events like haemorrhage, inflammatory reactions and nerve damage.

Arthroplasty

Total joint replacement or arthroplasty is reserved for the most severe and recalcitrant forms of OA or when other treatments have failed. Several human joints are routinely replaced, such as the hip and knee. Technology has advanced such that other joints can be replaced, including the shoulder and wrist. Total and partial knee replacements, which are now considered relatively routine sur-

gery, have a 95% success rate at 20 years and are associated with an effective improvement in health-related quality of life [61]. There are more than 300,000 total knee replacements in the United States each year and a projection model predicted a 673% increase in primary knee arthroplasty to a total of 3.48 million procedures in 2030 [62]. Among all these surgeries, approximately 80% are unilateral, meaning only one knee is replaced, and 20% are bilateral. Recent advances in surgical technology have enabled total knee replacements to be performed as a minimally invasive surgical procedure, conducted under local anaesthesia that requires only a small incision in the centre of the knee. Physical therapy generally begins two days following surgery. Patients generally rely on walking aids for the first few weeks and are back to normal health in a few months. Nevertheless, the overall complication rate of 5.5% includes infection that continues to dominate the literature concerning complications after total knee replacement. Deep vein thrombosis and poor wound healing have also been described. Moreover, the revision rate after five or more years is 2% [63].

Arthrodesis

Arthrodesis, also known as artificial ankylosis or syndesis, is the artificial induction of joint ossification between two bones. Arthrodesis, however, is limited to a certain number of joints within the body. Most arthrodesis surgery is performed in either the wrist or hands, or the foot or ankle. Historically, knee and hip arthrodesis was also performed as a pain-relieving procedure. Given the great success achieved in hip and knee arthroplasty, however, arthrodesis of these large joints has fallen out of favour as a primary procedure and is now only used as a last resort in some cases of failed arthroplasties.

Regenerative therapies for articular cartilage defects

As previously described, cartilaginous defects constitute one of the major extrinsic risk factors for OA. The incidence of cartilaginous defects is estimated at 63% in the United States population of 31,516 arthroscopies [64]. Over the past 20 years, a great deal of attention has, therefore, been paid to therapeutic procedures for the early treatment of cartilaginous defects. Early treatments of cartilaginous defects could indeed be crucial to slowing down the chronic development of OA. Current procedures include washing, shaving and debridement, stem cell stimulation-based procedures (Pridie drilling and microfracture) and chondrogenic explant grafts (allo and autografts) [65]. The major challenges in regenerative medicine for cartilage are the restoration of a biomechanically competent ECM and the integration of this newly synthesised matrix within the resident tissue. To address this specific issue, Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) was developed and has paved the way for cell therapy and biomaterial-assisted cartilage engineering.

Washing, shaving and debridement

Endoarticular washing consists of irrigating the joint with a physiological salt solution. Although washing has shown beneficial effects on pain, it remains an experimental approach. Elimination of inflammatory waste by this technique could explain the analgesic effect [66]. Thus, some studies have shown a positive effect for up to one year [67], whilst others observed no decrease in pain [68]. Arthroscopic shaving consists in decreasing friction by removing fibrillated cartilage with rapid shaving [69]. Today this method is fairly controversial and is therefore used less and less. Debridement combines washing, meniscectomy, ablation of foreign bodies and osteophyctectomy. The long-term follow-up of patients undergoing such treatment has indicated that debridement leads to an aggravation of OA [70].

Stem cell stimulation-based procedures

These procedures aim at improving the poor spontaneous repair of cartilaginous lesions by taking advantage of the presence of reparative stem cells in the subchondral bone marrow [71]. Two techniques have been developed: Pridie drilling and microfracture.

Pridie drilling consists in perforating AC [72]. During this procedure the cartilage and bone sustain a trauma with ensuing therapeutic bleeding from the subchondral bone space. The benefit of this procedure is related to the fact that the blood clot triggers the spontaneous formation of a cartilage-like fibrous tissue. This procedure is disadvantageous in that it is largely invasive and has a longer recovery period and a higher probability

of complications. Moreover, this technique leads to the formation of a fibro-cartilaginous matrix that remains transitory and does not possess the biomechanical properties of the native cartilage. Whilst effective at preventing further bone damage, the newly formed fibro-cartilaginous tissue is very poor at handling compressive force and has a very limited load bearing capacity. As a consequence, Pridie drilling is associated with excruciating amounts of pain largely because of the loss of smooth articulation and probably leading to bony crepitus. Microfracture is derived from Pridie drilling and consists in creating multiple small perforations in the cartilage defects (4 mm in depth). The size-reduced perforations can be performed via a mini-invasive procedure [60] and have less of an impact on joint function [73]. Microfracture is mainly indicated for the treatment of young patients and athletes where it has been shown to be efficient [73]. Nevertheless, the newly formed fibro-cartilaginous tissue is, as described above, poorly competent from a mechanical point of view. Long-term results of Pridie drilling and microfracture procedures need further careful consideration.

Allo and autografts

The principle of cartilage grafting procedures is to fill cartilage defects with healthy cartilage generally derived from human cadavers (allografts) or from the patients themselves (autografts).

Allografts

Although allografts have been used for several decades to treat AC defects, grafts derived from human cadavers induce immunological reactions [74]. In addition, it has also been reported that allografts lead to an increased risk of viral and NCTA (NonConventional Transmissible Agents) transmission.

Autografts

The first generation of osteochondral autografts consisted of harvesting a single and large patch of healthy osteochondral tissue (single graft) [75]. Unfortunately this procedure has several major drawbacks, such as a prominent morbidity of the donor site and an unsuitable geometry of the collection specimen [76]. As a consequence, a second generation of osteochondral autografts (multiple grafts or mosaicplasty) has been developed and is still largely used today. This second generation of multiple osteochondral autografts was first developed by Hangody *et al.* [77]. Mosaicplasty is a one-step procedure that consists of collecting several small cylindrical grafts in a low-weight bearing area of the joint and transferring the explants to the defect. Currently, mosaicplasty is restricted to subjects under the age of 50 years who exhibit small lesions located at the femoral condyles (lower than 4 cm² requiring fewer than 6 grafts), without mirror lesions and misalignment of the knee. Despite the promising clinical results obtained [78], this technique presents some major disadvantages, such as the difficulty to treat large lesions (>4 cm²) and the instability of the graft. In addition, there is some uncertainty concerning the long-term outcome of the graft because of the discrepancy in the mechanical properties between the donor and the recipient sites [60].

Despite their numerous disadvantages, microfracture and mosaicplasty are largely considered the method of choice for the treatment of cartilage defects and, therefore, occupy a strategic place in orthopaedic surgical therapy.

Cell-based surgical therapy: Autologous Chondrocyte Implantation

Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) is based on the grafting of isolated cells with chondrogenic properties within the cartilage defect. Brittberg *et al.* were the first to publish clinical results in humans with this technique [79]. The technique consists of three steps: cartilage collection, isolation and *in vitro* expansion of chondrocytes in monolayer culture, and implantation of the cultured chondrocytes in the lesion under a periosteal flap. Today, this technique is largely used in the United States where the FDA (Food and Drug Administration) delivered in 1997 the first agreement for CARTICEL[®] (Genzyme Corporation, Cambridge, MA), a commercial process for the production of autologous chondrocytes for transplantation. Today, in addition to CARTICEL[®], several new products are being developed and tested, such as ChondroCelect[®] (Tigenix, Leuven, Belgium) or Hyalograft-C[®] (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy). CARTICEL[®] is indicated for the repair of symptomatic cartilage defects in femoral condyles (medial, lateral or trochlea), caused by acute or repetitive traumas, in patients who have had an inadequate response to a prior repair procedure (e.g. debridement, microfracture and mosaicplasty). In 2005, the French National Authority for Health (HAS) evaluated the ACI technique [80]. Clinical studies

have shown an encouraging improvement in clinical signs of OA. ACI-derived techniques, like the MACI technique (Matrix guided Autologous Chondrocytes Implantation), have subsequently undergone further developments. In the MACI, the periosteal flap is replaced by a membrane composed of a mixture of type II and I collagens stabilised on the defect by fibrin glue [81]. These cell-based surgical therapies for cartilage defects have led to encouraging results but also remain disappointing, particularly because the recovery of articular chondrocytes leads to damage at the donor collection site [60]. In addition, chondrocytes lose expression of the main chondrocytic markers during their *in vitro* expansion in monolayer culture, and this process of dedifferentiation leads to the formation of a fibrocartilage, biomechanically inferior to the original hyaline cartilage [82]. Another limitation is related to the use of a periosteal flap or a membrane to retain transplanted cells within the defects, which is not totally impervious and sometimes leads to hypertrophy [83] or uncontrolled calcification [60]. To overcome these limits, much attention has been paid to the development of three-dimensional scaffolds for the transfer and maintenance of cells in the recipient site. In addition, the increase in minimally invasive surgery has pushed researchers towards the development of injectable cartilage tissue engineering systems [84,85].

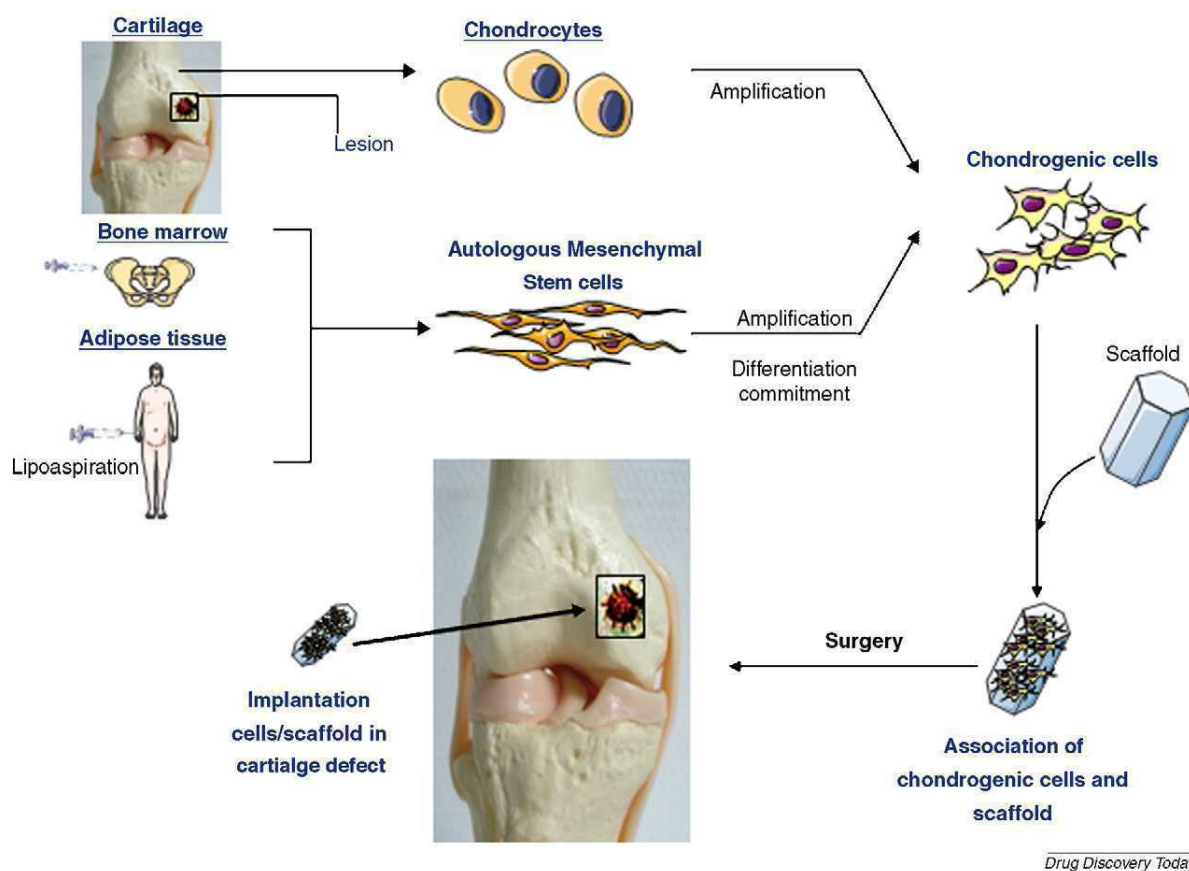


FIGURE 4

Strategy for cartilage tissue engineering. Autologous reparative cells are isolated from cartilage or derived from bone marrow or adipose tissue. Cells are then amplified and committed towards the chondrogenic lineage by exposure to various morphogenetic factors and finally seeded onto a scaffold. Hybrid constructs can finally be implanted into the defect.

Cartilage tissue engineering

Tissue engineering associates the principles and methods of engineering and life sciences with the development of biological substitutes that restore, maintain or improve tissue function [86]. Tissue engineering involves seeding a biocompatible scaffold with appropriate cells. The biomaterial scaffold can be loaded with signalling molecules (morphogens) that promote cell differentiation and maturation into the desired tissue. Two tissue engineering approaches have been developed. One consists of generating functional tissue *in vitro* then implanting the construct into the joint. In the other approach, the construct is cultured briefly, implanted when still immature and allowed to mature *in vivo* within its intended environment [87]. With respect to its biological features and its poor capability for endogenous repair, much attention has been paid to the development of tissue engineering applied to the repair of cartilage [88]. The theoretical scheme of cartilage tissue engineering is illustrated in Fig. 4 and involved a scaffold, cells and morphogens.

Scaffolds

Many scaffolds have been investigated for cartilage tissue engineering. They can be classified according to their nature (protein, polysaccharide, synthetic or natural), their shape (massive, porous massive, foams, viscous liquids and hydrogels) or their chemical formulation. The ideal scaffolds must exhibit the following essential properties. They should be biocompatible to prevent inflammatory and immunological responses, constitute a three-dimensional environment favourable to the maintenance of a differentiated chondrocyte phenotype. They should also be permeable to allow for the diffusion of molecules and nutrients. They should be adhesive to allow for the fixation of cells in the lesion, and bioactive to enable homogeneous and controlled release of growth factors. Finally, they should be injectable to enable mini-invasive surgery, and biodegradable to enable long-term integration into host tissues. The principal scaffolds used in cartilage tissue engineering are cited in Table 3. Because of their structure and properties, hydrogels are probably the most promising candidates, given the assumption that cartilage tissue engineering may become successful not only *in vitro* or *ex vivo* [85] but also in clinical situations. Hydrogels are composed of chains of synthetic or natural absorbent macromolecules. Cross-linking agents (glutaraldehyde, irradiation, pH or temperature) lead to chemical modifications resulting in the formation of a reticulated hydrogel [89]. The macromolecular network contains a high proportion of water which reproduces the characteristics of the three-dimensional environment of the cartilaginous ECM [90]. The porosity of hydrogels can be adjusted by the modification of the network density [84]. The fact that they can be injected is another advantage of hydrogels, enabling minimally invasive surgery [91], thereby reducing morbidity and the hospitalisation period. These injectable scaffolds must also be able to increase in volume, to acquire the desired shape once implanted. Preclinical studies to evaluate the mechanical properties of hydrogels are underway [85].

Cells

Several sources of cells have been considered for cartilage tissue engineering, including chondrocytes of various origins (articular,

TABLE 3

Scaffolds developed in cartilage tissue engineering

Scaffolds	Hydrogel available
Proteic scaffolds	
Collagen	Yes
Gelatin	No
Fibrin	Yes
Laminin (MATRIGEL [®])	No
Polysaccharidic scaffolds	
Agarose	Yes
Alginate	Yes
Cellulose	Yes
Chitosan	Yes
Hyaluronic acid	Yes
Artificial scaffolds	
Carbon fibre	No
Calcium phosphate	No
Dacron ^{®a}	No
Polybutyric acid	No
Polyesterurethane	No
Polyethylmethacrylate	Yes
Polyglycolic acid (PGLA)	Yes
Polylactic acid (PLA)	Yes
Teflon ^{®b}	No

^aTerephthalate polyethylene.

^bPolytetrafluoroethylene.

nasal and costal) [92] and MSCs isolated from bone marrow, periosteum, perichondrium or adipose tissue [93].

A recent study [94] compared different chondrocyte origins and suggested that nasal chondrocytes could be the most appropriate cell source for cartilage tissue engineering. Whether these data obtained in a rabbit preclinical study can be extrapolated to human remains to be demonstrated. The key limitations to the use of chondrocytes, besides their origin, are their phenotypic instability observed during the course of their expansion in monolayer culture. This phenotypic instability, called 'dedifferentiation' is characterised by a decreased expression of type II collagen, increased expression of type I collagen and a shift of cellular morphology from a rounded shape to the typical fusiform shape of fibroblasts [82]. This process of dedifferentiation may, however, be reversible when dedifferentiated chondrocytes are cultured in a three-dimensional environment [95]. Considering their chondrogenic potential, MSC could constitute an alternative source of reparative cells for cartilage tissue engineering [87,96]. The term 'mesenchymal stem cell' originally refers to adult stem cells from bone marrow (BMMSC). These BMMSC are characterised by an extensive capacity to proliferate whilst retaining their multipotentiality and ability to generate different connective tissue lineages (osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, cardiomyocytes and so on) [97]. More recently, it has been demonstrated that MSC can also be reproducibly isolated from human adipose tissue (ATSC). Whereas the chondrogenic potential of ATSC is probably not as effective as BMMSC [98], these cells have the ability to differentiate along the chondrocyte lineage [99]. These ATSC have the advantages that they can be harvested with a low morbidity of

the donor site. Moreover, once digested and adipocytes removed, adipose tissue contains a high proportion of MSC (1–5%) compared to bone marrow (0.01–1%) [100]. MSC are easily amplified in monolayer culture and can undergo a differentiation process towards the chondrogenic lineage under appropriate conditions. The optimal conditions to differentiate MSC towards chondrocytes still have to be clearly established. Many pivotal parameters have been demonstrated to influence this process, such as growth factors, tri-dimensional culture and oxygen tension. MSC also have therapeutic potential as a result of their immunosuppressive properties. It has been demonstrated that BMMSC and ATSC are well tolerated and decrease the host response to the graft in the context of allogenic transplantations [101].

Culture conditions and morphogens

Culture conditions and morphogens (growth factors, oxygen tension and mechanical constraints) are essential parameters to take into account in the development of tissue engineering.

As previously described, three-dimensional culture enables preservation of the differentiated phenotype of chondrocytes [102]. Moreover, dedifferentiated chondrocytes recover their phenotype when they are placed in three-dimensional culture [95]. The molecular mechanisms governing the processes of dedifferentiation and re-differentiation are only partially understood, but a key role for integrins has been proposed [103]. Bioreactors constitute mechanically active and controllable culture systems. The ideal bioreactor must provide the tissue with mechanical stimulation similar to the *in vivo* conditions and increase ECM synthesis, nutrition and oxygenation of the tissue [104]. Physiological load exerted in the joint is essential to the development and the regeneration of normal AC [105]. Mechanical stimuli impact the behaviour of chondrocytes *in vivo* and *in vitro* [106]. Nevertheless, the consensus from *in vitro* mechanical loading experiments is that static compression stimulates depletion of PG and damage to the collagen network and decreases the synthesis of cartilage matrix proteins, whereas dynamic compression increases matrix synthetic activity [107]. The choice of the ideal parameters of stimulation is still under evaluation. Among the morphogens, growth factors are largely used to maintain chondrocytic phenotype or to differentiate MSC towards a chondrocytic phenotype. Many growth factors are involved in chondrocyte maturation and formation of cartilage [108]. These factors include the TGF- β family (Transforming Growth Factors), BMPs (Bone Morphogenetic Protein), CDMP (Cartilage Derived Morphogenetic Protein), FGFs (Fibroblast Growth Factors) and IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1). Another morphogen that has been considered as a potential tool for cartilage tissue engineering is hypoxia. Indeed, AC is a non-vascular tissue and chondrocytes are, therefore, immersed in a hypoxic environment (between 1 and 5% O₂) [109]. Hypoxia is involved in the differentiation of chondrocytes

[109] and MSC [110] through the HIF (Hypoxia Inducible Factor) pathway [111]. It has also been suggested that hypoxia could be a major factor for the prevention of chondrocyte terminal differentiation and cartilage mineralisation [109].

Gene therapy

Whereas the majority of research is directed towards the development of growth factor delivery systems, gene therapy that uses cells for the *in situ* production of therapeutic proteins is considered with interest [112]. In the context of cartilage tissue engineering, this type of therapy aims at stimulating the expression of genes involved in the processes of tissue regeneration. Genes coding for various members of the TGF superfamily (TGF- β , BMPs), IGF-1, Sox family (-5, -6, -9), FGF-3 and SMADs could be potential candidates [113,114]. However, the clinical use of gene therapy is still in its infancy and will require further *in vitro* and *in vivo* evaluation before becoming part of the therapeutic arsenal in osteoarticular diseases.

Conclusion

The increasing knowledge regarding the pathogenesis of OA, particularly the role of cytokines, growth factors and signalling molecules, has provided new perspectives for cartilage repair and treatment of OA. The huge number of aetiological factors means that a multidisciplinary approach is necessary for the successful management of this disease. Regenerative therapies for the articular surface alone may not necessarily lead to pain relief and improvement of joint function, because other tissues including bone, muscles, tendons, ligaments and the synovial membrane are also involved in the pathogenic processes. The expanding repertoire of potentially therapeutic options offers the possibility to combine pharmacological treatments and tissue engineering towards regenerative medicine and thus to improve OA treatment and optimise cartilage repair. An inevitable pre-requisite for choosing the proper strategy and achieving the highest therapeutic benefit is, however, the ability to define the stage and pathogenetic background of the disease, which requires very sensitive diagnostic methods. Prevention of OA will be a key issue in the quest to decrease OA incidence in our ageing societies. The main challenge in tissue engineering is to find a compromise between the benefits to the patients, regulatory agencies, costs, coverage by health insurance and the role of pharmaceutical companies.

Acknowledgements

This study was supported by grants from 'Société Française de Rhumatologie', 'Fondation Arthritisme Courtin', 'Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée', 'Agence Nationale de la Recherche' (ANR "SCARTIFOLD", ANR "CHONDROGRAFT"), 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' and University Hospital of Nantes. The authors also thank Servier Medical Art for illustration.

References

- 1 Cats-Baril, W.L. and Frymoyer, J.W. (1991) Demographic factors associated with the prevalence of disability in the general population. Analysis of the NHANES I database. *Spine* 16, 671–674
- 2 Felson, D.T. (2004) Obesity and vocational and avocational overload of the joint as risk factors for osteoarthritis. *J. Rheumatol. Suppl.* 70, 2–5
- 3 Aigner, T. *et al.* (2006) Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 128–149
- 4 Roach, H.I. *et al.* (2007) Pathobiology of osteoarthritis: pathomechanisms and potential therapeutic targets. *Curr. Drug Targets* 8, 271–282

- 5 Chang, J. and Poole, C.A. (1996) Sequestration of type VI collagen in the pericellular microenvironment of adult chondrocytes cultured in agarose. *Osteoarthritis Cartilage* 4, 275–285
- 6 Aigner, T. and Stove, J. (2003) Collagens – major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1569–1593
- 7 Dieppe, P. and Kirwan, J. (1994) The localization of osteoarthritis. *Br. J. Rheumatol.* 33, 201–203
- 8 Aigner, T. *et al.* (1999) Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 42, 1443–1450
- 9 Wollheim, F.A. (2003) Early stages of osteoarthritis: the search for sensitive predictors. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 1031–1032
- 10 Lippielo, L. *et al.* (1977) Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage. *J. Clin. Invest.* 59, 593–600
- 11 Kim, H.A. and Blanco, F.J. (2007) Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr. Drug Targets* 8, 333–345
- 12 Abramson, S.B. (2008) Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10 (Suppl. 2), S2
- 13 Loeser, R.F., Jr (2004) Aging cartilage and osteoarthritis – what's the link? *Sci. Aging Knowledge Environ.* 2004, pe31
- 14 Goldring, M.B. and Goldring, S.R. (2007) Osteoarthritis. *J. Cell Physiol.* 213, 626–634
- 15 Burrage, P.S. and Brinckerhoff, C.E. (2007) Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors. *Curr. Drug Targets* 8, 293–303
- 16 Berenbaum, F. and Sellam, J. (2008) Obesity and osteoarthritis: what are the links? *Joint Bone Spine* 75, 667–668
- 17 Toussiot, E. *et al.* (2007) The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1095–1100
- 18 Lane, N.E. *et al.* (2006) Frizzled-related protein variants are risk factors for hip osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 1246–1254
- 19 Wu, Q. *et al.* (2008) Overexpression of Smurf2 stimulates endochondral ossification through upregulation of beta-catenin. *J. Bone Miner. Res.* 23, 552–563
- 20 Krasnokutsky, S. *et al.* (2008) Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16 (Suppl. 3), S1–S3
- 21 Benito, M.J. *et al.* (2005) Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1263–1267
- 22 Goldring, S.R. and Goldring, M.B. (2004) The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 427 (Suppl.), S27–36
- 23 Lajeunesse, D. (2004) The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (Suppl. A), S34–S38
- 24 Martel-Pelletier, J. *et al.* (2006) New thoughts on the pathophysiology of osteoarthritis: one more step toward new therapeutic targets. *Curr. Rheumatol. Rep.* 8, 30–36
- 25 Martel-Pelletier, J. and Pelletier, J.P. (2005) New insights into the major pathophysiological processes responsible for the development of osteoarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 34 (6 Suppl. 2), 6–8
- 26 Gerwin, N. *et al.* (2006) Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 226–242
- 27 van der Kraan, P.M. and van den Berg, W.B. (2008) Osteoarthritis in the context of ageing and evolution. Loss of chondrocyte differentiation block during ageing. *Ageing Res. Rev.* 7, 106–113
- 28 Ikegawa, S. (2008) Genomic approaches to bone and joint diseases. Current status of genetic study of osteoarthritis. *Clin. Calcium* 18, 162–167
- 29 Gegout, P.P. *et al.* (2008) Adipokines in osteoarthritis: friends or foes of cartilage homeostasis? *Joint Bone Spine* 75, 669–671
- 30 ACR. (2000) Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. *Arthritis Rheum.* 43, 1905–1915
- 31 Zhang, W. *et al.* (2007) EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann. Rheum. Dis.* 66, 377–388
- 32 Zhang, W. *et al.* (2008) OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 137–162
- 33 Zhang, W. *et al.* (2004) Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 901–907
- 34 Towheed, T. *et al.* (2000) Analgesia and non-aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis of the hip. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD000517
- 35 Glass, G.G. (2006) Osteoarthritis. *Dis. Mon.* 52, 343–362
- 36 Ayril, X. (2001) Injections in the treatment of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 15, 609–626
- 37 Derfoul, A. *et al.* (2007) Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 646–655
- 38 Pavelka, K. *et al.* (2002) Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch. Intern. Med.* 162, 2113–2123
- 39 Tiraloch, G. *et al.* (2005) Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 1118–1128
- 40 McAlindon, T.E. *et al.* (2000) Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *JAMA* 283, 1469–1475
- 41 Clegg, D.O. *et al.* (2006) Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N. Engl. J. Med.* 354, 795–808
- 42 Najm, W.I. *et al.* (2004) S-adenosyl methionine (SAMe) versus celecoxib for the treatment of osteoarthritis symptoms: a double-blind cross-over trial. *BMC Musculoskelet. Disord.* 5, 6
- 43 Soeken, K.L. *et al.* (2002) Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAMe) for osteoarthritis. *J. Fam. Pract.* 51, 425–430
- 44 Marshall, K.W. (1998) Viscosupplementation for osteoarthritis: current status, unresolved issues, and future directions. *J. Rheumatol.* 25, 2056–2058
- 45 Wang, C.T. *et al.* (2004) Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A, 538–545
- 46 Simon, T.M. and Jackson, D.W. (2006) Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med. Arthrosc.* 14, 146–154
- 47 Steinmeyer, J. and Kontinen, Y.T. (2006) Oral treatment options for degenerative joint disease – presence and future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 168–211
- 48 Qvist, P. *et al.* (2008) The disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD): Is it in the horizon? *Pharmacol. Res.* 58, 1–7
- 49 Pelletier, J.P. and Martel-Pelletier, J. (2007) DMOAD developments: present and future. *Bull NYU Hosp. Jt. Dis.* 65, 242–248
- 50 Bisset, D. *et al.* (2005) Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 842–849
- 51 Chevalier, X. *et al.* (2005) Safety study of intraarticular injection of interleukin 1 receptor antagonist in patients with painful knee osteoarthritis: a multicenter study. *J. Rheumatol.* 32, 1317–1323
- 52 Magnano, M.D. *et al.* (2007) A pilot study of tumor necrosis factor inhibition in erosive/inflammatory osteoarthritis of the hands. *J. Rheumatol.* 34, 1323–1327
- 53 Karsdal, M.A. *et al.* (2008) Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 16, 638–646
- 54 Garnero, P. *et al.* (2008) Relationships between biochemical markers of bone and cartilage degradation with radiological progression in patients with knee osteoarthritis receiving risedronate: the Knee Osteoarthritis Structural Arthritis randomized clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 660–666
- 55 El Hajjaji, H. *et al.* (2004) Treatment with calcitonin prevents the net loss of collagen, hyaluronan and proteoglycan aggregates from cartilage in the early stages of canine experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 904–911
- 56 Pelletier, J.P. *et al.* (2004) The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licoferone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone* 34, 527–538
- 57 Tat, S.K. *et al.* (2009) New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio J. Med.* 58, 29–40
- 58 Hayashi, M. *et al.* (2008) Weekly intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 inhibits osteoarthritis progression. *Arthritis Res. Ther.* 10, R118
- 59 Moore, E.E. *et al.* (2005) Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 623–631
- 60 Hunziker, E.B. (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432–463
- 61 Ethgen, O. *et al.* (2004) Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty. A qualitative and systematic review of the literature. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A, 963–974
- 62 Deirmengian, C.A. and Lonner, J.H. (2008) What's new in adult reconstructive knee surgery. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90, 2556–2565
- 63 Gidwani, S. and Fairbank, A. (2004) The orthopaedic approach to managing osteoarthritis of the knee. *Br. Med. J.* 329, 1220–1224
- 64 Curl, W.W. *et al.* (1997) Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 13, 456–460
- 65 Fritz, J. *et al.* (2008) Articular cartilage defects in the knee – basics, therapies and results. *Injury* 39 (Suppl. 1), S50–S57
- 66 Hunziker, E.B. and Kapfinger, E. (1998) Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J. Bone Joint Surg. Br.* 80, 144–150

- 67 Livesley, P.J. *et al.* (1991) Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. *J. Bone Joint Surg. Br.* 73, 922–926
- 68 Gibson, J.N. *et al.* (1992) Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* 74, 534–537
- 69 Ogilvie-Harris, D.J. and Jackson, R.W. (1984) The arthroscopic treatment of chondromalacia patellae. *J. Bone Joint Surg. Br.* 66, 660–665
- 70 Rangger, C. *et al.* (1995) Osteoarthritis after arthroscopic partial meniscectomy. *Am. J. Sports Med.* 23, 240–244
- 71 Buckwalter, J.A. and Brown, T.D. (2004) Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 423, 7–16
- 72 Steinwachs, M.R. *et al.* (2008) Marrow stimulation techniques. *Injury* 39 (Suppl. 1), S26–S31
- 73 Steadman, J.R. *et al.* (2002) Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J. Knee Surg.* 15, 170–176
- 74 Garrett, J.C. (1998) Osteochondral allografts for reconstruction of articular defects of the knee. *Instr. Course Lect.* 47, 517–522
- 75 Lane, J.M. *et al.* (1977) Joint resurfacing in the rabbit using an autologous osteochondral graft. *J. Bone Joint Surg. Am.* 59, 218–222
- 76 Outerbridge, H.K. *et al.* (1999) The use of lateral patellar autologous grafts for the repair of large osteochondral defects in the knee. *Acta Orthop. Belg.* 65 (Suppl. 1), 129–135
- 77 Hangody, L. *et al.* (1997) Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 5, 262–267
- 78 Hangody, L. *et al.* (2008) Autologous osteochondral grafting – technique and long-term results. *Injury* 39 (Suppl. 1), S32–S39
- 79 Brittberg, M. *et al.* (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889–895
- 80 Hittinger, M.C. (2005) Autologous chondrocyte implantation in the knee joint. *Report of the French National Authority for Health.* p. 54
- 81 Bachmann, G. *et al.* (2004) MRI in the follow-up of matrix-supported autologous chondrocyte transplantation (MACI) and microfracture. *Radiologie* 44, 773–782
- 82 Schnabel, M. *et al.* (2002) Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 62–70
- 83 Peterson, L. *et al.* (2000) Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 374, 212–234
- 84 Elisseff, J. (2004) Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4, 1849–1859
- 85 Nestic, D. *et al.* (2006) Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 300–322
- 86 Langer, R. and Vacanti, J.P. (1993) Tissue engineering. *Science* 260, 920–926
- 87 Merceron, C. *et al.* (2008) Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering. *Joint Bone Spine* 75, 672–674
- 88 Ateshian, G.A. (2007) Artificial cartilage: weaving in three dimensions. *Nat. Mater.* 6, 89–90
- 89 Drury, J.L. and Mooney, D.J. (2003) Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337–4351
- 90 Sontjens, S.H. *et al.* (2006) Biodendrimer-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue repair. *Biomacromolecules* 7, 310–316
- 91 Vinatier, C. *et al.* (2007) Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. A* 80, 66–74
- 92 Vinatier, C. *et al.* (2009) Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 89, 176–185
- 93 Vinatier, C. *et al.* (2006) Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels. *Biomed. Mater. Eng.* 16 (4 Suppl.), S107–S113
- 94 Isogai, N. *et al.* (2006) Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng.* 12, 691–703
- 95 Malda, J. *et al.* (2003) Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation. *Tissue Eng.* 9, 939–948
- 96 Magne, D. *et al.* (2005) Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol. Med.* 11, 519–526
- 97 Pittenger, M.F. *et al.* (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147
- 98 Liu, T.M. *et al.* (2007) Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 25, 750–760
- 99 Awad, H.A. *et al.* (2004) Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25, 3211–3222
- 100 Fraser, J.K. *et al.* (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24, 150–154
- 101 Puissant, B. *et al.* (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* 129, 118–129
- 102 Jin, C.Z. *et al.* (2007) Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng.* 13, 693–702
- 103 Poole, C.A. (1997) Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J. Anat.* 191 (Pt 1), 1–13
- 104 Bueno, E.M. *et al.* (2005) Wavy-walled bioreactor supports increased cell proliferation and matrix deposition in engineered cartilage constructs. *Tissue Eng.* 11, 1699–1709
- 105 Arokoski, J.P. *et al.* (2000) Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 10, 186–198
- 106 Mauck, R.L. *et al.* (2000) Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J. Biomech. Eng.* 122, 252–260
- 107 Guilak, F. *et al.* (2004) The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 423, 17–26
- 108 de Crombrughe, B. *et al.* (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 721–727
- 109 Hirao, M. *et al.* (2006) Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* 281, 31079–31092
- 110 Malladi, P. *et al.* (2006) Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C1139–C1146
- 111 Schipani, E. *et al.* (2001) Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 15, 2865–2876
- 112 Saraf, A. and Mikos, A.G. (2006) Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 592–603
- 113 Di Cesare, P.E. *et al.* (2006) Regional gene therapy for full-thickness articular cartilage lesions using naked DNA with a collagen matrix. *J. Orthop. Res.* 24, 1118–1127
- 114 Park, J. *et al.* (2006) Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *J. Gene Med.* 8, 112–125

6- Epidémiologie

La lombalgie est un des symptômes les plus communs de nos sociétés modernes. Sa prévalence est estimée entre 12 et 35% [2] et augmente avec le vieillissement, particulièrement après 50 ans (60%) [2, 13]. Il est estimé actuellement que 80% des disques lombaires après 70 ans présenteraient des anomalies [177]. Les études épidémiologiques montrent que les douleurs lombaires sont plus fréquentes chez les hommes. De même, des différences ethniques ont été évoquées avec un avantage pour les populations noires qui seraient moins sujets aux douleurs lombaires [178].

Les données épidémiologiques laissent entrevoir l'origine multifactorielle des douleurs lombaires et de la dégénérescence discale [113, 179]. Il est estimé que 40% des lombalgies trouvent leur origine dans le processus de dégénérescence discale [94, 180].

Parmi les facteurs de risque potentiels, l'impact du polymorphisme génétique sur l'apparition d'une dégénérescence discale ne fait plus aucun doute [177, 181]. Les études réalisées auprès de jumeaux montrent que ce facteur génétique est primordial et son impact pourrait être de 75% dans le cadre de la dégénérescence discale [182]. Le polymorphisme des gènes qui codent pour des protéines constitutives de la MEC présentent un impact majeur. C'est le cas de gènes codant pour l'agrécan [183], les collagènes de type I [184, 185], IX [186-189] et XI [190] dont l'atteinte a été corrélée avec une augmentation du risque de dégénérescence discale. D'autres constituants essentiels de la MEC ont également été étudiés et montrent cette même corrélation. Il s'agit de HtrA1 (sérine protéase inhibitrice de minéralisation) [191], de l'asporine [192, 193] et de CILP (cartilage intermediate layer protein) [194]. D'autres gènes, qui interviennent cette fois-ci dans la biologie du DIV, peuvent aussi présenter un polymorphisme génétique. C'est le cas de ceux codant pour MMP-2, -3 [195], IL-1 [196], IL-6 [197] et pour le récepteur à la vitamine D [157, 158]. Une étude a également démontré

l'existence d'une corrélation entre le niveau d'expression du gène de la thrombospondine (THSD2) et la dégénérescence discale [198]. Cette glycoprotéine permet la communication entre les cellules et la MEC. Ainsi, des troubles de la mécanotransduction au niveau moléculaire peuvent être envisagés comme responsable de la mise en place de processus de dégénérescence.

Les données épidémiologiques confirment également l'aspect multigénique de la dégénérescence discale. Il est en effet très peu probable qu'un seul gène présentant un polymorphisme soit capable d'induire un effet aussi large au niveau discal. Il est clair que la dégénérescence discale peut être considérée comme une maladie multigénique associée à d'autres facteurs de risque notamment non-génétiques. Quelques uns ont été suggérés par des études récentes : facteurs mécaniques (traumatismes), l'obésité, diminution de la nutrition, facteurs toxiques (nicotine), désordres métaboliques (diabète, alcaptonurie) et enfin les troubles psychologiques (stress, dépression). Il a été également suggéré que certaines infections de bas grade et des troubles inflammatoires neurogéniques puissent expliquer en partie la dégénérescence discale mais les résultats restent encore confus [113].

Les connaissances apportées dans le domaine du DIV et de sa physiopathologie sont indispensables pour permettre d'améliorer la prise en charge conventionnelle symptomatique des patients qui sera traité dans le chapitre suivant. Une prise en charge étiologique de la dégénérescence discale est une des voies prometteuses de traitements et sera développée dans un chapitre ultérieur.

III- Traitements conventionnels de la dégénérescence discale et des douleurs lombaires

1- Traitements hygiéno-diététiques, pharmacologiques et non-pharmacologiques

Des recommandations de l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) ont été émises en 2000 pour le diagnostic, la prise en charge et le suivi des malades atteints de lombalgie chronique [199]. Ces recommandations insistent sur l'importance d'une prise en charge holistique et multidisciplinaire.

Dans les stades précoces, le respect de règles hygiéno-diététiques simples est proposé. Le repos au lit n'est pas recommandé. Une diminution du surpoids est en revanche fortement recommandée. Les principes de l'école du dos, dont l'objectif principal est l'éducation des patients, trouvent leur place lorsqu'ils sont associés aux exercices physiques qui doivent être favorisés. La nature de ces exercices physiques reste néanmoins non-standardisée.

L'association de ces règles hygiéno-diététiques avec un traitement pharmacologique est également réalisée le plus souvent. Celui-ci se doit de respecter une démarche précise basée sur l'utilisation de molécules aux effets antalgiques croissants. Très peu d'études ont été réalisées spécifiquement pour cette indication de la lombalgie. Ainsi, cette stratégie est le plus souvent calquée sur celle utilisée pour traiter les patients souffrant d'arthrose [200, 201]. Dans un premier temps les antalgiques de palier I puis II sont proposés. Il s'agit essentiellement du paracétamol (acétaminophène), des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et des opiacés faibles (type tramadol). L'utilisation de myorelaxants (notamment le tétrazepam) peut également être proposée sur de courtes durées de traitement. Le palier III (morphiniques) est utilisé dans des cas exceptionnels. Ces différents traitements sont administrés par voie orale. L'utilisation de produits de phytothérapie ne trouve *a priori* pas sa justification scientifique actuellement au regard des résultats d'une seule étude randomisée menée *versus placebo*

[202]. Il faut également se méfier de ces produits qui font la plupart du temps l'objet d'auto-médication de la part des patients. Des interactions peuvent avoir lieu et risquent de potentialiser ou de diminuer l'effet de certains traitements médicaux pris quotidiennement par le patient.

L'utilisation d'infiltrations épidurales de corticoïdes est parfois utilisée mais en aucun cas en première intention. Ces infiltrations permettraient de soulager à court terme les patients lombalgiques chroniques en période de poussée douloureuse [203].

Aux règles hygiéno-diététiques et aux traitements pharmacologiques, il faut aussi ajouter l'engouement important depuis quelques années pour des thérapies dont l'intérêt est parfois difficile à définir en utilisant les principes de l'« Evidenced Based Medicine ». Il s'agit notamment des massages, de la balnéothérapie, de l'acupuncture ou encore de la stimulation électrique nerveuse transcutanée (TENS). Les manipulations vertébrales ont quant à elle montrées une certaine efficacité à court terme contrairement à la contention lombaire (corset) dont l'intérêt reste à démontrer et n'est pas un traitement de première intention.

Lorsque malheureusement les traitements conservateurs cités ci-dessus ne sont pas suffisants ou que la perte de fonction discale est majeure et associée à des douleurs récidivantes, une prise en charge chirurgicale peut être proposée.

2- Traitements chirurgicaux

Nous ne traiterons pas ici des techniques utilisées pour la prise en charge du syndrome de la queue de cheval et de la sciatique paralysante, qui présentent comme point commun la compression d'une racine nerveuse à l'origine de déficits neurologiques sévères. Il s'agit dans ces différents cas d'une urgence chirurgicale mettant en œuvre des techniques de décompression diverses.

Actuellement, la dégénérescence discale symptomatique, réfractaire aux traitements présentés précédemment, est prise en charge chirurgicalement soit par une arthrodeèse (« gold standard »), soit par une arthroplastie. Ces deux approches seront abordées successivement.

2-1 L'arthrodeèse lombaire

- Principe et évolution

L'arthrodeèse lombaire est une intervention chirurgicale qui a pour objectif d'immobiliser définitivement une ou plusieurs des articulations intervertébrales. Historiquement, elle était réalisée à l'aide d'un greffon osseux (os iliaque autologue le plus souvent) afin de fusionner deux vertèbres et de bloquer l'étage vertébral à l'origine des douleurs lombaires [204]. Il est pratiquement toujours nécessaire d'utiliser des implants métalliques afin d'immobiliser les vertèbres pendant que s'effectue la fusion osseuse.

Initialement aucune discectomie n'était pratiquée et ce n'est que plus tard que l'implantation de cage de fusion non-résorbable a été proposée. Ces cages de fusion ont subi ensuite des évolutions en particulier au niveau des matériaux qui les composent (Figure 14). Ainsi, les premières générations composées de titane ont été largement supplantées par les cages de fusion en fibres de carbone ou en polyether-etherketon (PEEK) [205]. Ces dernières sont actuellement disponibles avec des « designs » différents, plus anatomiques visant à diminuer les risques de migration anatomique observés avec les premières générations. L'apport clinique réel des « designs » proposés, où l'approche marketing ne correspond pas uniquement à une revendication, n'est toujours pas évalué. Ces cages de fusion ont néanmoins l'avantage par rapport à celles de première génération de présenter une meilleure biocompatibilité, de permettre la réalisation d'IRM et vraisemblablement de respecter les contraintes mécaniques au niveau des vertèbres adjacentes.



Figure 14 : Cages de fusion pour arthrodèse (Source iconographique : fabricants). Liste non-exhaustive.

Différentes techniques opératoires ont été développées (postérieure, circonférentielle) ainsi que différentes voies d'abord : la voie antérieure ou ALIF (Anterior Lumbar Interbody Fusion), la voie postérieure ou PLIF (Posterior Lumbar Interbody Fusion) et la voie transforaminale ou TLIF (Transforaminal Lumbar Interbody Fusion) (Figure 15).

- Résultats cliniques

Le recul clinique autour de l'arthrodèse est important. Les résultats montrent que celle-ci est efficace sur les douleurs uniquement dans 70 à 80% des cas [206]. Cependant, il est important de souligner qu'aucune étude n'a véritablement démontré une corrélation entre la fusion vertébrale et la diminution de la douleur. Un des écueils, non publié mais bien décrit par les praticiens, est la perte de mobilité de l'étage traité qui conduit à des modifications

biomécaniques de l'ensemble du rachis. Ces modifications biomécaniques peuvent contribuer à la dégénérescence des étages adjacents (supérieurs et inférieurs). Ce phénomène est appelé « effet domino ».

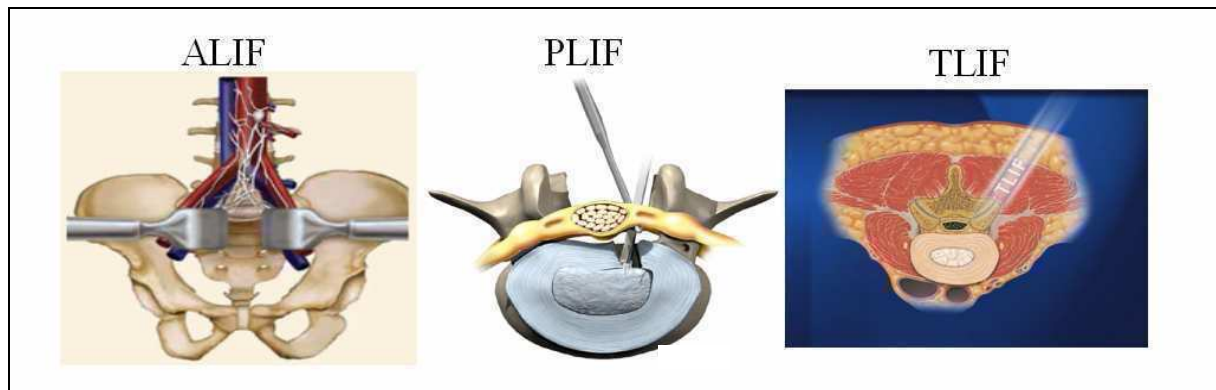


Figure 15 : Voies d'abord chirurgicales pour arthrodeuse. ALIF : Anterior Lumbar Interbody Fusion ; PLIF : Posterior Lumbar Interbody Fusion ; TLIF : Transforaminal Lumbar Interbody Fusion.

La morbidité non-négligeable du prélèvement de greffon osseux (en général au niveau de l'os iliaque) est également à prendre en compte. Dix à 50% des patients présentent en effet des douleurs persistantes au niveau du site donneur, des hématomes, une instabilité pelvienne voire des fractures de l'os pelvien [207, 208]. Cette morbidité est aujourd'hui relativement faible au regard de l'arrêt de cette technique au profit des composites synthétiques ou des matrices collagéniques « chargés » de facteurs de croissance recombinants (ostéoinducteurs comme la BMP2) [209, 210]. Les premiers résultats des études menées avec ces facteurs de croissance ont été très prometteurs mais doivent être tempérés par l'existence d'effets indésirables potentiels qui incitent à la prudence. L'observation d'ostéolyses [210, 211] voire de formations osseuses hétérotopiques [212] ainsi que certaines pseudarthroses et oedèmes des structures nerveuses adjacentes a été relatée [213].

Une technique d'arthrodèse « dernière génération » utilisant des cellules souches mésenchymateuses génétiquement modifiées pour produire des facteurs ostéoinducteurs *in*

situ est en cours de développement [214]. Parmi les facteurs ostéoinducteurs, la BMP-2 [215-218], BMP-6 [219] et la BMP-9 [220] bénéficient actuellement de recherches actives. Il faudra néanmoins attendre encore quelques années afin de garantir la sécurité d'emploi de ce type de procédé.

L'arthrodèse dans son ensemble reste une avancée majeure pour la prise en charge des patients. Néanmoins, à la lecture des données précédentes, il reste évident aujourd'hui que la connaissance des mécanismes favorisant la fusion des vertèbres doivent être approfondis afin d'optimiser cette technique. L'utilisation des nouveaux procédés devra faire l'objet d'investigations rigoureuses afin de garantir l'efficacité mais également la sécurité pour le patient.

Le poids socio-économique de l'arthrodèse doit également être pris en compte. Ceci d'autant plus que certains résultats montrent son absence de supériorité à long terme par rapport à une prise en charge conventionnelle par réhabilitation intensive [221]. Les données similaires présentées au congrès AOSpine de 2010 (non-publiées) vont dans ce sens et montrent une supériorité de la chirurgie à 2 ans mais qui décroît rapidement au fil des années. Après 7 ans, une prise en charge conventionnelle obtiendrait des résultats similaires.

2-2 L'arthroplastie

L'idée de remplacer un DIV dégénéré par un implant est apparue dès les années cinquante notamment en bénéficiant des recherches dans le domaine des prothèses totales de hanche et de genoux [222]. Le principal objectif recherché est le maintien de la mobilité articulaire, qui n'est pas préservée après arthrodèse [222, 223]. Ainsi durant une trentaine d'années, l'imagination des chercheurs contribua à développer des implants aux « designs » plus ou moins intéressants (pour une revue voir [224]), mais surtout contribua à définir les caractéristiques essentielles d'une prothèse discale idéale [225] : la surface de contact

implant-os doit être maximale afin de diminuer le risque d'affaissement de la prothèse et le module élastique du matériel devront être proche des caractéristiques de l'os.

Aujourd'hui, deux catégories de prothèses discales peuvent être distinguées : les prothèses totales permettant le remplacement de l'ensemble du DIV (AF et NP), et les prothèses partielles pour le remplacement du NP uniquement.

Etant donné l'objectif de notre travail, seules les prothèses lombaires seront abordées.

Les principes de l'arthrodèse et de l'arthroplastie s'opposent, l'une vise à immobiliser un étage rachidien tandis que l'autre a pour objectif de maintenir ou de préserver la mobilité discale et ses caractéristiques mécaniques. L'arthroplastie présente des atouts théoriques [226]. En particulier, l'arthroplastie permet de préserver les propriétés mécaniques natives de l'étage vertébral et par conséquent d'éviter la dégénérescence au niveau des segments vertébraux adjacents. De même, en évitant une certaine immobilisation post-opératoire, importante après l'arthrodèse, un retour rapide des fonctions courantes de la vie (travail, sport...) est espéré. Le dernier point est à relativiser étant donné les modifications actuelles des pratiques lors de la réhabilitation du patient suite à une arthrodèse.

a) Prothèses totales

Description

Parmi de nombreux concepts, cinq prothèses totales sont aujourd'hui utilisées en clinique humaine ou en cours d'évaluation avancée (Figure 16). L'ensemble de leurs caractéristiques est résumé dans le tableau VIII. Les « designs » envisagés sont assez proches et sont issues d'études biomécaniques préalables.

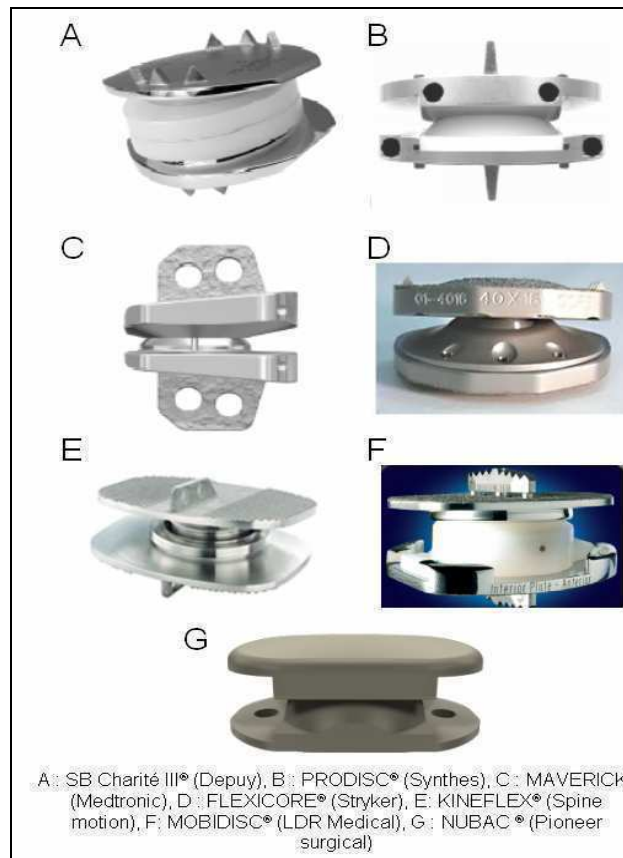


Figure 16 : Prothèses lombaires totales (Source iconographique : fabricants).

La nature de la surface de contact permet de distinguer deux groupes : un groupe métal-polymère (SB Charité III[®], PRODISC-L[®]) et métal-métal (MAVERICK[®], FLEXICORE[®], KINEFLEX[®]). La prothèse NUBAC[®] en développement est composée de PEEK. Des frottements au niveau de l'articulation à l'origine de la libération de débris de polyéthylène ont été observés avec les implants du groupe métal-polymère. Ces débris seraient à l'origine d'une croissance osseuse pouvant induire la fusion des corps vertébraux [226]. L'apparition de tels débris semblent néanmoins rare et n'apparaîtrait, selon des tests *in vitro*, qu'après une dizaine de millions de cycles [227].

Tableau VIII : Caractéristiques des prothèses lombaires totales.

Dénomination	Fabriquant	Matériau	Surface de contact	Nb d'articulations et contraintes	Centre de rotation	Mode de fixation	Première utilisation clinique	Remarques
SB Charité III [®]	Depuy, Johnson & Johnson	CoCrCo UHMWPE	Métal-polymère	2 (Sans contrainte)	Mobile	Coating titanium-phosphate de calcium, dents de fixation	1987	1 ^{ère} génération : métal-polymère, 2 ^{ème} G : métal-métal
PRODISC-L [®]	Spine Solutions / Synthes	CoCrCo UHMWPE	Métal-polymère	1 (Semi-contrainte)	Fixe	Quille de fixation	1990	1 ^{ère} G : titanium remplacé ensuite par le CoCrCo. PRODISC-C [®] (au niveau cervical)
MAVERICK [®]	Medtronic Sofamor Danek	CoCrCo	Métal-métal	1 (Semi-contrainte)	Fixe	Quille de fixation	2002	
FLEXICORE [®]	Spine Core / Stryker Spine	CoCrCo	Métal-métal	1 (Sous-contrainte)	Fixe	Coating titanium-phosphate de calcium, dents de fixation	2002	
KINEFLEX [®]	Spinal Motion	CoCrCo	Métal-métal	2 (Sans contrainte)	Mobile	Quille de fixation	2002	
MOBIDISC [®]	LDR Medical	CoCrCo UHMWPE	Métal-polymère	2 (Sans contrainte)	Mobile	Quille de fixation. Revêtement en titane poreux et hydroxyapatite.	2002	Laboratoire français.
NUBAC [®]	Pioneer Surgical	PEEK	Matière plastique	1 (Semi-contrainte)	Fixe	6	2006	Implantation très limitée (Asie, Europe). Etude de faisabilité lancée en juillet 2006 par la FDA

CoCrCo : Cobalt – Chrome – Cobalt ; UHMWPE : Polyéthylène de haut poids moléculaire ; PEEK : Polyether etherketone; FDA : Food and Drug Administration.

Rq : L'ACROFLEX[®] n'apparaît pas dans ce tableau car les recherches sur ce produit semblent stoppées pour des raisons de biocompatibilité insuffisante.

Un autre mode de classement basé sur le nombre d'articulations peut également être utilisé.

Les prothèses à une ou deux articulations peuvent être distinguées. Les analyses biomécaniques montrent un risque plus important d'usure avec les prothèses à deux articulations, d'autant plus que la prothèse présente une interface en polyéthylène [226].

Quelques études font état d'un risque de relargage systémique d'ions cobalt et chrome issus de la structure des prothèses mais l'impact clinique est cependant inconnu pour le moment [228, 229].

Parmi les sept prothèses développées actuellement, la SB Charité III[®] et la PRODISC-L[®] sont les plus utilisées et bénéficient donc du recul clinique le plus important.

Résultats cliniques

Si les études relatives à ces deux implants sont les plus nombreuses, il faut cependant constater que la plupart de ces études présentent un faible niveau de pertinence comme ont pu le constater Freeman et Davenport en les analysant selon les recommandations du « Centre for Evidence Based Medicine » d'Oxford [230]. En effet, la plupart de ces études sont rétrospectives ou ne représentent que l'analyse de séries de cas. De plus elles souffrent de biais importants qui ont été très récemment pointés du doigt [231]. Les tableaux IX et X résument les différentes études et leurs conclusions.

L'efficacité antalgique semble satisfaisante que ce soit dans le cas de la SB Charité III[®] ou de la PRODISC-L[®]. Un retour aux activités professionnelles est permis la plupart du temps avec très rarement la nécessité de modifier le travail en terme de charge physique.

Néanmoins des complications, notamment prothétiques, sont décrites. Celles-ci sont rares mais nécessitent une réintervention sur le patient.

Les études promues par la Food and Drug Administration (FDA) permettent de comparer les techniques d'arthrodèse et d'arthroplastie. Elles concluent, pour ces deux prothèses lombaires totales, à la supériorité de l'arthroplastie [232].

Malgré un recul clinique faible à l'exception de quelques études [233, 234], ce type de prothèses apporte un bénéfice certain pour les patients. Les données obtenues devront être confirmées dans l'avenir.

Concernant les autres prothèses, quelques résultats commencent à être publiés. C'est le cas de la MAVERICK[®] avec les résultats préliminaires d'une étude prospective [235].

Tableau IX : études cliniques relatives à la prothèse discale SB Charité III®.

Auteurs et année de publication	Echantillon, suivi	Résultats	Complications
David [233]	N=106 Suivi=13 ans Etude de cas.	- retour au travail : 90% dont 78% au même niveau de difficulté. - flexibilité satisfaisante dans 90% des cas.	- 8 réinterventions par arthrodèse nécessaires - 5 cas d'arthrose - 3 cas d'affaissement de prothèse - 3 cas de dégénérescence du segment adjacent
McAfee [236] Blumenthal [237]	N=304 Suivi=2 ans Essai randomisé, prospectif, multicentrique. Essai de la FDA*.	- comparaison arthroplastie et arthrodèse → l'arthroplastie > arthrodèse pour différents points - restauration de la hauteur du disque, diminution du taux d'affaissement, restauration de la mobilité. - pas de conclusion concernant la diminution du risque de dégénérescence du segment adjacent.	
Guyer [232]	N=144 Suivi=2 ans Essai randomisé, prospectif	- Comparaison de l'arthroplastie et de l'arthrodèse → efficacité clinique identique.	
Zeegers [238]	N=50 Suivi=2 ans Etude de cohorte prospective	- résultats cliniques excellents : 70% des cas. - efficacité antalgique : 65% - retour au travail : 43%	- 12 réinterventions : 6 d'ordre prothétique - 1 patient avec une complication majeure (lésion de l'aorte)
Lemaire [234]	N=105 Suivi=51 mois Etude de cohorte rétrospective	- efficacité antalgique : 82% - retour au travail : 87%	- 3 complications d'ordre prothétique
Cinotti [239]	N=46 Suivi=3,2 ans Etude de cohorte rétrospective	- efficacité antalgique : 63%	- 1 réintervention pour dislocation
Griffith [240]	N=93 Suivi=1 an Etude de cohorte rétrospective	- efficacité antalgique : 80%	- 6 réinterventions (migration, dislocation)
Regan [241]	N=100 Suivi 6 mois Etude cohorte rétrospective	- efficacité antalgique : 66%	- 9 complications - 7 réinterventions
Ross [242]	N=160 Suivi=7 ans Etude cohorte rétrospective	- efficacité antalgique : 84%	- 53 complications - 12 réinterventions (4 cas : implant en cause)
Warachit [243]	N=43 Suivi=3 ans Etude cohorte rétrospective	- efficacité antalgique : 60%	- 3 complications - 1 réintervention

Elle conclut à une efficacité clinique équivalente entre l'arthroplastie et l'arthrodèse. Le nombre de patients et la durée de suivi restent cependant limités. Depuis 2005, aucun résultat clinique n'a été publié. La prothèse FLEXICORE[®] a bénéficié d'une étude prospective randomisée publiée en 2008 [244]. Son efficacité clinique est comparable avec l'arthrodèse. Les résultats de l'étude suggèrent également une diminution du temps d'intervention, du temps d'hospitalisation et une moindre consommation de produits sanguins. Aucune analyse médico-économique n'a cependant été réalisée afin de valider le cout réel comparatif par rapport à l'arthrodèse de la pose de cet implant en particulier au regard de son propre coût. L'ACROFLEX[®] a bénéficié en 2004 d'une étude de cohorte prospective qui conclut à une faible supériorité de la prothèse par rapport à l'arthrodèse. Le nombre de patients est cependant faible et le nombre de réinterventions ont été estimé à plus de 30% [245].

Tableau X : études cliniques relatives à la prothèse discale PRODISC-L[®].

Auteurs	Echantillon, suivi	Résultats	Complications
Zigler [246]	N=286 ; Suivi=2 ans Essai randomisé, prospectif, multicentrique. Essai de la FDA*.	- comparaison arthroplastie et arthrodèse → l'arthroplastie > arthrodèse pour différents points	
Tropiano [247]	N=53 ; Suivi=1,4 ans Etude de cohorte rétrospective	- efficacité antalgique : 80% - retour au travail : 72%	- 3 réinterventions - 5 complications : fracture du corps vertébral, mal- apposition de l'implant, douleur radiculaire
Bertagnoli [248]	N=108 ; Suivi=1 an Etude de cohorte prospective	- efficacité antalgique : 90%	- pas de complications chirurgicales ou prothétiques
Mayer [249]	N=34 ; Suivi=6 mois Etude de cohorte prospective	- efficacité antalgique : 82%	
Chung [250]	N=36 ; Suivi=2 ans Etude de cohorte prospective	- efficacité antalgique : 60%	- 5 complications - 0 réintervention
Siepe [251]	N=99 ; Suivi=1 ans Etude de cohorte prospective	- efficacité antalgique : 60%	- 17 complications - 8 réintervention
Ogon [252]	N=34 ; Suivi=1 ans Etude de cohorte prospective	- efficacité antalgique : 64%	- 4 complications - 1 réintervention

b) Prothèses partielles

Description

L'histoire des prothèses partielles lombaires a commencé avec la bille d'acier de Fernström dans les années 1960. Elle était destinée au remplacement du NP dégénéré et peut donc être considérée comme la première prothèse partielle [253]. Depuis, différents concepts se sont succédés et deux groupes parmi ces prothèses partielles peuvent être distingués : les prothèses partielles non-polymériques constituées de matériaux solides et celles de nature polymérique. Il s'agit, contrairement aux prothèses totales où une certaine uniformité de design existe, de concepts totalement différents. Les tableaux XI et XII résument l'ensemble des développements actuels dans ce domaine et la figure 17 illustre le design de ces prothèses. Ces prothèses partielles, préservent les structures environnantes (AF, plateaux vertébraux, ligaments) contrairement aux prothèses totales. Seul l'élément atteint est remplacé ce qui représente potentiellement un avantage [254].

Tableau XI : Caractéristiques des prothèses nucléaires non-polymériques préformées.

Dispositif	Fabricant	Matériaux	Résultats
REGAIN [®]	Biomet Inc.	Carbone pyrolytique	Tests réalisés chez l'animal concluants. Essais chez l'homme en cours en Europe.
CL-Disc [®]	Biomet Inc.	Céramique de zirconium	En cours de développement.
IPD [®]	Dynamic Spine	?	En cours de développement
TranS1 PDR [®]	TranS1	?	En cours de développement

PDR : Percutaneous Disc Reconstruction

L'utilisation des prothèses du premier groupe, étant donné la dureté de leur matériau, est aujourd'hui très limitée. Néanmoins les premiers tests réalisés semblent concluants.

Le groupe des prothèses partielles polymériques offrent un recul clinique plus important, notamment pour son chef de file le PDN[®] (Prosthetic Device Nucleus[®]). Parmi les polymères utilisés les hydrogels représentent une famille majeure (PDN[®], Biodisc[®]). En effet, ce type de matériau reproduit théoriquement la structure du NP, absorbant une grande quantité d'eau et augmentant ainsi de taille jusqu'à reproduire la hauteur du DIV [227, 232].

Tableau XII : Les prothèses lombaires partielles polymériques.

Nature		Dispositif	Fabricant	Matériaux	Résultats	
Préformés	Polyuréthane	NEWCLEUS [®]	Zimmer Spine	Polycarbonate uréthane. Forme spiralée préformée autorisant une implantation par une technique chirurgicale mini-invasive.	Tests <i>in vitro</i> et chez l'animal réalisés. 5 patients implantés (en 2003).	
	Hydrogel	Dual Disc Cylinders [®]	Ray and Corbin	?	En cours de développement	
		PDN [®] (Prosthetic Device Nucleus) (HYDRAFLEX [®])	Raymedica	Hydrogel de HYPAN. Plusieurs modifications au cours des années : double compartiment remplacé par un compartiment unique (PDN Solo). Aujourd'hui amélioration du design : HYDRAFLEX [®] (moins d'extrusion).	Chef de file des prothèses partielles (1 ^{ère} implantation en 1996 chez l'homme). Etude FDA lancée en 2006 sur l'HYDRAFLEX [®] .	
		Aquarelle [®]	Stryker	Polyvinyl alcool (PVA).	Essais d'améliorations du dispositif en cours.	
		NeuDisc [®]	Replication Medical	Polymère modifié de polyacrylonitrile renforcé par une mèche de dacron.	Tests mécaniques et pré-cliniques réalisés. Implanté en Europe dans le cadre d'essais cliniques (pas aux USA).	
		SaluDisc [®]	Spine Medica	?	En cours de développement	
Formés <i>in situ</i>	Thermodurcissable	Avec ballon	DASCOR [®]	Disc Dynamics Inc.	Polyuréthane liquide à 18°C injectable sous pression au sein d'un ballon de PU solide. Solidification après 15 minutes.	Utilisé en clinique depuis 2003 (pas aux USA). Marquage CE et autorisation de commercialisation depuis 2005. Etude clinique FDA lancée en 2006.
		Sans ballon	Gelifex [®]	Synthes	Hydrogel thermodurcissable.	Premiers tests pré-cliniques en cours.
	Silicone		SINUX ANR [®]	Depuy	Polymère de pentaméthyl sulfoxide (PMSO) injectable.	En cours de développement
			PNR [®]	TranS1	?	En cours de développement
	Hydrogel		NuCore [®]	Spine Wave	Hydrogel d'élastine injectable.	Tests pré-cliniques réalisés. Tests cliniques en cours.
			Biodisc [®]	CryoLife	Hydrogel protéique (dérivé du produit Bioglue [®]). Albumine bovine + glutaraldéhyde. Injectable.	Tests pré-cliniques réalisés. Tests cliniques en cours.
	Autre polymère		DiscCELL [®]	Gentis	HPMC + eau dans une phase huileuse (émulsion).	Etude prospective non-randomisée débutée en janvier 2008.

HYPAN : polyacrylonitrile-polyacrylamide ; PNR : Percutaneous Nucleus Replacement ; FDA : Food and Drug Administration.

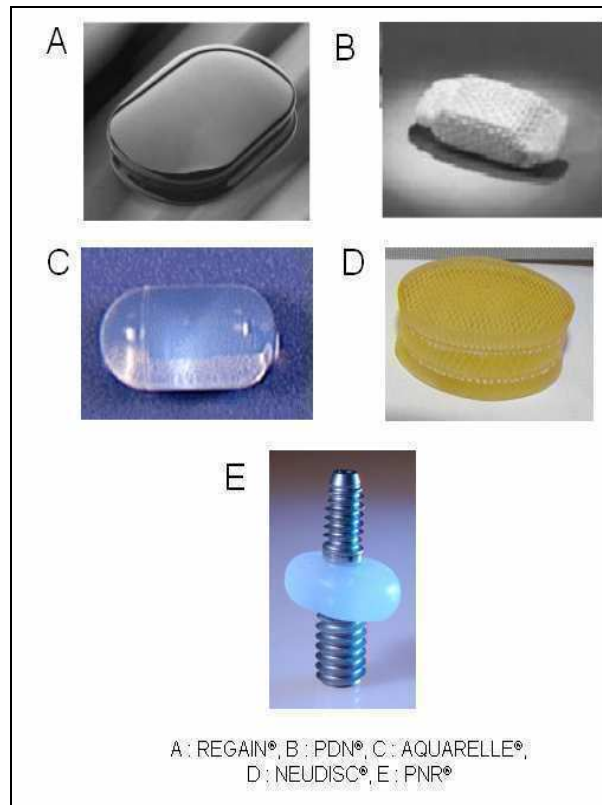


Figure 17 : Prothèses lombaires partielles (Source : fabricants).

Résultats cliniques

La plupart des prothèses partielles sont actuellement en cours de développement ou ont remplis les premiers critères pré-cliniques avant une utilisation chez l'homme.

La PDN[®] est l'implant le plus avancé en terme de résultats cliniques. Il apparaît satisfaisant mais son principal inconvénient est un risque de déplacement (notamment par extrusion à travers l'AF) de celle-ci après implantation (10% des cas) [227, 255]. L'évolution du design au cours des années tend à diminuer cet inconvénient majeur notamment avec le développement de la dernière génération de ce produit : l'HYDRAFLEX[®].

Le recul clinique reste cependant faible mais il apparaît clair aujourd'hui que ce type de prothèses doit être essentiellement réservé à une utilisation dans des stades précoces de la dégénérescence du DIV, notamment avant que l'AF ne soit lésé.

Comme l'arthrodèse, l'impact socio-économique des prothèses discales devra être pris en compte. Des études médico-économiques et de suivi à long terme des patients devront être

Partie I : Etat des connaissances sur le disque intervertébral.

menées afin de statuer sur le réel bénéfice d'une technique par rapport à une autre mais également d'une prothèse par rapport à une autre.

IV- Traitements novateurs de la dégénérescence discale et des douleurs lombaires

Tous les traitements décrits précédemment sont à visée uniquement symptomatique. Certes, les douleurs du patient sont souvent soulagées mais l'origine du problème, la dégénérescence du DIV dans la grande majorité des cas, n'est pas prise en compte. Dans ce contexte, de nouveaux traitements sont en développement grâce à l'amélioration de nos connaissances de la physiopathologie du DIV. Il s'agit d'un nouveau challenge dont les avancées devraient permettre de modifier la prise en charge conventionnelle des patients lombalgiques dont l'origine est la dégénérescence discale.

1- Transplantation de disques intervertébraux

Il ne s'agit pas à proprement parler de médecine régénérative, mais comme elle, la transplantation de DIV vise le même objectif qui est de restaurer le tissu lésé. Devant l'avènement des transplantations rénales, pulmonaires et cardiaques (pour ne citer que celles-ci), des recherches ont été menées afin d'envisager une éventuelle application à la dégénérescence discale. Les premiers résultats, obtenus chez des chiens et primates, ont montré des résultats intéressants à partir de prélèvements frais non-autologues de DIV [256-259]. Récemment en Chine, les premiers patients ont été transplantés. Il s'agissait de cinq patients souffrant de dégénérescence discale au niveau cervical qui ont bénéficié d'une transplantation discale allogénique issue de cadavres. Après cinq ans, les résultats démontrent la faisabilité, la sécurité et une certaine efficacité clinique chez ces patients [260, 261]. Aucun traitement immunosuppresseur n'a été donné aux patients et aucun signe de rejet n'a été identifié après cinq ans [260].

Ces résultats préliminaires au niveau cervical nécessiteront de futures investigations afin de prendre en compte les caractéristiques anatomiques et cinématiques des DIV au niveau lombaire, siège préférentiel de la dégénérescence discale.

La faible disponibilité en greffons et l'augmentation de l'âge des donneurs (dont les DIV sont certainement en partie dégénérés) rendent ce type de traitement vraisemblablement assez confidentiel. Ce dernier point donne au contraire aux approches présentées ci-dessous un avantage considérable afin de pallier à la faible disponibilité en greffons.

2- Biothérapies

2-1 *Traitements par voie systémique*

La physiopathologie de la dégénérescence discale met en avant la fragilité métabolique de la MEC liée à un excès de catabolisme. Dans ce contexte, l'administration de molécules de façon systémique afin de contrecarrer cette rupture de la balance métabolique est une approche envisagée.

Le resvératrol, molécule issue du grain de raisin, est en cours d'évaluation [262]. Il a montré sa capacité à augmenter la synthèse de PG au sein de la MEC du DIV et à bloquer le catabolisme induit par des cytokines inflammatoires comme l'IL-1. Il constituerait donc un puissant médiateur anabolique mais des investigations complémentaires sont nécessaires afin de juger de son réel intérêt.

L'amélioration des connaissances relatives à la physiopathologie discale permet également d'envisager d'autres cibles. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs du catabolisme permettant de freiner ou de stopper la dégradation de la MEC par les protéases est proposée [25, 103]. Cette approche est actuellement au stade d'études *in vitro* en particulier pour l'IL-1 et le TNF- α mais bénéficie des résultats cliniques positifs obtenus dans le cadre de la prise en charge des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (anakinra KINERET[®], Amgen ; adalimumab HUMIRA[®], Abbott ; infliximab REMICADE[®], Schering Plough). Un autre anticorps

monoclonal (tocilizumab), spécifique du récepteur à l'IL-6, est également en cours d'investigations dans la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde [263] et pourrait constituer un autre candidat potentiel pour une utilisation au niveau discal.

L'utilisation d'inhibiteurs de l'apoptose constitue une autre approche potentielle dans les limites de la connaissance de son rôle dans la dégénérescence discale. Des essais *in vitro* ont été menés utilisant de l'IGF-1, le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), des inhibiteurs de caspases [264-266]. Aucune étude *in vivo*, à notre connaissance, n'a été menée à ce jour.

Une autre cible envisagée est la cascade de kinase menant à l'activation de la p38 MAPK (mitogen-activated protein kinases). Ces kinases possèdent différentes propriétés. Elles sont impliquées notamment dans l'induction et l'action des cytokines inflammatoires, dans la production de MMPs, l'apoptose des chondrocytes et la stimulation d'autres facteurs intervenant dans les réactions inflammatoires. Il a été montré, au sein de cellules du NP, que l'inhibition de p38 MAPK diminue l'expression de l'IL-1 et du TNF- α . Une diminution de MMP-3, de l'IL-6 et de PGE-2 ainsi qu'une augmentation de l'expression de TIMP-1 est alors observée [267]. De même, la p38 MAPK est impliquée dans l'apoptose des cellules de l'AF [268]. Dans ce contexte, ces données sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle le blocage de p38 MAPK pourrait aider à restaurer l'équilibre métabolique au sein de la MEC. Actuellement, trois de ses inhibiteurs sont évalués pour la prise en charge de douleurs multiples, de myélomes et de la polyarthrite rhumatoïde [269]. Une première étude *in vitro* a montré la faisabilité de bloquer p38 MAPK au sein de cellules du DIV par une approche de thérapie génique [270]. Il reste néanmoins à mener des études *in vivo* afin de conclure à la réelle efficacité de cette approche.

Un inhibiteur du NGF, médiateur de la douleur, a fait l'objet également d'une étude en 2010 pour la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde [271]. Il s'agit du tanizumab, autre anticorps monoclonal, qui pourrait présenter également un intérêt dans la prise en charge des douleurs d'origine discale.

Théoriquement, les différentes approches citées ci-dessus apparaissent séduisantes. Cependant, la faible biodisponibilité de ces molécules au sein du DIV devra être prise en compte au regard d'une faible vascularisation dans les stades précoces de dégénérescence. Cette faible biodisponibilité risque de diminuer ou d'induire des variations importantes de concentrations *in situ*, entraînant l'inefficacité du traitement.

2-2 Traitements locaux par injection in situ

Cette approche est ciblée sur la rupture de l'équilibre métabolique de la MEC et la possibilité de la contrecarrer. Dans ce contexte, l'injection itérative de facteurs de croissance afin de favoriser l'anabolisme constitue une approche défendue par de nombreux auteurs. Des injections de TGF- β , d'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1), de PDGF, de GDF-5 (Growth Differentiation Factor-5) et d'EGF (Epithelial Growth Factor) ainsi que de BMP-2, -7 (OP-1) et -12 [272, 273] ont été proposées. Au cours d'études *in vitro* et chez l'animal, la faisabilité de cette approche a été vérifiée. L'augmentation de la synthèse de PGs et de collagène de type II au sein de la MEC a été démontrée. *In vivo*, les résultats montrent une augmentation de la hauteur discale et de la densité cellulaire ainsi que du contenu en PG. Néanmoins, ces résultats sont souvent difficiles à interpréter, voire contradictoires en raison de l'absence d'uniformité entre les modèles animaux de dégénérescence discale utilisés (ponction à l'aiguille, systèmes de compression discale...). Aucun essai clinique chez l'homme n'a pour le moment débuté à notre connaissance.

Cette approche souffre de certains inconvénients majeurs qui risquent de limiter son utilisation. En effet, l'action de ces facteurs de croissance est conditionnée par la présence de cellules au sein du DIV traité. Or, à part aux stades précoces de dégénérescence discale, la densité cellulaire chute dramatiquement. Par ailleurs, le faible nombre de cellules qui persistent présente un phénotype altéré risquant d'empêcher le facteur de croissance de jouer son rôle voire même d'induire des effets inattendus. La courte durée d'action de ces facteurs

de croissance représente également un point négatif. Ainsi les injections itératives nécessaires, pour pallier à cette limite pharmacocinétique, risquent de potentialiser les effets secondaires des facteurs de croissance [274]. Les effets à l'arrêt du traitement devront également être pris en compte. Les données montrent également que l'action de ces facteurs de croissance varie selon le type cellulaire (AF ou NP) et le stade de la dégénérescence discale [274]. Enfin, l'origine multifactorielle de la dégénérescence discale, décrite précédemment, suggère fortement que l'action d'un seul facteur de croissance sera insuffisante (au mieux transitoire) [145]. Seul un cocktail de facteurs de croissance, dont la composition reste à définir, pourrait éventuellement permettre de restaurer l'intégrité discale.

Le tableau XIII résume les résultats actuels obtenus dans ce domaine.

Tableau XIII : Injections *in situ* : état de l'art (modifié et mis à jour à partir de Masuda et al. Eur Spine J, 2008 [272]).

Facteur de croissance	Animal	Modèle de dégénérescence	Dose de facteur de croissance	Effet	Biblio.
IGF-1	Rat	Compression	8 ng / 8 µl / DIV	Clusters de cellules. Simple injection.	Walsh [275]
GDF-5	Rat	Compression	8 ng / 8 µl / DIV	Clusters de cellules. Augmentation de la hauteur discale. Simple injection.	Walsh [275]
TGF-β	Rat	Compression	1.6 ng / 8 µl / DIV	Prolifération cellulaire (injections multiples).	Walsh [275]
bFGF	Rat	Compression	8 ng / 8 µl / DIV	Pas de réponse	Walsh [275]
OP-1	Lapin	Pas d'induction de la dégénérescence	2 µg / 10 µl / DIV	Augmentation de la hauteur discale. Augmentation du contenu en PG.	An [276]
OP-1	Lapin	Chimionucléolyse Injection de C-ABC	100 µg / 10 µl / DIV	Augmentation de la hauteur discale. Augmentation du contenu en PG.	Imai [277]
OP-1	Lapin	Ponction à l'aiguille	100 µg / 10 µl / DIV	Augmentation de la hauteur discale. Amélioration des scores IRM et histologiques. Contenu en PG augmenté dans l'AF et le NP.	Masuda [278]
GDF-5	Lapin	Ponction à l'aiguille	1 ng, 100 ng, 1 µg, 100 µg / 10 µl / DIV	Augmentation de la hauteur discale. Amélioration des scores IRM et histologiques.	Chujo [279]
OP-1	Lapin	Ponction à l'aiguille	100 µg / 10 µl / DIV	Augmentation de la hauteur discale. Amélioration des propriétés visco-élastiques.	Miyamoto [280]

(Suite tableau XIII)

OP-1	Lapin	Chimionucléolyse Injection de C-ABC	100 µg / 10 µl / DIV	Augmentation de la hauteur discale. Contenu en PG augmenté dans l'AF et le NP.	Imai [281]
BMP-2	Lapin	Déchirure de l'AF (5 X 7 mm)	100 µg / 100 µl / DIV	Aggravation de la dégénérescence. Augmentation de la vascularisation et des fibroblastes.	Huang [282]
PRP	Lapin	Nucléotomie	20 µl PRP + Microsphere / DIV ou 5 µl PRP + 15 µl PBS	Diminution de la dégénérescence lors du couplage PRP et microspheres.	Nagae [283]
BMP-12	Homme	<i>In vitro</i>	/	Augmentation de la synthèse en protéine matricielle.	Gilbertson [284]
IGF-1	Homme	<i>In vitro</i>	/	Réduction du pourcentage de cellules apoptotiques.	Gruber [264]
IGF-1	Rat	<i>In vitro</i>	/	Protection contre l'apoptose cellulaire.	Wang [266].
PDGF	Homme	<i>In vitro</i>	/	Réduction du pourcentage de cellules apoptotiques.	Gruber [264]
Inhibiteurs de caspases	Rat	<i>In vitro</i>	/	Atténuation de l'apoptose cellulaire.	Park [265]

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1; GDF-5 : Growth Differentiation Factor-5 (CDMP-1 : Cartilage Derived Morphogenetic Protein) ; TGF-β : Transforming Growth Factor-β, bFGF : basic Fibroblast Growth Factor, OP-1 : Osteogenic Protein-1 (BMP-7) ; BMP-2 : Bone Morphogenetic Protein-2; PRP : Platelet-Rich Plasma; C-ABC : Chondroitinase-ABC ; IL : Interleukin ; TNF : Tumor Necrosis Factor ; PDGF : Platelet-Derived Growth Factor.

2-3 Thérapie génique

La thérapie génique est définie comme le transfert d'acides nucléiques au sein de cellules cibles afin de traiter ou de prévenir une maladie [285]. Après transfection, la cellule génétiquement modifiée va produire la protéine d'intérêt biologique. Le choix du gène à transférer est basé, dans le cas du traitement de la dégénérescence discale, sur les connaissances de sa physiopathologie. Il n'est donc pas étonnant de retrouver les différents médiateurs précédemment décrits.

Afin de transférer le gène d'intérêt au sein des cellules cibles, l'utilisation d'un vecteur est nécessaire et deux choix sont possibles selon qu'ils sont d'origine virale ou non. Ces vecteurs ont pour rôle d'héberger, de transporter, de protéger et de délivrer la séquence génétique au

sein de la cellule cible [286]. Les vecteurs viraux présentent une meilleure efficacité en terme de transduction et l'expression du gène transduit, pour la plupart, persiste tout au long de la vie de la cellule. Parmi les virus qui ont fait l'objet d'investigations, les plus communs sont les rétrovirus parmi lesquelles les lentivirus [287], les adénovirus [80], les virus adéno-associés (AAV) [288] et les baculovirus [289]. La sécurité d'utilisation de ces virus semble satisfaisante mais des investigations supplémentaires sont nécessaires pour la garantir. En effet, l'administration de hautes doses de vecteurs viraux (atténués certes mais présentant tout de même une partie de leur génome) pourrait potentiellement induire une toxicité systémique, une cytotoxicité voire même une réponse immunitaire inadaptée. Ainsi, les résultats d'une étude basée sur la transfection de cellules du DIV par un adénovirus ont montré une possible transfection en zone ectopique dans d'autres organes [290]. Les adénovirus ont été essentiellement utilisés afin de réaliser la preuve de concept de la thérapie génique. En effet, leur efficacité de transduction en particulier au sein de cellules qui ne se divisent pas est remarquable. Ils possèdent malheureusement des effets secondaires potentiels à dose thérapeutique [286]. Les AAV constituent une alternative intéressante car ils présentent un bon profil de sécurité. Une charge virale supérieure est néanmoins nécessaire afin d'obtenir une expression similaire du transgène. Actuellement, l'utilisation des lentivirus est restreinte étant donné les risques liés à leur origine proche de celle du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ces vecteurs constituent pourtant un outil de transfection intéressant car ils sont capables de s'intégrer au génome de cellules qui ne sont pas en cours de division [286].

Au regard des inconvénients des virus, les vecteurs non-viraux semblent intéressants et font l'objet de recherches importantes [291, 292]. Malheureusement, ils présentent le désavantage d'une transfection moins efficace avec une durée d'action moindre par absence d'intégration au génome [293]. Afin d'y remédier, des travaux sont en cours pour augmenter le rendement de cette transfection par différents procédés (gene gun, liposomes ...) [294].

Le tableau XIV résume les avantages et inconvénients des différents vecteurs viraux et non-viraux.

Contrairement à une stratégie basée sur l'administration de facteurs de croissance de façon itérative, la thérapie génique présente l'avantage de permettre une synthèse prolongée dans le temps du gène d'intérêt et donc une synthèse protéique sur le long cours.

La méthode de délivrance du gène au niveau de l'organe cible est un point essentiel à prendre en compte. Deux méthodes peuvent être distinguées : le transfert direct du gène dans les cellules cibles *in situ* (approche *in vivo*) ou le prélèvement des cellules au sein de l'organe, puis leur culture *in vitro* et leur transfection avant réimplantation au sein du tissu à traiter (transfert indirect du gène, approche *ex vivo*).

Dans le cadre d'une application discale, l'utilisation d'une thérapie génique locale (et non-systémique) *in vivo* semble appropriée. L'argument du privilège immunitaire va en ce sens. Il permet, comme il a été montré par Nishida et al., une expression prolongée du transduit sans réaction immunitaire délétère vis-à-vis du vecteur [79, 80]. Cependant, la faible densité cellulaire au sein du DIV dégénéré rend prévisible l'inefficacité de cette approche en raison de l'absence de cible pour le vecteur et son transduit. Quant à l'approche *ex vivo*, sa faisabilité a été prouvée. L'obtention d'une quantité suffisante de cellules du NP reste un problème sans compter le risque de modification du phénotype cellulaire lors de l'étape de culture. Cette approche *ex vivo* est envisagée avec des cellules souches mésenchymateuses transfectés. Il s'agit dans ce cas d'une approche de thérapie cellulaire qui sera traitée ultérieurement.

Le caractère multifactoriel de la dégénérescence discale suggère l'intérêt d'utiliser un « cocktail » de gènes à transférer. Les résultats d'une étude démontrant l'effet synergique d'une transfection associant les gènes du TGF- β 1, IGF-1 et BMP-2 [295] en attestent. La combinaison de gènes permettrait également de diminuer les doses de virus à injecter et donc de diminuer les risques de toxicité systémique, de cytotoxicité et de réponse immunitaire évoqués précédemment.

Tableau XIV : Avantages et inconvénients des vecteurs viraux et non-viraux (D'après Shimer et al. Spine, 2004 [286]).

Vecteurs	Avantages	Inconvénients
Adénovirus	Titration haute (10^{12} pfu/mL). Haute efficacité de la transduction (<i>ex vivo et in vivo</i>). Transduction de nombreuses cellules. Transduction des cellules en phase de division et non-divisées. Production facile.	Persistance épisomique. Expression transitoire. Toxicité immunologique potentielle lors d'administrations répétées. Pas de ciblage. Taille réduite du transduit : 4–5 kb
Virus Adéno-associé (AAV)	Intégration au chromosome 19 afin d'établir une infection latente. Expression prolongée. La transduction ne nécessite pas de division cellulaire. Petit génome, pas de gènes viraux.	Mutagenèse potentielle. Titration haute (10^{10} pfu/mL) mais production difficile. Taille réduite du transduit : 5 kb.
Lentivirus	Transduction des cellules en phase de division et non-divisées. Transduction des cellules souches hématopoïétiques. Titration relativement haute (10^6 – 10^7 pfu/mL).	Sécurité virale à évaluer (HIV). Production et conservation difficile. Taille réduite du transduit : 8 kb. Expérience clinique limitée.
Rétrovirus	Intégration au genome cellulaire. Tropisme cellulaire large. Expression stable et prolongée. Titration relativement haute (10^6 – 10^7 pfu/mL). Taille importante du transduit : 9–12 kb.	Transduction inefficace. Mutagenèse potentielle. Nécessite des cellules en division pour permettre la transduction. Pas de ciblage. Réplication potentielle.
Liposomes	Non-immunogène. Bon profil de sécurité. Origine synthétique. Taille illimitée du transfectant. Transfection <i>ex vivo</i> efficace. Production, conservation, et contrôle de la qualité relativement simple.	Transfection inefficace <i>in vivo</i> . Ciblage difficile. Expression transitoire. Expérience clinique limitée.
Conjugué ADN-protéine	Taille illimitée du transfectant. Ciblage spécifique. Production, conservation, et contrôle de la qualité relativement simple. Design flexible. Transfection <i>ex vivo</i> efficace. Immunogénicité faible. Bon profil de sécurité.	Expression transitoire. Persistance épisomique. Transfection <i>in vivo</i> inefficace. Expérience clinique limitée. Instable.
Naked ADN (injection, gene gun, électroporation)	Taille illimitée du transfectant. Production, conservation, et contrôle de la qualité relativement simple. Très bon profil de sécurité. Immunogénicité très faible/ Efficacité clinique démontrée.	Très courte durée d'expression. Persistance épisomique. Transfection inefficace <i>in vivo et ex vivo</i> . Reciblage très difficile.

Le tableau XV résume l'ensemble des investigations réalisées au niveau du DIV à l'aide de cette approche. Les études validant l'efficacité de la transfection de cellules ne sont pas

traitées ici. Seules les études de preuve de concept des approches *in vivo* et *ex vivo* sont recensées.

Tableau XV : Etat actuel des avancées en thérapie génique.

Nature du transgène	Transgène	Modèle animal	Vecteur	Modalités et résultats	Thérapie <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i>	Biblio
Facteur de transcription	SOX9	Lignée cellulaire chondroblastique (HTB-94)	Ad.	Transfection <i>in vitro</i> des cellules HTB-94. Injection des cellules transfectées dans des DIV de lapins. Augmentation de la production de la synthèse de SOX9 et de collagène II.	<i>Ex vivo</i>	Paul [296]
Facteur de croissance (anabolisme)	TGF- β 1 et GDF-5	Cellules de lapin et humaines	Ad.	Cellules du NP cultivées dans des billes d'alginate et co-cultivées avec des chondrocytes transduits. Augmentation de la production en PG et en collagènes.	<i>Ex vivo</i>	Wang [297]
Facteur de croissance (anabolisme)	TGF- β 1	DIV de lapins	Ad.	Augmentation de la synthèse <i>in situ</i> de TGF- β 1 et de PG.	<i>In vivo</i>	Nishida [79]
Facteur de croissance (anabolisme)	TGF- β 1	DIV de lapin.	Ad.	Augmentation de la synthèse <i>in situ</i> de TGF- β 1.	<i>In vivo</i>	Zhan [298]
Facteur de croissance (anabolisme)	GDF-5	DIV de souris Balb/c	Ad.	Restauration de la hauteur discale. Augmentation de la production d'agrecane.	<i>In vivo</i>	Liang [299]

Ad. : Adénovirus; TGF- β : Transforming Growth Factor- β ; GDF-5 : Growth Differentiation Factor-5.

Depuis quelques années et la découverte des ARN interférents (ARNi), primée par le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006 (Andrew Fire et Craig Mello), des études tentent de mieux comprendre leur utilisation potentielle en thérapeutique [300]. De récentes études *in vitro* [150, 270, 301] et *in vivo* [302] confirment la faisabilité de cette stratégie. L'efficacité véritable avec des procédures stables dans le temps ainsi que la libération

suffisante et contrôlée de quantités de RNAi sont des données qu'il faudra confirmer à l'aide d'études complémentaires. De façon constitutive, les cellules possèdent un seul type d'ARNi : les miARN (micro ARN). Les miARN sont des ARN simple brin longs d'environ 21 à 24 nucléotides. Ceux-ci ne constituent pas un outil thérapeutique mais leur identification permet d'envisager des cibles thérapeutiques potentielles. La mise en œuvre de cette approche d'« interférence » utilise deux types d'ARNi synthétiques : les siARN (small interfering ARN) et les shARN (small hairpin ARN). Les siARN sont de petits ARN double brin de 21 nucléotides. Proche des siARN, les shARN (small hairpin ARN) ont une forme d'épingle à cheveux. Ils sont tous les deux capables après transfection cellulaire de diminuer la quantité d'ARNm cibles au sein de cellules avec des mécanismes proches. A cette fin, des vecteurs viraux sont utilisés. Ce sont les mêmes que ceux cités précédemment. Une diminution de la synthèse protéique du gène correspondant est induite. Dans ce contexte, le principe d'utiliser des ARNi synthétiques, en thérapie locale, ciblant des gènes susceptibles d'être à l'origine de la dégénérescence discale constitue une approche novatrice.

2-4 Thérapie cellulaire

Le rôle pivot des cellules dans la physiopathologie de la dégénérescence discale ne fait aucun doute actuellement. Il apporte toute la justification à la nécessité de remplacer ou de régénérer celles-ci au sein d'un DIV pathologique afin de corriger les déficits de synthèse de la MEC. Ce type de stratégie nécessite néanmoins de choisir le type cellulaire le plus adapté. Depuis une dizaine d'années, différents types cellulaires ont été évoqués avec des succès différents. Ainsi, ce chapitre traitera successivement des cellules du NP, des chondrocytes articulaires et des cellules souches mésenchymateuses (CSM).

*a) Les cellules du *Nucleus pulposus**

C'est tout naturellement que le premier choix du type de cellules à injecter s'est porté sur les cellules du NP d'un DIV [303-305]. Différentes possibilités ont été évoquées mais la plupart

souffrent d'inconvénients majeurs. Dans un premier temps, l'idée d'utiliser des cellules fraîches du DIV d'origine autologue a été proposée. Cependant, la nécessité d'altérer un AF sain à un étage discal lui-même sain pour prélever des cellules du NP induit une morbidité majeure. Cela rend difficile d'envisager cette option, au risque de contribuer à la dégénérescence d'un DIV adjacent [25, 306]. L'intérêt de cette option souffre également du faible nombre de cellules obtenu obligeant au prélèvement de quantités importantes de tissus [25]. Plus récemment, le prélèvement de cellules autologues du NP au décours d'une discectomie pour hernie discale a été réalisé [307]. Après une étape *in vitro* de prolifération des cellules, celles-ci sont réimplantées au niveau du DIV dégénéré. Cette technique est théoriquement intéressante. Il reste à prouver que ce type de prélèvement ne comporte pas un mélange de cellules non-pathologiques et pathologiques. Ainsi, la réinjection de ces dernières pourrait contribuer à la mise en place d'un néo-tissu aux propriétés mécaniques inadaptées [25]. Actuellement, ce concept est appliqué en Allemagne pour traiter les patients (Autologous disc-derived chondrocyte transplantation, Co.don[®]). Une dernière option relative aux cellules du NP a été envisagée. Il s'agit de l'utilisation de cellules d'origine allogénique. Théoriquement ce type de greffes pourrait ne pas subir le phénomène de rejet dans les sites présentant un privilège immunitaires comme le DIV [25]. En effet, les cellules greffées ne seraient pas reconnues comme une source d'antigènes.

b) Les chondrocytes articulaires

Les similitudes phénotypiques des cellules du NP avec les chondrocytes articulaires ont amené à envisager aussi leur utilisation [308, 309]. Ces prélèvements s'accompagnent d'une certaine morbidité au niveau du site donneur se manifestant essentiellement par des douleurs persistantes [310]. De plus, la nécessité d'une étape d'expansion *in vitro* au préalable conduit à un processus de dédifférenciation marqué par la perte des marqueurs chondrocytaires (diminution du collagène de type II et augmentation du collagène de type I) [308, 311]. Ce phénomène de dédifférenciation ne permet d'obtenir après réimplantation de ces cellules *in*

situ, que la formation d'un fibrocartilage aux caractéristiques biomécaniques médiocres [310, 312]. Les données contradictoires relatives à la proximité phénotypique des cellules du NP et du cartilage articulaire, décrites dans un précédent chapitre, sont également des éléments à prendre en compte car ils desservent l'intérêt potentiel de l'utilisation des chondrocytes articulaires. Il est probable que les chondrocytes injectés ne synthétiseront pas une MEC totalement comparable à celle d'un NP natif. La stabilisation de HIF-1 α en normoxie dans les cellules du NP contrairement aux chondrocytes articulaires doit notamment être prise en compte [59]. Cette propriété risque de conduire à des comportements différents de ceux de cellules natives après réintroduction des chondrocytes au sein du NP.

c) Les cellules souches mésenchymateuses

A la lecture des différentes limites relatives aux cellules du NP et des chondrocytes articulaires, des équipes ont testé d'autres sources potentielles de cellules. Les recherches menées ces dernières années sur les CSM, également appelées cellules souches stromales multipotentes, rencontrent un franc succès étant donné leurs caractéristiques intrinsèques [313, 314]. Ces CSM sont disponibles en quantité importante avec une large capacité d'expansion *in vitro*. Elles présentent également la capacité d'adhérer au plastique et la faculté de se différencier en différents types cellulaires (adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes notamment). Afin de les caractériser, la présence ou l'absence de marqueurs à leur surface membranaire est classiquement recherchée. Historiquement, le profil d'expression de ces marqueurs de surface était : CD73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD19-, CD79-, CD45- et HLA-DR [315-317]. Ce profil d'expression est aujourd'hui source de débat au regard de l'existence de différences notoires observées entre les individus notamment, en fonction de leur âge et de la localisation du prélèvement.

Initialement, les CSM ont été isolées de la moelle osseuse mais des études récentes ont montré leur présence en quantité importante dans d'autres tissus. C'est le cas notamment du tissu adipeux qui présente une forte concentration en CSM [318]. Le prélèvement par

liposuccion présente l'avantage d'un geste simple avec une morbidité liée au geste opératoire faible [319]. Le potentiel chondrogénique des cellules souches issues du tissu adipeux (CSTA) serait également comparable à celui des cellules souches isolées de la moelle osseuse [320]. Leur capacité à se différencier en cellules au phénotype chondrocytaire [315] et en cellules au phénotype proche des cellules du NP a également été démontrée [321, 322]. L'intérêt d'autres sources comme le liquide synovial [323-325] ou le tissu olfactif [326, 327] est également revendiqué par certains auteurs. Il a été également décrit l'existence au sein même du DIV d'une « niche » de CSM. Leur recrutement pourrait être envisagé afin de promouvoir la réparation d'un DIV dégénéré [328, 329].

Les CSMs, quelque soit leur origine, sont capables d'échapper au phénomène classique de reconnaissance allo-antigénique [330]. Cette tolérance immunitaire est définie comme l'absence de réponse immunitaire délétère contre les antigènes du donneur exprimés par l'organe transplanté - différents de ceux du donneur - tout en préservant la capacité du receveur de répondre vis à vis d'antigènes étrangers, notamment les pathogènes microbiens. Cela constitue un avantage considérable pour des applications cliniques potentielles évitant la prise de traitements immunosuppresseurs au long cours avec tous les effets secondaires qu'ils comportent. Ainsi, une utilisation de ce type de cellules pour une application en thérapie cellulaire, appliquée au DIV dans notre cas peut être envisagée. Deux approches sont couramment décrites. La première (approche *in vivo*) a pour principe l'injection des CSM sur le site à traiter avec un processus *in situ* de différenciation en cellules au phénotype proche de cellules du NP induit par l'environnement [331-333]. La seconde approche (*ex vivo*) consiste en l'injection de CSM pré-différenciées après une phase de culture *in vitro* [223]. Le choix entre ces deux alternatives est primordial. En effet, contrairement à la seconde alternative, l'injection *in situ* permet de s'affranchir de manipulations externes et simplifie la stratégie thérapeutique et son coût. De plus, il n'existe aucune méthode, dans un environnement monocouche, permettant de différencier les CSMs en cellules au phénotype proche des cellules du

NP. Actuellement, ce processus de différenciation a été démontré dans différents systèmes incluant la co-culture avec des cellules du NP [303, 334-337] ou des cellules notochordales [338] ce qui semble difficilement réalisable ensuite en pratique clinique. Comme il a déjà été énoncé précédemment, le phénotype des cellules du NP est couramment assimilé à celui de chondrocytes articulaires. Ainsi, elles expriment du collagène de type II et de l'agrécan, les deux marqueurs chondrocytaires classiques. Des différences phénotypiques font néanmoins des cellules du NP des cellules uniques et des marqueurs spécifiques ont été mis en évidence. Le choix parmi ces marqueurs (HIF-1 α , GLUT-1, ...) doit d'être réalisé avant de répondre au challenge que constitue la différenciation des CSM en cellules au phénotype proche de celles du NP. Ce choix n'est pas effectué à l'heure actuelle d'autant plus que les résultats des études visant à caractériser le phénotype des cellules du DIV peuvent parfois être confus. Ainsi, plusieurs questions persistent auxquelles il faudra répondre car elles conditionnent la qualité de la réparation tissulaire envisagée. Est-t'il envisageable d'implanter des CSM différenciées en chondrocytes étant donné leurs différences phénotypiques avec les cellules du NP ? Quel sera l'impact sur la qualité du néo-tissu formé ? Les caractéristiques biomécaniques du tissu seront-elles restaurées ? Si la différenciation des CSM en cellules du NP est nécessaire, quels seront les marqueurs de différenciation à choisir afin de valider celle-ci ?

La capacité de différenciation des CSM au sein d'un micro-environnement donné est un point qu'il faut approfondir. Les travaux récents ont permis de démontrer la capacité d'un micro-environnement à influencer la différenciation cellulaire [339, 340]. Il ne s'agissait pas dans ce cas de CSM mais de cellules thymiques implantées au niveau cutané. Celles-ci se sont transformées de manière irréversible en cellules cutanées, sans qu'il ait été nécessaire d'introduire de gènes contrôlant le destin cellulaire. Des investigations sont en cours afin de savoir si ces cellules pourraient être orientées différemment dans un environnement autre que celui de cellules de peau.

Les données relatives aux expérimentations de thérapie cellulaire sont résumées dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Etat actuel des avancées en thérapie cellulaire (Mis à jour à partir de Sakai et al. Eur Spine J, 2008 [341]).

Approche	Type de cellules	Origine	Modèle animal	Résultats	Biblio
<i>Ex vivo</i>	Cellules de l'AF et du NP	Co-culture de cellules de l'AF et du NP (cellules notochordales)	Lapin jeune donc présence de cellules notochordales (aspiration)	Formation de clusters de cellules chondrocytaires. Destruction de l'architecture discale. Augmentation de la présence de collagène de type II (immunohito.)	Okuma [305]
<i>Ex vivo</i>	Cellules de l'AF et du NP	Culture de cellules (autologue)	Chien (lésion mécanique)	Production d'une MEC semblable à celle d'un NP natif (agrécan, collagène II révélés par immunohisto). Maintien de la hauteur discale.	Ganey [309]
<i>Ex vivo</i>	Chondrocytes	Chondrocytes auriculaires (autologue)	Lapin (aspiration)	Formation d'une MEC cartilagineuse (hyaline) mais pas d'une matrice NP-like. Phénomène de dédifférenciation des cellules évoqué.	Gorensek [308]
<i>Ex vivo</i>	CSM	Culture de cellules de moelle osseuse (marquage des cellules au préalable : LacZ). Allogreffe de lapin.	Lapin (pas de dégénérescence induite au préalable)	Augmentation de l'expression et de la synthèse d'agrécan et de collagène II. Pas de modification du collagène I.	Zhang [342]
<i>Ex vivo</i>	CSM	Moelle osseuse (marquage des cellules au préalable : GFP). Allogreffe canine.	Chien (nucléotomie)	Maintien des cellules GFP à 8 semaines.	Hiyama [343]
<i>Ex vivo</i>	CSM	Moelle osseuse. Allogreffe humaine.	Rat (lésion de l'AF)	Survie des cellules après deux semaines post-implantation. Maintien de la hauteur discale et du signal en T2.	Jeong [344]
<i>In vivo + ex vivo</i>	CSM et cellules du NP	Culture de cellules du NP. Mélange avec des CSM humaines de moelle osseuse avant implantation.	Bœuf	Obtention de cellules chondrocytes-like <i>in situ</i> .	Le maître [332]
<i>In vivo</i>	CSM	Moelle osseuse (marquage des cellules au préalable : GFP). Allogreffe murine.	Souris (ponction de l'AF).	Arrêt de la dégénérescence discale. Différenciation chondrocytaire et stimulation des cellules endogènes.	Yang [345]
<i>In vivo</i>	CSM du tissu adipeux (autologue)	Avec ou sans matrice d'acide hyaluronique.	Modèle animal : chien (nucléotomie).	MEC adaptée que ce soit avec ou sans matrice.	Ganey [346]

CSM : Cellules Souches mésenchymateuses ; GFP : Green Fluorescent Protein ; AF : *Annulus fibrosus* ; NP : *Nucleus pulposus*.

Bien que le recul dans le temps de ces études soit faible, la confirmation de la production d'une MEC adaptée confirme l'intérêt de ces techniques. De même, le maintien de la hauteur discale a été démontré à court terme. La preuve de l'efficacité de l'utilisation de cellules est donc faite mais doit être nuancée par certains inconvénients, et en particulier l'absence de dispositifs adaptés à la différenciation de celles-ci. Ainsi, l'utilisation de ces cellules couplée à une matrice représente une autre approche prometteuse qui permet de lever ces obstacles. Il s'agit de l'ingénierie tissulaire.

3- L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire repose sur l'application des principes de la biologie et de l'ingénierie pour le développement de substituts fonctionnels afin de réparer les tissus lésés [347]. L'ingénierie tissulaire est basée sur l'association de trois éléments majeurs : des cellules réparatrices, un biomatériau (ou matrice) et des conditions de différenciation des cellules en un type cellulaire adapté à la nature du tissu visé par la thérapie [315].

Les applications thérapeutiques envisagées regroupent de nombreux domaines (os, vaisseaux, cartilage...). Les avancées obtenues récemment, en particulier au niveau du cartilage [318, 348], bénéficient à une possible application des principes de l'ingénierie tissulaire au DIV.

Les approches *in vivo* et *ex vivo* envisagées dans le chapitre précédent relatif à la thérapie cellulaire peuvent tout à fait être adaptées à l'ingénierie tissulaire.

Les trois éléments de base de l'ingénierie tissulaire du DIV seront décrits successivement puis un point bibliographique sur les avancées actuelles dans le domaine du DIV sera réalisé.

a) Les cellules

Considérant la physiologie du DIV, les travaux réalisés montrent que les cellules du NP, les chondrocytes et les CSM sont les trois types cellulaires considérés comme des candidats potentiels pour une utilisation en ingénierie tissulaire du DIV. Des atouts et des inconvénients

peuvent être définis pour chacun de ces types cellulaires. Ceux-ci ont été détaillés précédemment dans le chapitre relatif à la thérapie cellulaire. Parmi les trois types de cellules cités précédemment, les CSM apparaissent comme une source de cellules particulièrement prometteuse étant donné leur capacité à se différencier en différents types cellulaires et notamment en cellules au phénotype proche des cellules du NP. Les mêmes interrogations, émises dans le chapitre précédent, peuvent néanmoins être posées. Est-t'il envisageable d'implanter des CSM différenciées en chondrocytes étant donné leurs différences phénotypiques avec les cellules du NP ? Quel sera l'impact sur la qualité du néo-tissu formé ? Les caractéristiques biomécaniques du tissu seront-elles restaurées ? Si la différenciation des CSM en cellules du NP est nécessaire, quels seront les marqueurs de différenciation à choisir afin de valider celle-ci ?

b) Les matrices

L'ingénierie tissulaire associe aux cellules un système matriciel dont l'objectif premier est de reproduire les caractéristiques de la MEC du tissu que l'on souhaite réparer.

Ces matrices doivent posséder différentes propriétés [29, 315, 348-350] :

- Elles doivent être biocompatibles c'est à dire offrir un environnement approprié à la vie des cellules et préserver l'intégrité des tissus environnants ;
- Elles doivent constituer un environnement tridimensionnel favorable pour la croissance, la migration des cellules, la communication cellules-cellules et la synthèse d'une MEC adaptée ;
- Elles doivent garantir le maintien des cellules sur le site d'injection ;
- Elles doivent présenter des propriétés d'injectabilité assurant l'utilisation de techniques chirurgicales mini-invasives garantissant une faible morbidité opératoire pour le patient ;
- Elles doivent présenter au cours du temps une biodégradabilité afin de permettre au tissu néo-formé de s'intégrer à l'environnement tissulaire.

Un nombre important de matrices répondant à cette définition est aujourd'hui disponible. Elles peuvent prétendre à une utilisation en ingénierie tissulaire [315]. Les similitudes au

niveau de la composition de la MEC du NP et du cartilage articulaire permettent d'envisager l'utilisation des matrices développées pour réparer ce dernier. Parmi celles-ci et au regard de leur injectabilité, les matrices de la classe des hydrogels semblent particulièrement adaptées [315, 318, 348]. Parmi les hydrogels développés, il faut distinguer ceux d'origine naturelle et ceux d'origine synthétique. Les hydrogels d'origine synthétique sont actuellement utilisés pour le développement des prothèses partielles du NP décrits précédemment.

La matrice joue le rôle de vecteur pour les cellules. Après l'injection dans le DIV, la transition physico-chimique de l'aspect liquide vers un aspect gélifié a lieu. Cette transition répond à la définition du point de gel. A ce point de gel, il peut être associé le temps de gel (ou de réticulation) qui correspond au temps de prise en masse de celui-ci sous la forme d'un réseau stabilisé. Comme pour un ciment en orthopédie (mais également en maçonnerie), le point de gel et le temps de gel sont des paramètres qui doivent être pris en compte dans le développement de l'ingénierie tissulaire afin de laisser le temps aux chirurgiens de pratiquer l'intervention. Parmi les différents modes de réticulation, le mode auto-réticulant est actuellement considéré comme un des plus adaptés. En effet, l'absence d'adjuvants chimiques de réticulation, qui sont le plus souvent cytotoxiques (glutaraldéhyde, carbodiimide...), constitue un intérêt majeur. Cette autoréticulation peut-être produite par un stimulus lumineux, chimique (pH), thermique... facilement contrôlable et généralement bien toléré par les cellules. Ainsi, le processus de réticulation aboutit à la formation d'un gel aux caractéristiques rhéologiques propres à chacune des matrices.

Ces propriétés rhéologiques sont primordiales pour obtenir une matrice adaptée à l'application discale et aux contraintes tissulaires associées. Ainsi, les matrices d'alginate apparaissent aujourd'hui peu intéressantes pour une telle application au regard de leur faible capacité de résistance aux contraintes mécaniques [349]. Le chitosan, matrice naturelle isolée de la carapace des arthropodes, présente quant à lui une faible biocompatibilité liée à un pH de gélification trop acide qui peut être délétère pour les cellules [349]. Des modifications de

ce chitosan par substitution avec du glycérophosphate ont permis d'améliorer cette biocompatibilité et ainsi d'obtenir des résultats satisfaisants [351, 352]. Les autres inconvénients du chitosan sont son origine naturelle conduisant à une variabilité importante lors de l'extraction de la carapace des crustacés, ainsi que de faibles propriétés mécaniques et un taux de dégradation important [349]. D'autres matrices à base de collagène de type I ou II, de gélatine, de polyéthylène glycol (PEG) ont également fait l'objet d'investigations pour une application discale avec des résultats peu convaincants. De nouvelles matrices issues de recherches menées dans le domaine du cartilage articulaire sont en cours d'expérimentations comme celle à base de cellulose développée et brevetée par notre laboratoire. Cette matrice d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée est un hydrogel auto-réticulant. Les liaisons covalentes entre les différentes chaînes macromoléculaires se forment lors de l'addition d'un milieu tampon permettant l'obtention d'un gel [353]. Les paramètres de réticulation sont modulables et permettent d'envisager la formation d'un environnement tridimensionnel adapté aux fonctions cellulaires. Sa bonne biocompatibilité vis à vis de chondrocytes a été démontrée [354]. Enfin, les travaux ont permis de démontrer sa capacité à vectoriser des cellules en sous-cutané [355] et d'obtenir une réparation tissulaire adaptée du cartilage articulaire chez des lapins après induction de défauts cartilagineux [356].

c) Les conditions de différenciation

Les cellules au sein de la matrice doivent acquérir des caractéristiques proches de celles présentes initialement au sein du tissu à traiter. L'utilisation potentielle de CSM implique leur différenciation *in vitro* (approche *ex vivo*) en cellules du NP. Les conditions de culture doivent donc être définies afin de permettre cette différenciation. Les connaissances actuelles bénéficient des résultats obtenus dans le cadre de l'ingénierie tissulaire appliquée au cartilage articulaire. Nous verrons successivement l'importance de la culture en milieu tridimensionnel, les morphogènes nécessaires lors de la culture des cellules, l'intérêt de l'hypoxie et de l'utilisation de bioréacteurs couplée à des contraintes mécaniques.

- La culture en milieu tridimensionnel :

Quelle que soit la nature des cellules pour la mise en œuvre de l'ingénierie tissulaire du DIV, le processus de dédifférenciation de ces cellules en milieu monocouche doit être pris en compte. Ce phénomène inéluctable est bien décrit pour les chondrocytes articulaires lors de leur culture en système monocouche (2D) [357]. Il s'accompagne d'une modification de la morphologie des cellules qui prennent un aspect fusiforme proche de la morphologie des fibroblastes. En parallèle, l'expression de collagène de type II chute contrairement à celle du collagène de type I qui augmente [311]. Ce processus est réversible et les cellules peuvent retrouver leur morphologie ronde caractéristique de cellules « chondrocytaire » et exprimer majoritairement du collagène de type II si elles sont cultivées dans un système tridimensionnel (micromasses et matrice tridimensionnelle) [358-362]. L'existence de ce même processus a été récemment démontrée avec les cellules de NP [363] au sein d'un milieu tridimensionnel. L'hydrogel d'HPMC-Si évoqué précédemment, a également démontré sa capacité en tant que matrice tridimensionnelle au maintien du phénotype et même à l'inversion du processus de dédifférenciation après culture en milieu monocouche [354, 355]. Dans le cas de l'utilisation de CSM, il est nécessaire d'induire une différenciation adaptée des CSM en cellules possédant le phénotype de cellules du NP précédemment défini. Afin d'obtenir cette différenciation, la place des morphogènes est majeure.

- Les morphogènes :

L'orientation des CSM vers un phénotype cellulaire est aujourd'hui largement décrit et en particulier pour l'obtention de chondrocytes [318]. Différents morphogènes sont utilisés et la « recette » qui en découle est aujourd'hui de mieux en mieux définie. Ainsi, un protocole de différenciation chondrogénique de CSM isolées du tissu adipeux a fait l'objet d'une publication récente [364]. Cette différenciation doit être contrôlée. En effet, un des risques d'une différenciation non-contrôlée est la mise en place d'un processus d'hypertrophie. Ce processus, bien décrit avec les chondrocytes articulaires, constitue la phase ultime de la

différenciation chondrogénique qui s'accompagne de la minéralisation du cartilage. Les cellules expriment notamment le collagène de type X (en parallèle une diminution de l'expression du collagène de type II est observée) et Runx2, marqueurs classiques de l'hypertrophie. Ce processus d'hypertrophie a fait dernièrement l'objet de travaux dans le domaine du DIV et démontré son existence au sein du NP [120]. Son implication potentielle au cours de la dégénérescence a également été évoquée [120]. D'un point de vue théorique, l'implantation de cellules hypertrophiques doit être évitée car elle aboutirait à la formation d'un tissu minéralisé dont les propriétés mécaniques seraient incompatibles avec les objectifs fixés.

Du fait des similitudes entre les chondrocytes et les cellules du NP, la différenciation des CSM en cellules du NP fait appel aux mêmes morphogènes que ceux utilisés dans le domaine du cartilage articulaire. Ainsi, cinq familles présentent un intérêt [348]. Il s'agit :

- des membres de la superfamille du TGF- β (TGF- β 1-5, BMPs) ;
- des membres de la famille du FGF ;
- de l'IGF ;
- des membres de la famille Wingless (Wnt) ;
- et des membres de la famille Hedgehog (Sonic hedgehog Shh).

Ces différents morphogènes ont été identifiés lors des études sur la chondrogénèse à laquelle ils participent [348] (Figure 18). Différentes études ont déjà permis de valider le concept de différenciation des CSM vers des cellules au phénotype « NP-like » à l'aide de ces différents morphogènes [322, 365]. Les différences phénotypiques notées précédemment au sujet des cellules de NP et des chondrocytes articulaires doivent par ailleurs être pris en compte et nécessitent certainement des investigations supplémentaires. Il s'agit notamment de définir si les différentes étapes de la chondrogénèse, permettant l'orientation chondrogénique des CSM, sont totalement ou partiellement superposables avec celles permettant l'obtention de cellules du NP (Figure 18).

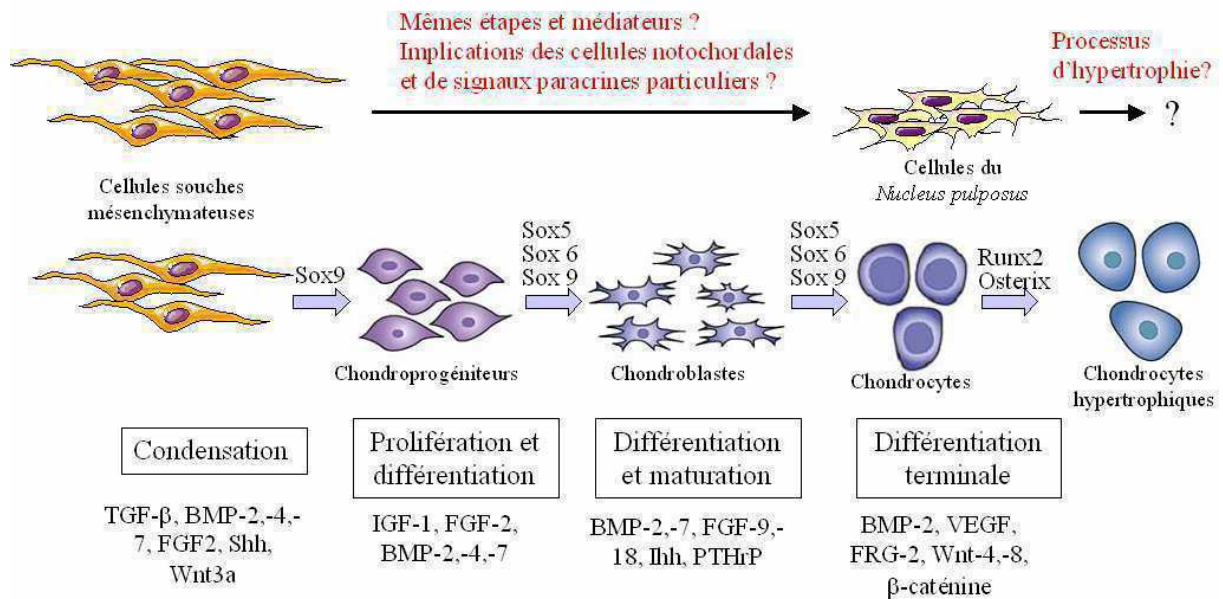


Figure 18 : Chondrogénèse et différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules du Nucleus pulposus. La chondrogénèse respecte différentes étapes dont les morphogènes et facteurs de transcription sont de mieux en mieux connus. La transposition de ces étapes à la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules du Nucleus pulposus sont en cours d'évaluation (Modifié d'après Vinatier et al. Trends Biotechnol, 2009 [348]).

- L'hypoxie :

L'avascularisation, caractéristique essentielle du cartilage articulaire et du DIV, conduit les cellules de ces deux tissus à vivre au sein d'un environnement hypoxique (2% de concentration en oxygène). La reproduction *in vitro* de cette hypoxie a montré sa capacité à induire la synthèse de MEC par des chondrocytes en culture [359, 366]. En parallèle, notre laboratoire a démontré que la différenciation de CSM vers le lignage chondrocytaire était également favorisée dans des conditions de culture sous de faibles tensions en oxygène [367-370]. Enfin, la synthèse d'une MEC cartilagineuse après différenciation des CSM en chondrocytes a été montrée. L'hypoxie pourrait donc constituer un moyen simple pour favoriser la différenciation des CSM vers des cellules au phénotype chondrocytaire. L'effet obtenu semble de plus reproductible quelque soit la source de CSM utilisées.

Ce processus de différenciation des CSM en cellules du NP, sous l'influence de l'hypoxie, a également été démontré [371, 372].

Un autre intérêt de l'hypoxie a été suggéré. Elle contribuerait à diminuer l'expression de collagène de type X, marqueur de l'hypertrophie chondrocytaire et pourrait donc prévenir le risque, non-souhaité, de calcification du tissu néo-formé [373, 374]. Afin de documenter plus en avant ce point des investigations sont en cours au laboratoire.

- Les contraintes mécaniques et les bioréacteurs :

Des contraintes mécaniques s'appliquent constamment sur le DIV et les cellules qui le composent. Ces contraintes variables en intensité et en fréquence contribuent de façon majeure à la différenciation chondrogénique des CSM au cours du développement du cartilage, et il est très vraisemblable qu'il en soit de même pour les cellules du DIV. L'effet de stimuli mécaniques sur les chondrocytes a ainsi démontré son importance pour le maintien de l'intégrité cartilagineuse [375]. Enfin, il apparaît que la nature des contraintes mécaniques induit des variations dans l'organisation de la MEC au niveau des collagènes et des GAGs [376].

Afin de respecter l'importance de ces stimuli mécaniques pour une future application en ingénierie tissulaire, l'utilisation de bioréacteurs peut-être envisagée. De nombreux bioréacteurs sont actuellement disponibles et offrent différentes modalités de culture et de mise en contraintes. Une revue sur ces bioréacteurs et leur application en ingénierie tissulaire du cartilage a été publiée [377]. Actuellement, ils sont en cours d'investigations pour une application discale [378].

L'importance des contraintes mécaniques dans le développement d'une approche d'ingénierie tissulaire ne doit pas être négligée. Il est crucial que le substitut cellule-matrice implanté *in fine* dans le tissu lésé soit biomécaniquement compétent afin de remplir son rôle [379].

L'article 2 (Intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering. J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, O. Hamel, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux. Joint Bone Spine, 2009; 76(6): 614-8.) est une revue de la littérature qui reprend les différents

Partie I : Etat des connaissances sur le disque intervertébral.

éléments de la physiopathologie discale et du développement de l'ingénierie tissulaire dans le domaine du DIV.

Article 2 :

Le disque intervertébral : de la physiopathologie à l'ingénierie tissulaire.

Après une brève description du disque intervertébral, cet article s'attache à décrire les connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires menant à la dégénérescence du disque intervertébral. La prise en charge de cette dégénérescence basée sur les principes de l'ingénierie tissulaire est ensuite abordée.

Article 2


Intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering.

J. Clouet, C. Vinatier, C. Merceron, M. Pot-Vaucel, O. Hamel, P. Weiss, G. Grimandi, J. Guicheux.

Joint Bone Spine.
2009; 76(6): 614-8.



ELSEVIER
MASSON

Available online at
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com

**JOINT
BONE
SPINE**

Joint Bone Spine 76 (2009) 614–618

Research lectures

The intervertebral disc: From pathophysiology to tissue engineering

Johann Clouet^{a,b}, Claire Vinatier^{a,c}, Christophe Merceron^a, Marianne Pot-Vaucel^{a,d},
Olivier Hamel^{a,e}, Pierre Weiss^a, Gaël Grimandi^{a,b}, Jérôme Guicheux^{a,*}

^a Inserm U791, laboratoire d'ingénierie ostéoarticulaire et dentaire (LIOAD), « groupe physiopathologie des tissus squelettiques et ingénierie du cartilage », université de Nantes, 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France

^b Service de pharmacie centrale, CHU de Nantes, 44093 Nantes, France

^c Graftys SAS, Aix-en-Provence, France

^d Service de rhumatologie, CHU de Nantes, 44093 Nantes, France

^e Service de neurochirurgie, CHU de Nantes, 44093 Nantes, France

Accepted 29 July 2009

Available online 9 October 2009

1. Introduction

Low back pain has a lifetime prevalence of 80% in the general population and causes a huge public health burden in industrialized countries. The most common cause of low back pain is degenerative disease of the intervertebral discs (IVDs). The economic impact of low back pain is tremendous, with estimated direct and indirect costs of 20 to 100 billion dollars per year in the US [1]. Symptomatic treatment is rarely sufficient and new therapeutic approaches are therefore needed, most notably to counteract the degenerative process. For many years, researchers have been working on methods to regenerate the Nucleus pulposus (NP), the central component of the IVD. Among the several approaches suggested to date, tissue engineering is considered promising by clinicians. Tissue engineering involves replacing the damaged tissue by a biomaterial and appropriate cells. Preclinical studies are under way, and the place for tissue engineering in the therapeutic management for low back pain is being defined.

2. The Intervertebral Disc

2.1. Background

The IVDs constitute the main joints of the spine and contribute one-third of the total spinal weight (Fig. 1). The intervertebral joint is an amphiarthrosis (semi-mobile joint) that contributes to the key functions of spinal kinematics. Each IVD

has three distinct parts: the NP in the middle; the surrounding Annulus fibrosus (AF), whose collagen fibers are arranged in concentric figure-eight bands that keep the NP in place; and the two vertebral endplates. A crucial characteristic of the IVD is that it receives no vascular or nerve supply [2].

2.2. The Nucleus pulposus and Annulus fibrosus

The NP and AF are difficult to distinguish from each other. However, they have a number of structural, cellular, and molecular differences, which explain their distinctive biomechanical properties (Fig. 2) [3–5]. The AF consists chiefly in a highly structured network of collagen fibers that effectively confines the NP. The NP is composed mainly of proteoglycans and resembles a hydrogel. The nature of the cells found in the AF and NP is another important criterion to distinguish these two tissues. According to an often-used simplification, NP cells are chondrocytic and AF cells fibroblastic [6]. However, studies have cast doubt on the validity of this description, most notably for the NP, and potential specific markers for each cell type are being actively sought. Candidate markers include HIF-1, CD24, Sct, annexin A3, glypican 3, keratin 19, pleiotrophin, collagen type V, MGP, HtrA1, and versican [7–11]. A distinctive feature of the NP is the existence of two cell types whose presence varies over the lifespan [12]. Until adolescence, notochordal cells co-exist with chondrocyte-like cells. The notochordal cells are lost later in life (at 6 months of age in rabbits and 16 years of age in humans) [12]. They may be involved in the initiation of IVD aging and degeneration, and they may exhibit plasticity properties similar to those of mesenchymal stem cells (MSCs) [13].

* Corresponding author.

E-mail address: jerome.guicheux@inserm.fr (J. Guicheux).

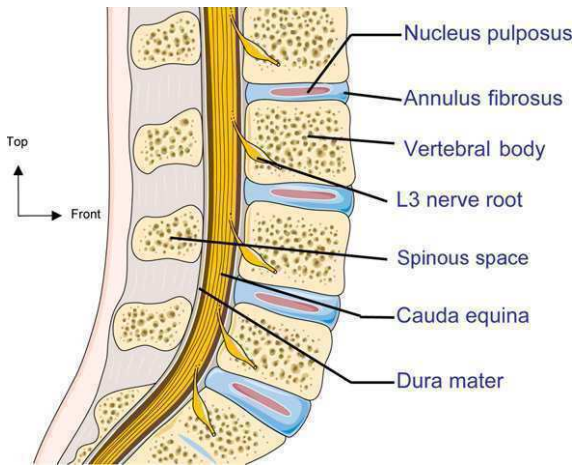


Fig. 1. A sagittal section of the human lumbar spine.

2.3. Metabolic and immunological characteristics of the intervertebral disc

The cells contained in the IVD exhibit metabolic adaptations that compensate for the lack of a blood supply [14]. The cells located at the center of the NP are 8 mm away from the closest capillaries and must, therefore, obtain their nutrients via diffusion. The pH within the IVD ranges from 6.9 to 7.2, reflecting the importance of cell specialization within the IVD [15]. These data are relevant to the pathophysiology of disc disease and to potential therapeutic interventions. Another important characteristic of the NP is its isolation from the immune system, which results in immune privilege. Exposure of the NP to the immune system (for instance, when disc herniation occurs) triggers a strong autoimmune response. This characteristic exists for a small number of tissues (e.g., the thymus, lung, and testis) and may involve a number of molecular mechanisms such as the Fas/Fas-Ligand system [16–18]. It is an important consideration when designing treatment strategies.

The complex structure of the IVD, combined with its distinctive characteristics, constitutes a source of vulnerability. Thus, structural alterations develop with aging. The boundary that separates normal aging from abnormal degeneration is debated within the scientific community. According to the currently accepted definition by Adams and Roughley, disc degeneration

is an aberrant response in which accelerated aging occurs via mechanisms that are beginning to be elucidated [19].

3. Pathophysiology of disc degeneration

Disc degeneration occurs consistently with advancing age. The changes become apparent as early as the second decade of life, although the tempo of progression varies considerably across individuals [20]. Epidemiological data indicate that disc degeneration depends on multiple factors including age, mechanical loading, genetic polymorphisms, infections, and other factors [21]. All these factors lead to changes at the tissue, cellular, and molecular levels.

3.1. At the tissue and cellular levels

As disc degeneration progresses, the boundary between the NP and the AF becomes less well defined. The changes start in the NP, where loss of cells and disorganization of the extracellular matrix (ECM) lead to marked matrix dehydration [19]. Once the AF is involved, the degenerative process becomes irreversible [19]. The loss of cells within the NP largely explains the limited capacity of the IVD for self-healing. Active research is ongoing to elucidate the mechanisms of the cell loss. Preliminary findings point to deficient nutrition of the NP, which may lead to cell loss via apoptotic mechanisms [22,23].

3.2. At the molecular level

The NP cells play a pivotal role in the early stages of disc degeneration. Molecular mechanisms lead to metabolic dysregulation. Catabolism predominates over anabolism [24,25], leading to ECM changes including loss of the water-retaining molecules proteoglycans. The resulting loss in water content [26] causes a decrease in hydrodynamic pressure within the IVD, which affects disc function. This metabolic dysregulation shares similarities with the abnormalities found in osteoarthritis, which is a degenerative disease of the joint cartilage [27]. In osteoarthritis, the cartilage ECM undergoes alterations with loss of proteoglycans. Thus, the anabolic and catabolic factors involved in the two diseases may show similarities. The anabolic factors may include members of the transforming growth factor (TGF) superfamily: transforming growth factor β (TGF- β), bone morphogenetic proteins 2 and 7 (BMP-2 and BMP-7), and CpG island methylator phenotype-1 (CIMP-1) [25]. In parallel, several tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) counteract the ECM alterations. ECM component breakdown is chiefly related to the catabolic enzymes metalloproteinases, which are produced by cells in the NP. Among these enzymes, the most extensively involved may be the matrix metalloproteinases (MMP) 1, 2, 3, 7, 8, and 13 and the A-disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin motifs (ADAMTS) 1, 4, 5, 9, and 15 [25]. The NP cells also produce a number of cytokines and growth factors, such as interleukins (IL) 1 α and β and TNF- α , which regulate NP metabolism in a more or less appropriate manner. However, detailed studies of these compounds, most notably those implicated in catabolic

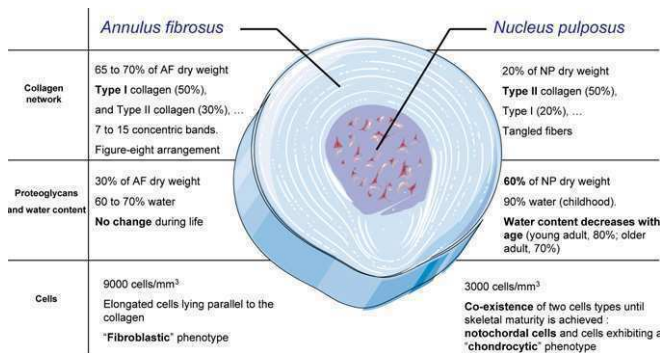


Fig. 2. Characteristics of Annulus fibrosus (AF) and Nucleus pulposus (NP).

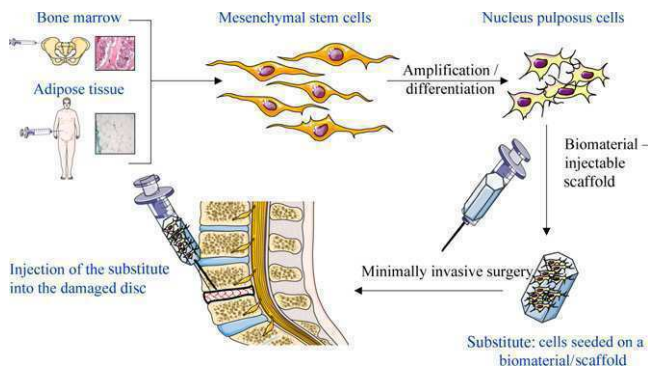


Fig. 3. Intervertebral disc tissue engineering procedure based on mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs are collected from the bone marrow or adipose tissue, amplified in vitro, and cultured with various factors to produce the nucleus pulposus-cell phenotype. The cells are then seeded on a biomaterial, and the substitute thus obtained is implanted into the damaged disc.

events, show considerable variation in the nature of the mediators involved. Thus, ADAMTS-8 is involved in osteoarthritis but remains unchanged in discs exhibiting degenerative damage [28]. Similarly, TIMP-1, -2, and -3 show increased levels of expression in osteoarthritis, whereas TIMP-3 is not increased in disc degeneration [28].

Although the mechanisms involved in disc degeneration are still incompletely elucidated, the available data suggest a number of potential targets for pharmacological therapy. Obstacles to the development of pharmacological treatments include the complexity of the pathogenic mechanisms and the considerable interindividual variations in the initiation of disc degeneration. Multiple treatments will have to be used in combination to achieve a therapeutic effect. Given these difficulties, a promising approach is tissue engineering, in which a substitute replicating the intrinsic and extrinsic characteristics of the NP is grafted into the disc.

4. Intervertebral disc tissue engineering

4.1. Background and general principles

Tissue engineering uses biological and engineering principles to design functional substitutes for damaged tissues [29]. Tissue engineering relies on three main components: cells capable of ensuring tissue repair, a biomaterial or scaffold and cell differentiation conditions that are appropriate for the nature of the target tissue [30]. Fig. 3 shows the main steps of IVDs tissue engineering. The process starts with the collection of MSCs, which can be taken from various body sites. The MSCs are isolated then amplified and/or differentiated using a variety of techniques (growth factors, culturing under hypoxic conditions or in a three-dimensional environment). The MSCs are then seeded into a biomaterial (or scaffold) and the resulting construct is injected into the damaged disc.

4.2. Cells

Three cell types are currently potential candidates for IVD engineering, namely, NP cells, chondrocytes, and MSCs. Each

has advantages and drawbacks. The use of autologous cells decreases the risk of infection and may obviate the need for immunosuppressive therapy in treated patients [31]. Nevertheless, studies of cadaver IVD grafts are under way [32].

Harvesting NP cells from a healthy IVD may lead to unacceptable adverse effects. NP cells from surgical discectomy specimens may be suboptimal, since they are taken from damaged disc tissue, although this method cannot be completely discarded [33].

Joint cartilage chondrocytes are serious candidates for IVD engineering, since they share similarities with NP cells. In addition, the use of joint chondrocytes can benefit from the technological advances and promising results supplied by tissue engineering research into cartilage defect repair [34]. One challenge is the small number of harvested chondrocytes. In addition, the harvesting procedure induces morbidity.

MSCs are currently generating interest for osteoarticular tissue engineering [35]. MSCs can differentiate into various cell types [36] including chondrocytes [30,34] and NP cells [37]. Among the various sources of MSCs, bone marrow and adipose tissue have been extensively investigated [38]. Given the pain and morbidity associated with bone marrow harvesting, adipose tissue stem cells (ATSCs) hold considerable appeal. Adipose tissue collection via liposuction induces little morbidity and provides a large amount of cells. The differentiation capabilities of ATSCs may be comparable to those of bone marrow cells, although several differences have been reported [39].

4.3. Scaffolds

For tissue engineering, the cells are seeded onto a scaffold whose primary objective is to replicate the characteristics of the target-tissue ECM. Many ECM-like scaffolds are available and may deserve consideration for tissue engineering [30]. The nucleus pulposus ECM shares many similarities with the joint cartilage ECM and, consequently, scaffolds developed for cartilage repair may be appropriate for IVD engineering.

Available scaffolds come from various sources. Scaffolds for tissue engineering must exhibit a number of properties including biocompatibility, favorable three-dimensional structure, tissue adhesion, appropriate mechanical strength, injectability (to allow minimally invasive surgery), and biodegradability [30]. Among the scaffolds developed to date, hydrogels meet the criteria required for IVD engineering. Hydrogels used for cartilage repair have produced promising results in animals [34] and deserve consideration for use in IVD engineering.

4.4. Conditions for inducing cell differentiation

The cells seeded on the biomaterial must exhibit characteristics similar to those of the cells normally found in the target tissue. To ensure expression of these characteristics, the cells are exposed to specific culture conditions and morphogenic factors (growth factors, oxygen tension, and mechanical constraints). These factors have been extensively studied, and data from cartilage repair studies can benefit the design of IVD engineering

protocols. A crucial factor for cell phenotype preservation is culturing in a three-dimensional environment (scaffold) [40,41]. Cells grown in single layers consistently undergo dedifferentiation [42]. Bioreactors may be useful for replicating in vivo mechanical stimuli [43].

Among morphogenic factors, growth factor combinations may hold promise. Of special interest are growth factors belonging to the TGF, BMP, cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP), and fibroblast growth factor (FGF) families, as well as insulin-like growth factor-1 (IGF-1) [44]. In addition, hypoxia is generating considerable interest as a morphogenic factor. Growing the cells under hypoxic conditions replicates the oxygen tension values normally found within the target tissue. Thus, hypoxia may promote MSC differentiation [45]. However, the role for tissue engineering in the management of low back pain needs to be defined. IVD tissue engineering is still in its infancy, and further work is needed to lift the remaining obstacles.

5. Role for tissue engineering and current limitations

The treatment of low back pain currently rests on symptomatic measures aimed at ensuring pain relief. Both patients and physicians are impatiently awaiting new treatment approaches for degenerative disc disease, which causes 40% of cases of low back pain. Tissue engineering may prove able to restore normal IVD function. Nevertheless, the stage of the degenerative process may require careful attention. Tissue engineering may be most likely to succeed in early-stage disease [20,31, 46], such as grade II disease in the magnetic resonance imaging-based classification system developed by Pfirrmann et al. [47].

The importance of disease stage emphasizes the need for additional work before clinical applications can be considered. Appropriate patient selection will be crucial. Not all low back pain patients exhibit radiological alterations [48]. Modic 1 disc disease, which was described two decades ago, is of considerable interest for identifying specific markers and valid radioclinical syndromes. Thus, MRI may prove valuable for selecting low back pain patients for tissue engineering [49].

The repair process induced by tissue engineering is confined to the NP. This limited effect may be inadequate, given the complex structure of the IVD. Thus, in advanced-stage disc disease, the AF and endplates may be affected [33]. Further studies are needed to determine the best cell types for use in IVD constructs. The risk of tumor growth must be assessed, most notably after MSC implantation [46].

A major obstacle to research is the lack of good animal models for investigating the treatment of spontaneous or induced disc disease. Studies are addressing this issue, however. Among available models of degenerative disc disease, the most widely used in studies of osteoarticular tissue engineering involve rats, rabbits, and sheep [50,51]. Rabbits share important similarities with humans, including loss of notochordal cells when skeletal maturity is achieved [12] and the development of age-related degenerative disc disease (personal unpublished data). Finally, surgeons are developing appropriate surgical techniques [46]. One promising method is minimally invasive surgery

(e.g., percutaneous injection), which requires the use of injectable scaffolds such as hydrogels.

Tissue engineering involving the implantation of appropriate cells seeded on a scaffold holds promise for ensuring IVD repair. The elucidation of the pathophysiological mechanisms responsible for degenerative disc disease is a major challenge for the scientific community. Another challenge involves anticipating the constraints that will bear on the clinical use of IVD engineering. More specifically, studies will have to identify the target population, develop appropriate minimally invasive surgical techniques, and document the absence of adverse effects related to the implanted cells.

Acknowledgments

We thank the “Société française de rhumatologie”, the “Fondation de l’avenir pour la recherche médicale appliquée”, the “Société française de neurochirurgie”, the “Agence nationale de la recherche” (projet Chondrograft and Scartifold), and the “Fondation Arthritis-Courtin”.

We are grateful to Professor Yves Maugars, Dr Eric Bord, and Olivier Lucas for critically reviewing the manuscript. We are indebted to Servier Medical Art for the illustrations.

References

- [1] O’Halloran DM, Pandit AS. Tissue-engineering approach to regenerating the intervertebral disc. *Tissue Eng* 2007;13:1927–54.
- [2] Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther* 2003;5:120–30.
- [3] Buckwalter JA, Cooper RR, Maynard JA. Elastic fibers in human intervertebral discs. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58:73–6.
- [4] Eyre DR, Muir H. Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *Biochem J* 1976;157:267–70.
- [5] Rannou F, Poiradeau P, Corvol M, et al. Biochimie et biologie du disque intervertébral. *Rev Rhum* 2000;67:214–8.
- [6] Sive JJ, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol Pathol* 2002;55:91–7.
- [7] Lee CR, Sakai D, Nakai T, et al. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J* 2007.
- [8] Ha KY, Koh IJ, Kirpalani PA, et al. The expression of hypoxia inducible factor-1alpha and apoptosis in herniated discs. *Spine* 2006;31:1309–13.
- [9] Risbud MV, Guttapalli A, Stokes DG, et al. Nucleus pulposus cells express HIF-1alpha under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment. *J Cell Biochem* 2006;98:152–9.
- [10] Fujita N, Miyamoto T, Imai J, et al. CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1890–6.
- [11] Sztrolovics R, Grover J, Cs-Szabo G, et al. The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J Orthop Res* 2002;20:257–66.
- [12] Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9:667–77.
- [13] Hunter CJ. The role of notochordal cells in the intervertebral disc. In: *Congress ICRS. Poland: Warsaw*; 2007.
- [14] Richardson CC, Hussain K, Jones PM, et al. Low levels of glucose transporters and K⁺ATP channels in human pancreatic beta cells early in development. *Diabetologia* 2007;50:1000–5.
- [15] Anderson DG, Tannoury C. Molecular pathogenic factors in symptomatic disc degeneration. *Spine J* 2005;5:260S–6S.

- [16] Inui Y, Nishida K, Doita M, et al. Fas-ligand expression on nucleus pulposus begins in developing embryo. *Spine* 2004;29:2365–9.
- [17] Kim KW, Kim YS, Ha KY, et al. An autocrine or paracrine Fas-mediated counterattack: a potential mechanism for apoptosis of notochordal cells in intact rat nucleus pulposus. *Spine* 2005;30:1247–51.
- [18] Kaneyama S, Nishida K, Takada T, et al. Fas ligand expression on human nucleus pulposus cells decreases with disc degeneration processes. *J Orthop Sci* 2008;13:130–5.
- [19] Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* 2006;31:2151–61.
- [20] Roughley PJ. Point of view. *Spine* 2007;32:1310.
- [21] Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Bogduk N, et al. The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. *J Bone Joint Surg Br* 2008;90:1261–70.
- [22] Wang J, Tang T, Yang H, et al. The expression of Fas ligand on normal and stabbed-disc cells in a rabbit model of intervertebral disc degeneration: a possible pathogenesis. *J Neurosurg Spine* 2007;6:425–30.
- [23] Park JB, Chang H, Kim KW. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue. *Spine* 2001;26:618–21.
- [24] An HS, Anderson PA, Hughton VM, et al. Introduction: disc degeneration: summary. *Spine* 2004;29:2677–8.
- [25] Colombini A, Lombardi G, Corsi MM, et al. Pathophysiology of the human intervertebral disc. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:837–42.
- [26] Lyons G, Eisenstein SM, Sweet MB. Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. *Biochim Biophys Acta* 1981;673:443–53.
- [27] Clouet J, Vinatier C, Merceron C, et al. From osteoarthritis treatment to future regenerative therapies of cartilage. *Drug Discovery Today*; 2009; doi:10.1016/j.drudis.2009.07.012.
- [28] Millward-Sadler SJ, Hoyland JA. Comparison of intervertebral disc and articular cartilage. In ICRS, International Cartilage Repair Society. Warsaw: Poland; 2007.
- [29] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–6.
- [30] Merceron C, Vinatier C, Clouet J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering. *Joint Bone Spine* 2008;75:672–4.
- [31] Kalson NS, Richardson S, Hoyland JA. Strategies for regeneration of the intervertebral disc. *Regen Med* 2008;3:717–29.
- [32] Ruan D, He Q, Ding Y, et al. Intervertebral disc transplantation in the treatment of degenerative spine disease: a preliminary study. *Lancet* 2007;369:993–9.
- [33] Kandel R, Roberts S, Urban JP. Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges. *Eur Spine J* 2008;Suppl. 17(4):480–91.
- [34] Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, et al. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 2009;27:307–14.
- [35] Leung VY, Chan D, Cheung KM. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J* 2006;15(Suppl. 3):S406–13.
- [36] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
- [37] Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials* 2008;29:85–93.
- [38] Tapp H, Hanley EN, Patt JC, et al. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008.
- [39] Guilak F, Lot KE, Awad HA, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 2006;206:229–37.
- [40] Vinatier C, Magne D, Weiss P, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005;26:6643–51.
- [41] Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215–24.
- [42] Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, et al. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:62–70.
- [43] Bueno EM, Bilgen B, Barabino GA. Wavy-walled bioreactor supports increased cell proliferation and matrix deposition in engineered cartilage constructs. *Tissue Eng* 2005;11:1699–709.
- [44] de Crombrugge B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:721–7.
- [45] Malladi P, Xu Y, Chiou M, et al. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C1139–46.
- [46] Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease. *Eur Spine J* 2008;Suppl. 17(4):452–8.
- [47] Pfirrmann CW, Metzendorf A, Zanetti M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 2001;26:1873–8.
- [48] Vaccaro A. Disk regeneration. *Orthopedics* 2006;29:1074–5.
- [49] Beaudreuil J, Orsel P. Modic 1 discopathy. *Joint Bone Spine* 2009;76:4–6.
- [50] Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur Spine J* 2008;17:2–19.
- [51] Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned. *Spine* 2004;29:2742–50.

d) Etat de l'art en ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire appliquée au DIV représente encore aujourd'hui une approche expérimentale. Aucun essai en clinique humaine n'a encore eu lieu. Des investigations en clinique humaine, intéressant d'autres domaines, sont cependant menées et en particulier dans les domaines du cartilage articulaire (réparation des défauts cartilagineux), de l'os (traitement des pertes de tissu osseux) et des vaisseaux.

De nombreuses études dont l'objectif était de valider le développement d'une nouvelle matrice ont été publiées. Celles-ci ne feront pas l'objet de ce chapitre. Seules les études s'intéressant à une association matrice-cellules dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du DIV seront traitées. Parmi ces études, celles menées *in vitro* représentent une large majorité.

- Etudes *in vitro* :

Elles ont pour objectif de valider la faisabilité de l'association d'une matrice avec des cellules, d'observer le devenir de ces cellules au sein de la matrice et d'évaluer leur capacité à synthétiser une MEC « cartilagineuse ». Ainsi, de très nombreuses combinaisons ont été testées que ce soit pour les cellules (chondrocytes [380], cellules de l'AF de DIV sains ou dégénérés [381-383], cellules du NP de DIV sains ou dégénérés [384-390], de l'AF et du NP [351, 391-396], des CSM [352, 397]) ou pour les matrices (alginate [393, 395], collagène de type I et II [380-383, 386, 390, 396], chitosan [351, 352, 385, 397], fibrine [391, 392], carboxyméthylcellulose [384]...). Les modes opératoires expérimentaux utilisés présentent d'importantes variations en ce qui concerne le nombre de jours de culture, l'ajout ou non de morphogènes, ou la densité cellulaire d'ensemencement des matrices testées. Dans ce contexte, l'interprétation des résultats et surtout leur comparaison est difficile. Plusieurs points peuvent néanmoins être retenus :

- Le phénotype des cellules est dans la grande majorité des cas maintenu. La matrice remplit la plupart du temps son rôle. En parallèle, la MEC produite est constituée des

molécules classiques de la MEC du DIV et du cartilage articulaire, à savoir du collagène de type II et des PGs [351, 381, 385, 389, 390, 392-395].

- Quelques études ont évalué les propriétés mécaniques de la MEC néo-formé qui montre des similitudes avec celle du tissu natif. Seule une étude relève des propriétés mécaniques inadaptées obtenues avec une matrice à base d'alginate [395] mais il est probable que d'autres résultats également négatifs n'aient pas été soumis à publication.
- L'existence du processus d'hypertrophie et notamment l'expression de collagène de type X a été rarement évaluée. Les quelques résultats disponibles sont contradictoires selon les études [387, 394]. Cette différence pourrait néanmoins être expliquée par le fait que les cellules utilisées par Le Visage et al. [394] sont issues de DIV dégénérés contrairement à Yang et al. [387].
- Seulement deux études, à notre connaissance, ont utilisé des CSM [352, 397]. Ces études présentent des modes opératoires assez similaires. En effet, la matrice utilisée est dérivée du chitosan, les CSM proviennent de moelle osseuse humaine et les conditions de culture et d'ensemencement sont assez superposables. Ces deux études n'avaient cependant pas les mêmes objectifs. Ainsi Dang et al. ont démontré la viabilité cellulaire au sein de la matrice et leur capacité de prolifération. La comparaison de l'activité métabolique des CSM a été réalisée avec des cellules de l'AF et du NP. Elle conclut à une activité métabolique supérieure des CSM. Richardson et al. se sont intéressés essentiellement à la différenciation chondrogénique des CSM. Ils concluent à l'efficacité de cette différenciation au regard de l'augmentation de l'expression de collagène de type II et de PG et à l'absence d'expression de marqueurs ostéogéniques (Phosphatase alcaline et ostéocalcine) et hypertrophiques (collagène de type X).

- Il est très rarement tenu compte de la spécificité phénotypique des cellules du DIV par rapport aux chondrocytes articulaires. Ainsi, l'expression de marqueurs spécifiques comme HIF-1, GLUT-1, MMP-2 et CD24 n'est recherchée que dans une étude [391]. Il faut néanmoins tenir compte du fait que ces marqueurs phénotypiques ont été identifiés la plupart du temps ultérieurement aux études *in vitro*.

Les études *in vitro* ont permis de valider le principe de l'ingénierie tissulaire en associant matrice et cellules. Elles ne permettent cependant pas de prouver l'efficacité de cette approche pour la restauration du tissu discal. C'est l'objectif des études animales qui sont présentées ci-dessous.

- Etudes animales :

Différents points clefs d'une analyse de la littérature peuvent être retenus :

- L'utilisation quasi-exclusive de CSM dans ces études confirme l'intérêt porté à celles-ci par rapport aux autres types cellulaires [331, 333, 346, 398-402].
- Les deux types d'approches, à savoir *ex vivo* et *in vivo*, sont retrouvées. La première est basée sur une différenciation préalable des CSM au cours d'une étape *in vitro*. La seconde est basée sur une différenciation *in situ* des CSM.
- Toutes les études utilisent un modèle animal de dégénérescence induite. Dans la majorité des cas il s'agit du modèle d'aspiration à l'aiguille développé par Kim et al. [173]. Cette technique basée sur l'élimination du NP provoque une dégénérescence au niveau du DIV. Elle constitue la technique de référence actuelle mais elle souffre d'inconvénients. Outre les limites des études animales décrites précédemment, cette technique ne reproduit pas les étapes de mise en place de la dégénérescence et celle-ci semble également peu reproductible. Elle présente néanmoins l'avantage d'être simple et de diminuer la pression discale interne afin de permettre l'injection d'un substitut en milieu confiné.

- Le lapin est l'animal le plus fréquemment utilisé [331, 399, 400, 402, 403]. Ensuite, le rat [398], le chien [346] [404] et le cochon [333, 401] ont été également utilisés.
- Les CSM sont en général isolées de la moelle osseuse [331, 333, 398-402]. Celles isolées du tissu adipeux ont également été testées [346].
- Comme pour les études *in vitro*, les matrices utilisées sont différentes d'une étude à l'autre.
- La viabilité et la prolifération des cellules sont démontrées après injection *in situ*.
- La différenciation *in situ* des CSM est validée sur la base de marqueurs chondrocytaires : agrécane, PGs, collagène de type II, Sox9. Une seule étude, à notre connaissance, s'est intéressée aux marqueurs phénotypiques « spécifiques » (HIF-1 α , GLUT-1, MMP-2) des cellules du NP [399].
- Des études récentes commencent à s'intéresser aux conséquences « macroscopiques » et à la validation de la restauration de l'intégrité discale. Ainsi, la préservation de la hauteur discale et du signal en T2 à l'IRM a été démontrée [333, 346, 398, 400, 404].

Au regard des données ci-dessus, la preuve de concept de l'ingénierie tissulaire est en grande partie réalisée chez le petit animal. Néanmoins, la pertinence des modèles animaux de dégénérescence utilisée soulève quelques interrogations. Actuellement, aucun modèle animal ne reproduit véritablement ce processus de dégénérescence. De plus, les études sont en général de courte durée et utilisent un échantillon de petite taille. Il faut également rappeler la problématique des modèles animaux qui présentent des cellules notochordales au cours de leur vie. Il est difficile d'exclure l'absence d'interactions entre les CSM implantées et ces cellules notochordales résidentes, notamment au regard des études déjà évoquées de différenciation *in vitro* des CSM au contact de ces cellules notochordales. Les résultats des études mettant en œuvre une évaluation des marqueurs spécifiques des cellules du NP doivent être considérés avec attention.

Les données obtenues permettent néanmoins d'envisager cette approche d'ingénierie tissulaire comme prometteuse. Les inconvénients de la thérapie cellulaire ont été gommés en particulier le processus de dédifférenciation des cellules. Le choix de la matrice reste un point de discussion mais des avancées au sein du laboratoire confirment l'intérêt d'utiliser une matrice d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée. Les CSM constituent les principales candidates à une utilisation en ingénierie tissulaire au regard de leurs propriétés de différenciation. Il est néanmoins nécessaire d'envisager des investigations supplémentaires afin d'explorer les deux approches, *in vivo* et *ex vivo*, afin de déterminer laquelle est la plus apte à permettre une restauration de l'intégrité discale. Le choix du modèle animal sera majeur, et l'utilisation combinée de modèles de dégénérescence spontanée et induite sera certainement nécessaire.

4- Place des traitements novateurs dans l'arsenal thérapeutique

Il est indispensable de prendre en compte le stade de la dégénérescence discale afin de situer l'intérêt des différentes stratégies thérapeutiques [25, 341, 405].

L'utilisation des traitements pharmacologiques trouve leur légitimité pour des stades précoces pour lesquels le patient ne présente pas d'invalidité. Dans les stades très tardifs, l'utilisation de l'arthrodèse ou de l'arthroplastie peut rencontrer certains défenseurs. Dans les stades précoces et intermédiaires, aucune solution n'est véritablement proposée et la médecine régénérative peut y trouver toute sa place. Parmi ces traitements novateurs, certains nécessitent la présence de cellules afin d'être efficace. Il s'agit notamment des approches par biothérapie et par thérapie génique (approche *in vivo*). Sans cellules, les facteurs de croissance ne pourront se fixer sur leurs récepteurs et induire leurs effets biologiques. De même, l'absence de cellules rendra inutile l'essai de transfection d'un gène *in situ*. Or, la diminution de la densité cellulaire est un des points clefs de la dégénérescence discale et restreint donc l'utilisation de ces deux thérapies au cours de stades très précoces de dégénérescence discale.

Une autre éventualité est la supplémentation en cellules du DIV dégénéré faisant appel aux approches de thérapie génique (approche *ex vivo*), cellulaire et d'ingénierie tissulaire. Il est en effet facile de comprendre l'intérêt de ces techniques pour la prise en charge de stades intermédiaires de dégénérescence discale. Seule une rupture irréversible de l'AF, risquant de conduire à la fuite des cellules en dehors du tissu, contre-indiquerait l'utilisation de telles stratégies.

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, le choix de la matrice conditionne intrinsèquement le choix du stade de la dégénérescence que l'on souhaite traiter. En effet, les hydrogels naturels, considérés comme plus « souples », peuvent trouver leur place dans des stades précoces de la dégénérescence contrairement aux matrices synthétiques en général plus « dures ». Ces dernières présentent des caractéristiques biomécaniques qui permettent d'envisager de traiter des stades plus tardifs ou la restauration biomécanique de l'architecture discale est primordiale. [349].

Pour proposer ces traitements aux patients, une caractérisation des stades de dégénérescence afin d'orienter le choix des praticiens est indispensable. L'IRM et la classification de Modic seront certainement des outils qui permettront de les définir.

La figure 19 résume la place de chacune des stratégies développées précédemment. Cette figure montre qu'il n'existe actuellement pas une solution unique et que de nombreuses approches sont cohérentes et doivent être explorées.

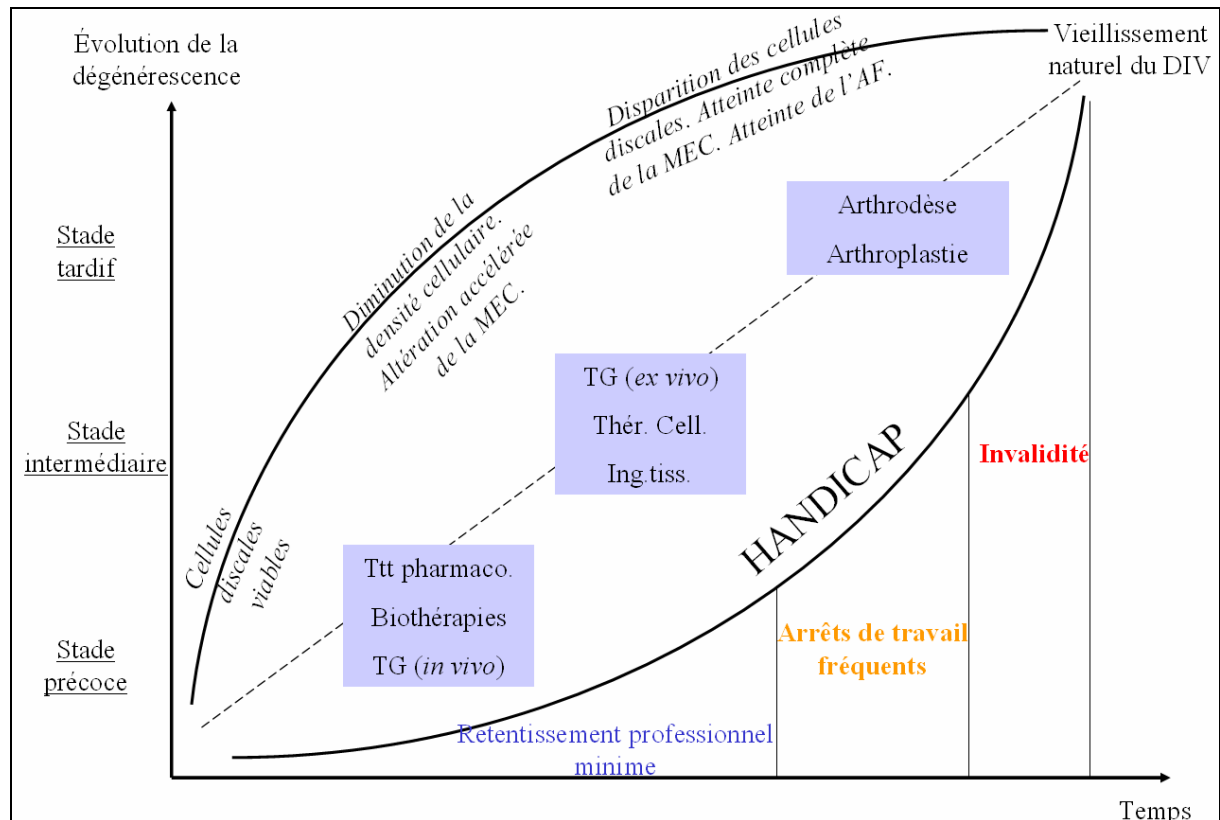


Figure 19 : Place des différentes thérapies pour la prise en charge de la dégénérescence discale. La lombalgie engendre un handicap chez les patients coïncidant avec le stade de gravité de la dégénérescence discale. Ces stades correspondent à une atteinte de la matrice extra-cellulaire. Ils vont conditionner la place de chacune des thérapies.

TG : Thérapie Génique ; Thér. Cell. : Thérapie Cellulaire ; Ing. tiss. : Ingénierie tissulaire ; Tt : Traitement.

L'émergence de ces traitements novateurs depuis une dizaine d'années devrait permettre dans un futur proche de faire bénéficier les praticiens et donc leurs patients de ces technologies. Les résultats obtenus avec les différentes stratégies renseignent sur la faisabilité de chacune d'elles mais dévoilent également des obstacles qui devront être levés afin de répondre à tous les critères de sécurité pour les patients futurs. Par ailleurs, le rapport bénéfice-risque devra être évalué, tout en anticipant sur la place des stratégies l'une par rapport à l'autre, notamment en fonction du stade de la maladie. Il s'agit d'un challenge pour les années à venir. La partie suivante du mémoire apporte nos contributions au développement futur d'une application clinique en ingénierie tissulaire discale.

PARTIE II : Contributions au développement d'une stratégie d'ingénierie tissulaire

I- Contexte

La prise en charge des patients lombalgiques, pour lesquels la douleur serait liée à une dégénérescence discale, se trouve à un tournant. Dans les prochaines années, de nouvelles thérapies devraient être mises à disposition des cliniciens et de leurs patients. Celles-ci mettent en application l'amélioration des connaissances de la dégénérescence du disque intervertébral. Parmi ces nouvelles thérapies, l'ingénierie tissulaire semble présenter un certain nombre d'atouts et représente un réel espoir. Dans ce contexte, ce travail participe au développement d'une telle approche basée sur l'utilisation d'une matrice d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si) et de cellules souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux (CSTA). La figure 20 résume ce projet.

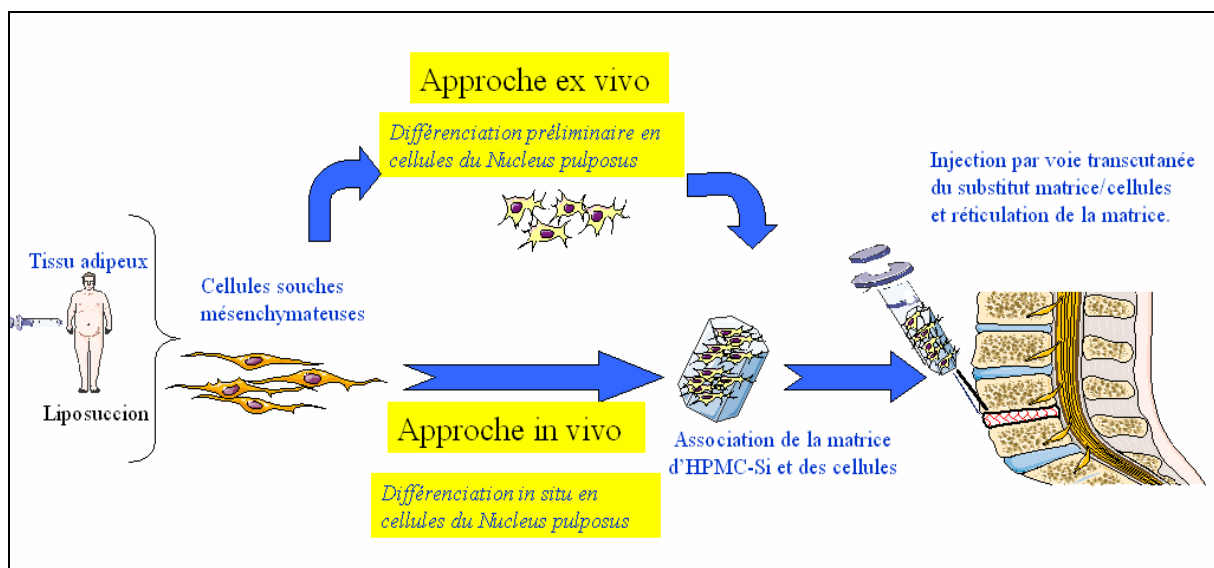


Figure 20 : Ingénierie tissulaire appliquée au traitement de la dégénérescence du disque intervertébral. Le principe est basé sur l'isolement de cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux. Celle-ci vont (approche ex vivo) ou non (approche in vivo) subir une phase de différenciation in vitro sous l'influence de différents facteurs afin d'obtenir des cellules au phénotype proche de cellules du NP. Les cellules sont ensuite associées avec un biomatériau d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si) et injectées par voie transcutanée au sein du disque dégénéré.

La nécessité de mieux comprendre la biologie du tissu discal face à la multiplication des paramètres influant sur son évolution nous a amené à nous intéresser aux caractéristiques des

cellules du NP. Nous nous sommes attachés à définir leur signature phénotypique. Celle-ci aidera à définir vers quel phénotype cellulaire nous devons orienter nos cellules souches mésenchymateuses.

Dans un second temps, la problématique des modèles animaux est apparue primordiale afin d'envisager les premiers essais pré-cliniques. L'analyse de la littérature nous a conforté dans cette idée, au regard de l'absence véritable de modèle de dégénérescence adaptée. Il nous a semblé indispensable pour valider une telle approche d'utiliser deux types de modèles : un modèle de dégénérescence spontanée et un modèle de dégénérescence induite. Notre expérience de l'utilisation du lapin et l'analyse de la littérature nous ont amené à nous intéresser à l'éventualité de l'utiliser comme modèle de dégénérescence spontanée.

Ces étapes préliminaires sont indispensables à la mise en œuvre des premiers essais futurs d'ingénierie tissulaire du disque intervertébral.

II- Caractérisation phénotypique des cellules du disque intervertébral

1- Problématique

Les structures essentielles du DIV sont l'AF, le NP et les plateaux vertébraux. Le NP constitue le premier élément affecté au cours de la dégénérescence discale. Il représente donc un élément clef et la connaissance de sa physiopathologie est primordiale afin d'envisager une application d'ingénierie tissulaire permettant de contrecarrer cette dégénérescence et de restaurer la nature du NP.

Jusqu'à l'adolescence, le NP est constitué de deux types cellulaires [16-18]. Tout d'abord, des cellules notochordales dont l'origine et le rôle sont partiellement élucidés. Ces cellules notochordales disparaissent vers l'âge de 16 ans chez l'homme, âge qui coïncide avec les premiers signes de dégénérescence discale [30].

Le second type cellulaire du NP est représenté par des cellules dont le phénotype est assimilé à celui de chondrocytes [2, 13, 24, 27-29], au regard de leur morphologie ronde ainsi que leur capacité à synthétiser une matrice extra-cellulaire riche en collagène de type II et en agrécane [2, 13, 40]. La réalité de ce phénotype fait néanmoins débat aujourd'hui, en raison de l'existence de différences notables dans l'organisation tissulaire du NP et du cartilage articulaire, notamment de la composition de leur MEC (rapport protéoglycane/collagène chez l'homme : 27/1 pour le NP *versus* : 2/1 pour le cartilage articulaire [41]). Les différences de contraintes mécaniques supportées par ces deux tissus confortent également cette idée. Mais ce sont les études relatives au phénotype des cellules du NP qui permettent de caractériser leurs différences avec les chondrocytes [42, 44, 45, 46, 47]. Différents marqueurs potentiels ont pu être identifiés et ont suggéré que les cellules du NP possèdent leur propre phénotype. Néanmoins ces marqueurs n'ont été que partiellement identifiés. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à certains marqueurs dont l'importance dans la physiopathologie discale

Partie II : Contribution au développement d'une stratégie d'ingénierie tissulaire.

ou articulaire est envisageable : collagènes de type I, II et V, agrécane, MGP et HtrA1. Cette étude a été menée en utilisant des lapins dont les cellules de l'AF, du NP et les chondrocytes articulaires ont été prélevés.

2- Article 3 : Identification de marqueurs phénotypiques spécifiques des cellules du disque intervertébral et des chondrocytes articulaires

J. Clouet, G. Grimandi, M. Pot-Vaucel, M. Masson, H.B. Fellah, L. Guigand, Y. Cherel, E. Bord, F. Rannou, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier. *Rheumatology*, 2009; 48:1447–1450.

Cette étude avait pour objectif d'améliorer nos connaissances relatives à la nature phénotypique des cellules du disque intervertébral en comparant le phénotype des cellules qui le composent (cellules de l'*Annulus fibrosus* et du *Nucleus pulposus*) avec celui des chondrocytes articulaires.

Pour réaliser cette étude, des cellules de l'*Annulus fibrosus* et du *Nucleus pulposus* de lapins ont été isolées, et leur phénotype comparé à celui de chondrocytes articulaires par PCR en temps réel.

Différents transcrits ont été analysés : collagènes de type I (COL1A1), II (COL2A1) et V (COL5A1), agrécane (AGC1), protéine Gla matricielle (MGP) et la sérine peptidase Htra1 (Htra1).

La comparaison des rapports COL2A1/COL1A1 et COL2A1/AGC1 met en évidence des différences notables entre les trois types cellulaires. L'expression du transcrit codant pour le collagène de type V, MGP et Htra1 permet de les définir comme des marqueurs spécifiques du phénotype des cellules du *Nucleus pulposus* et de l'*Annulus fibrosus*.

Cette étude confirme donc que les cellules du *Nucleus pulposus* et de l'*Annulus fibrosus* présentent un phénotype clairement distinct de celui des chondrocytes articulaires. Le collagène de type V, MGP et Htra1 permettent de différencier les cellules du *Nucleus pulposus*, de l'*Annulus fibrosus* et des chondrocytes articulaires.

Article 3

Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes.

J. Clouet, G. Grimandi, M. Pot-Vaucel, M. Masson, H.B. Fellah, L. Guigand, Y. Cherel, E. Bord, F. Rannou, P. Weiss, J. Guicheux, C. Vinatier.

Rheumatology.

2009; 48:1447–1450.

Concise Report

Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes

Johann Clouet^{1,2}, Gaël Grimandi^{1,2}, Marianne Pot-Vaucel¹, Martial Masson¹, Hakim B. Fella¹, Lydie Guigand³, Yan Chere³, Eric Bord⁴, François Rannou⁵, Pierre Weiss¹, Jérôme Guicheux¹ and Claire Vinatier^{1,6}

Objective. The present study was conducted to improve our knowledge of intervertebral disc (IVD) cell biology by comparing the phenotype of nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus (AF) cells with that of articular chondrocytes (ACs).

Methods. Rabbit cells from NP and AF were isolated and their phenotype was compared with that of AC by real-time PCR analysis of type I (COL1A1), II (COL2A1) and V (COL5A1) collagens, aggrecan transcript (AGC1), matrix Gla protein (MGP) and Htra serine peptidase 1 (Htra1).

Results. Transcript analysis indicated that despite certain similarities, IVD cells exhibit distinct COL2A1/COL1A1 and COL2A1/AGC1 ratios as compared with AC. The expression pattern of COL5A1, MGP and Htra1 makes it possible to define a phenotypic signature for NP and AF cells.

Conclusions. Our study shows that NP and AF cells exhibit a clearly distinguishable phenotype from that of AC. Type V collagen, MGP and Htra1 could greatly help to discriminate among NP, AF and AC cells.

KEY WORDS: Intervertebral disc, Nucleus pulposus, Annulus fibrosus, Chondrocyte, Phenotype.

Introduction

Although intervertebral discs (IVDs) are thought to contribute to low-back pain, the cellular and molecular mechanisms that govern the formation, growth, maturation and ageing of IVD are still somewhat poorly documented. IVDs are complex anatomical structures with specific load-bearing organization that provide the spine with flexibility. IVDs are composed of three morphologically distinct regions: the annulus fibrosus (AF) surrounding a central nucleus pulposus (NP) and the inferior and superior cartilage endplates. Cells of the AF are generally considered as fibroblast like, given their elongated and thin shape as well as the synthesis of type I collagen [1–6]. The central NP is a highly hydrated gel-like matrix composed of randomly organized proteoglycans and radially orientated collagen and elastin fibers [1–4]. Given their spherical shape and ability to express type II collagen and aggrecan, the two major markers of chondrocytic cells, cells of the NP are commonly characterized as chondrocyte-like cells [5, 6]. As regards to these characteristics, IVD is traditionally considered as a fibro-cartilaginous tissue with a composition relatively similar to that of articular cartilage. However, considering the embryological origin and the cell biology of IVD, this traditional characterization appears to be an oversimplification and is still a matter of much debate [7]. From the tissue-level perspective, the structure of the proteoglycans differs in both tissues. Functionally, such differences help to endow IVD and

articular cartilage with certain distinct biomechanical properties [8]. In light of these apparent discrepancies at both the histological and biomechanical levels, it seems reasonable to ascertain whether articular cartilage and IVD share any biological features. The present study was conducted to address this issue and to provide new insights into the biology of IVD cells. To this end, the phenotype of IVD cells and articular chondrocytes (ACs) was compared by real-time PCR. We also endeavoured to find specific markers to discriminate each cell type in order to establish a phenotypic signature for IVD cells.

Materials and methods

Materials

Hyaluronidase, trypsin, type II collagenase and isopropanol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Hanks balanced sodium salt (HBSS), DMEM (4.5 g/l glucose), Trizol and Dnase I were obtained from Invitrogen (Paisley, UK). Avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase (AMV-RT), random hexamers and recombinant ribonuclease inhibitor were provided by Promega Corporation (Madison, WI, USA). Brilliant SYBR Green Master Mix was obtained from Stratagene (La Jolla, CA, USA). PCR primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany).

Isolation of articular and IVD cells

Rabbit ACs were isolated from the femoral and humeral head cartilage as described previously [9]. For AF and NP cell isolation, AF and NP tissues were separated and enzymatically digested by 0.05% hyaluronidase in HBSS at 37°C for 10 min, then with 0.2% trypsin for 15 min and with 0.2% type II collagenase for 30 min [7]. The different resuspended rabbit cells were frozen for subsequent real-time PCR analysis.

Reverse transcription and real-time PCR

As previously described [10], total RNA was extracted using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions.

¹INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), U791, Osteoarticular and Dental Tissue Engineering Group, University of Nantes, ²Pharmacie Centrale, University Hospital of Nantes, ³UMR703-INRA, National Veterinary School, Développement et Pathologie du tissu Musculaire, ⁴Department of Neurosurgery, University Hospital of Nantes, Nantes, ⁵INSERM U747, University René Descartes, Paris and ⁶GRAFTYS SAS, Aix en Provence, France.

Submitted 7 April 2009; revised version accepted 22 July 2009.

Correspondence to: Jérôme Guicheux, INSERM U791, Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, University of Nantes, 1-Place Alexis Ricordeau, 44042, Nantes Cedex 1, France. E-mail: jerome.guicheux@inserm.fr

After deoxyribonuclease I digestion, RNA samples (2.5 μ g) were reverse-transcribed using AMV-RT and random primers in a total volume of 30 μ l. cDNA was amplified in a total volume of 25 μ l PCR reaction containing 12.5 μ l of brilliant SYBR Green Master Mix (1 \times) and 30 nM of SYBR green reference dye. The primer sequences used for RT-PCR are as follows: β -actin forward primer: 5'-cccatctacagggctacgc-3'; β -actin reverse primer: 5'-tccttgatgtcccgcacgac-3'; type I collagen (COL1A1) forward primer: 5'-agcagtggtctccaggt-3'; COL1A1 reverse primer: 5'-gccaggtaaccacgttct-3'; type II collagen (COL2A1) forward primer: 5'-acagcaggttcacataccg-3'; COL2A1 reverse primer: 5'-cccactaccggtgtgttc-3'; type V collagen (COL5A1) forward primer: 5'-gtgctggagctggacacc-3'; COL5A1 reverse primer: 5'-caccaagtcgttgaacatga-3'; aggrecan transcript (AGC1) forward primer: 5'-gaggatgcttcaccagt-3'; AGC1 reverse primer: 5'-tgggtacctgacagctga-3'; matrix Gla protein (MGP) forward primer: 5'-tggatataatgctgcttacaatcg-3'; MGP reverse primer: 5'-tttccaatcttattcagctctcg-3'; HtrA serine peptidase 1 (HtrA1) forward primer: 5'-gagtcaccagcagcag-3'; and HtrA1 reverse primer: 5'-gattgacattcggatacca-3'. Real-time PCR was performed in the Mx3000P QPCR System (Stratagene) as previously described [10]. Cycle thresholds were normalized to β -actin in order to verify cDNA quantification differences. Results are reported as fold change in gene expression relative to control conditions.

Statistical analysis

Each experiment was repeated three times. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way analysis of variance followed by a *post hoc* test (Fisher's projected least significant difference) with a statistical significance at $P < 0.05$.

Results

To address the controversy surrounding the phenotype of AF and NP cells, we sought to compare the expression levels of the major chondrocytic markers in freshly isolated AC and IVD cells (Fig. 1). AGC1 mRNA expression was slightly higher in NP and AF cells than in AC, with a 1.4- and 1.6-fold higher expression, respectively (Fig. 1A). In contrast, COL2A1 mRNA

expression was significantly lower in AF and NP cells than in the AC, with a respective 2- and 34-fold decrease (Fig. 1B). The expression of COL1A1 mRNA was 17-fold lower in NP cells than in AC, whereas AF cells demonstrated the highest expression level that was more than 37-fold higher than AC. These results show that AF cells expressed the highest level of AGC1 and COL1A1 mRNA and that AC expressed the highest level of COL2A1 mRNA, whereas NP cells expressed a low level of transcripts coding for COL1A1 and COL2A1 and a high level of AGC1 mRNA.

To understand the comparison between the phenotype of IVD cells and AC better, we also expressed our data as a ratio of COL2A1/COL1A1 and COL2A1/AGC1 mRNA expression (Fig. 1D and E). The COL2A1/COL1A1 ratio was high for AC (1790) and for NP cells (930), indicating that COL2A1 mRNA expression largely predominates over that of COL1A1. On the contrary, AF cells exhibited a COL2A1/COL1A1 ratio of approximately 26, indicating that the expression of COL2A1 in AF cells was also predominant but to a significantly lesser extent. The ratio of COL2A1/AGC1 mRNA expression was about 1090 for AC and 370 for AF cells, indicating the predominance of COL2A1 mRNA expression over that of AGC1. On the contrary, NP cells exhibited a very low COL2A1/AGC1 ratio (23), showing that AGC1 was significantly higher in NP cells as compared with AF cells and AC.

To improve the discrimination and the characterization of the three cells types, we sought to identify several complementary markers that may have a differential expression pattern in AC and IVD cells. The expression of transcripts coding for COL5A1, the MGP and HtrA1 was thus evaluated and compared by real-time PCR.

Our results show that COL5A1 was predominantly expressed in AF cells, whereas it was barely detectable in AC and NP cells (Fig. 2A). As expected, we found a high expression level of MGP in AC. Surprisingly, AF cells showed only slightly detectable expression levels of MGP, whereas NP cells expressed undetectable levels of MGP transcripts (Fig. 2B). Finally, IVD cells exhibited a high level of HtrA1 mRNA expression as compared with AC (Fig. 2C). These results suggest that COL5A1 may be a potential marker for AF cells, whereas NP cells could be characterized by a high expression of HtrA1 and a lack of MGP expression.

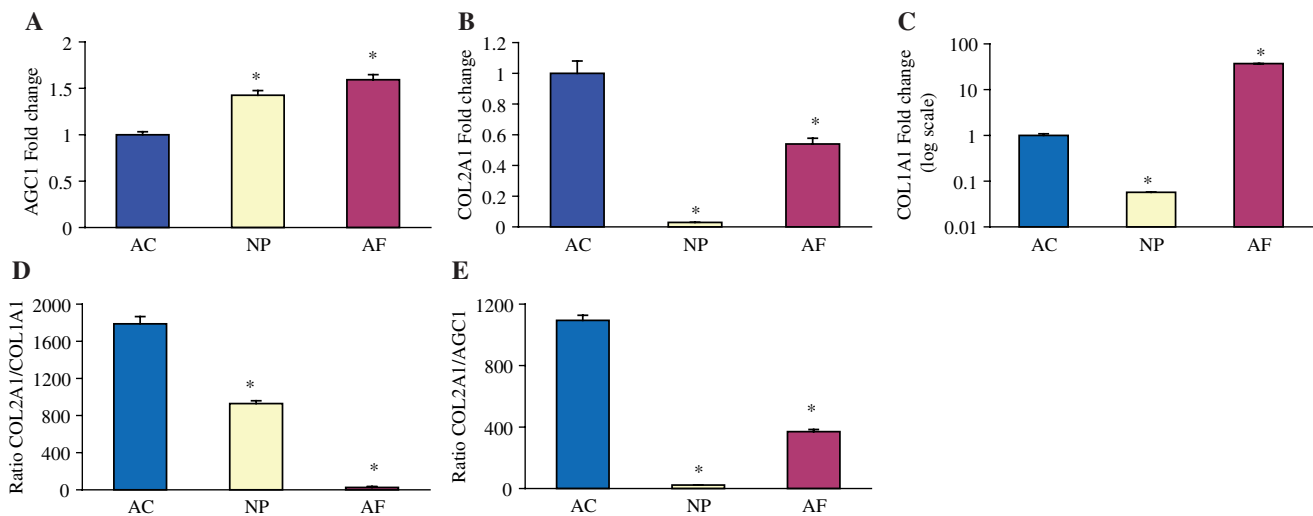


FIG. 1. Phenotypic characterization of ACs, AF cells and NP cells. Total RNA was purified from freshly isolated AC, NP and AF cells. Real-time PCR analysis for aggrecan (AGC1) (A), type II collagen (COL2A1) (B) and type I collagen (COL1A1) (C) was performed as described in the 'Materials and methods' section. Results are reported as fold change in gene expression relative to AC. For (D) and (E), results are reported as ratio of type II collagen to type I collagen mRNA expression (COL2A1/COL1A1) and ratio of type II collagen to aggrecan mRNA expression (COL2A1/AGC1). * $P < 0.05$ compared with AC.

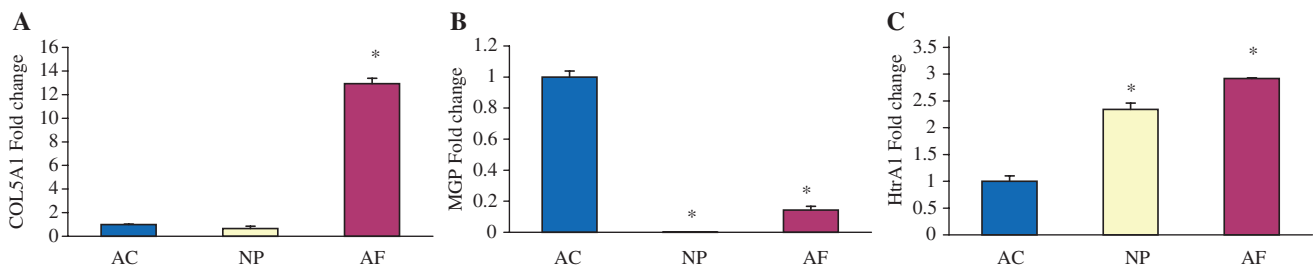


FIG. 2. Type V collagen, MGP and HtrA1 expression in AC, NP and AF cells. Total RNA was purified from freshly isolated AC, NP and AF cells. Real-time PCR analysis for type V collagen (A), MGP (B) and HtrA1 (C) was performed as described in the 'Materials and methods' section. Results are reported as fold change in gene expression relative to AC. * $P < 0.05$ compared with AC.

Discussion

Increasing attention has been paid to the regeneration of functional tissue by cell therapy and/or tissue engineering, particularly for the NP, the primary structure affected in the degenerative IVD process [11]. As a prerequisite to the development of tissue engineering strategies, it appears crucial to generate basic knowledge regarding the biology and physiopathology of the targeted tissues. Particularly noticeable with IVD, the lack of molecular and cellular data mean that IVD tissue engineering is a huge challenge. To address this issue, the objectives of this study were to obtain new insights into the phenotypic characterization of AF and NP cells. An over-simplification [5, 6, 12, 13] has, however, attributed a phenotype to AF and NP cells which is close to that of fibroblasts and chondrocytes, respectively. On the one hand, AF and NP cells do not share a common embryological origin, making it difficult to assume a common phenotype. Cells from the AF and AC are derived from the mesoderm, whereas cells of the NP originate from the notochord [14]. On the other hand, the histological organization of IVD and its biomechanical properties are quite different from those of articular cartilage. It therefore seems reasonable to speculate that tissular adaptation to the mechanical constraints in IVD and articular cartilage leads to a different qualitative composition and cell phenotype.

To investigate the phenotype of rabbit IVD cells, the expression of the main chondrocytic markers was compared between freshly isolated AC and IVD cells. The supposedly chondrocyte-like phenotype of the NP cells was confirmed by the expression of type II collagen and aggrecan mRNA, whereas AF cells exhibited a fibroblastic phenotype indicated by the predominant expression of type I collagen. Nevertheless, type II, type I collagen and type II collagen/aggrecan ratios for AC, NP and AF cells were quite different, thereby indicating that NP cells exhibit an aggrecan-like phenotype in contrast to AC which exhibit a collagen-like one. Our histological analysis (data not shown) confirms that rabbit AF is a lamellar collagen-rich tissue containing GAG, whereas NP is a GAG-rich tissue containing type II collagen. Both tissues exhibit a histological organization quite similar to that of human IVD [15, 16].

In order to pursue the clarification of IVD cell phenotype, we were also interested in finding phenotypic markers able to discriminate the three cell types. As a result, the expression of type V collagen, a fibrillar collagen, was evaluated. The presence of this collagen has been previously suggested in articular cartilage and IVD [4, 12, 15, 17], but without discrimination between AF and NP cells. Here we found that the expression of type V collagen was drastically higher in AF cells compared with the other cells. Consequently, these data highlight type V collagen as a potential marker for AF cells that could, in addition to type I collagen, help improve the characterization of these cells.

Articular cartilage and IVD are both non-calcified tissues in which the mineralization process is likely to be tightly controlled. In articular cartilage, two inhibitors of calcification are involved in the control of mineralization: MGP and HtrA1 [18, 19]. Given

the similarities between articular cartilage and IVD, we compared the expression of MGP and HtrA1 in both these tissues. As expected, our results showed an intense expression of MGP in ACs, whereas surprisingly MGP expression was barely detectable in AF cells and absent in NP cells. These results confirm those of Lee *et al.* [20] obtained in rats of a similar age. Contrary to the articular cartilage, the absence of calcification in the NP probably cannot be attributed to MGP. Interestingly, NP and AF cells showed a higher level of HtrA1 expression as compared with AC. This result led us to hypothesize that, although MGP is probably an inhibitor of calcification in articular cartilage, HtrA1 could be a potential inhibitor of IVD mineralization. Additional experiments must be performed to conclude on the role of HtrA1 in the control of IVD calcification, such as in age-dependent degenerative processes. Substantial age-related changes could be investigated in our rabbit model and compared with those obtained in rats by Lee *et al.* [20]. Lee *et al.* reported an increased expression of MGP in NP cells of aged rats. The potential effect of age on HtrA1 expression has not yet been described but should be evaluated.

In addition, given the similarities between the physiopathology of OA and disc degeneration and the putative role for MGP and HtrA1 in OA [19], the evolution of MGP and HtrA1 expression during age-dependent IVD degeneration deserves further consideration [19, 21].

With respect to the identification of discriminating markers for IVD cells and ACs, it remains to be clarified whether type V collagen, MGP and HtrA1, together with CD24 [22], HIF-1 α [23–25], GLUT-1, MMP-2 [25], annexin A3, glypican 3, keratin 19, pleiotrophin [20] and versican [26] could help piece together the puzzle of NP cell phenotype.

In conclusion, our study provides new insight into the IVD cell phenotype and shows certain similarities between AC and IVD cells. However, on the basis of type I, II and V collagen as well as aggrecan, MGP and HtrA1, we were able to propose a phenotypic signature for IVD cells. This phenotypic signature could become instrumental in monitoring and potentially triggering mesenchymal stem cell differentiation towards IVD cells.

Rheumatology key messages

- NP cells are chondrocyte-like cells.
- MGP, HtrA1 and type V collagen are discriminating markers for IVD cells.
- The phenotypic signature of IVD cells is instrumental for tissue engineering.

Acknowledgements

J.C. received a fellowship from the University Hospital of Nantes. The authors also gratefully acknowledge the assistance of Olivier Gauthier and Joanna Ashton-Chess for critical reading of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from INSERM, 'Société Française de Rhumatologie', 'Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée-étude ET8-451' and 'Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés'.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

References

- Buckwalter JA, Cooper RR, Maynard JA. Elastic fibers in human intervertebral discs. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58:73–6.
- Eyre DR. Biochemistry of the intervertebral disc. *Int Rev Connect Tissue Res* 1979;8:227–91.
- Oegema TR Jr. Biochemistry of the intervertebral disc. *Clin Sports Med* 1993;12:419–39.
- Rannou F, Corvol MT, Hudry C *et al.* Sensitivity of annulus fibrosus cells to interleukin 1 beta. Comparison with articular chondrocytes. *Spine* 2000;25:17–23.
- Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* 2006;31:2151–61.
- Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ *et al.* Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model. *Spine* 2002;27:1291–6.
- Poiraudeau S, Monteiro I, Anract P *et al.* Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells. Comparison with cartilage cells from the same animals. *Spine* 1999;24:837–44.
- Iatridis JC, Weidenbaum M, Setton LA, Mow VC. Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc. *Spine* 1996;21:1174–84.
- Magne D, Julien M, Vinatier C *et al.* Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology. *Bioessays* 2005;27:708–16.
- Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A *et al.* An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:1259–67.
- Kalson NS, Richardson S, Hoyland JA. Strategies for regeneration of the intervertebral disc. *Regen Med* 2008;3:717–29.
- Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther* 2003;5:120–30.
- Anderson DG, Risbud MV, Shapiro IM, Vaccaro AR, Albert TJ. Cell-based therapy for disc repair. *Spine J* 2005;5(Suppl. 6):297S–303S.
- Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis. *Exp Cell Res* 1999;246:129–37.
- An HS, Anderson PA, Haughton VM *et al.* Introduction: disc degeneration: summary. *Spine* 2004;29:2677–8.
- Eyre DR, Muir H. Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *Biochem J* 1976;157:267–70.
- Wachsmuth L, Soder S, Fan Z, Finger F, Aigner T. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol* 2006;21:477–85.
- Luo G, Ducey P, McKee MD *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78–81.
- Canfield AE, Hadfield KD, Rock CF, Wylie EC, Wilkinson FL. Htra1: a novel regulator of physiological and pathological matrix mineralization? *Biochem Soc Trans* 2007;35:669–71.
- Lee CR, Sakai D, Nakai T *et al.* A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J* 2007;16:2174–85.
- Jubeck B, Gohr C, Fahey M *et al.* Promotion of articular cartilage matrix vesicle mineralization by type I collagen. *Arthritis Rheum* 2008;58:2809–17.
- Fujita N, Miyamoto T, Imai J *et al.* CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1890–6.
- Risbud MV, Guttapalli A, Stokes DG *et al.* Nucleus pulposus cells express HIF-1alpha under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment. *J Cell Biochem* 2006;98:152–9.
- Ha KY, Koh IJ, Kirpalani PA *et al.* The expression of hypoxia inducible factor-1alpha and apoptosis in herniated discs. *Spine* 2006;31:1309–13.
- Rajpurohit R, Risbud MV, Ducheyne P, Vresilovic EJ, Shapiro IM. Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2. *Cell Tissue Res* 2002;308:401–7.
- Sztrölovics R, Grover J, Cs-Szabo G *et al.* The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J Orthop Res* 2002;20:257–66.

3- Discussion

Cette première étude a permis de caractériser la nature du tissu discal de lapin et de le comparer aux connaissances disponibles chez l'homme. L'analyse de l'expression des transcrits montre que :

- Le NP est un tissu essentiellement agrécanique.
- L'expression des transcrits qui codent pour des collagènes est confirmée au niveau des cellules de l'AF et du NP mais les types de collagènes présents sont différents. Le transcrit du collagène de type II est essentiellement exprimé par les cellules du NP contrairement aux cellules de l'AF qui expriment essentiellement le transcrit du collagène de type I.

Ces données obtenues au niveau des transcrits ont été confirmées par une étude histologique. Les structures du DIV chez le lapin apparaissent superposables aux données de la littérature chez l'homme. Plus en détails, la coloration au bleu alcian confirme la présence de protéoglycanes au niveau du NP. Un gradient de concentration déjà décrit est observé entre l'AF externe et le NP [17]. La coloration au trichrome de Masson apporte des éléments de réponse sur la distribution des collagènes sulfatés. Ceux-ci sont essentiellement concentrés au niveau de l'AF. Un gradient contraire à celui observé pour les PG est observé avec une concentration majeure de collagène au niveau de l'AF externe. Un immunomarquage pour le collagène de type II a été réalisé et permet de démontrer sa présence essentiellement au niveau de l'AF interne et du NP. Des difficultés à la mise au point d'un immunomarquage pour le collagène de type I ont été rencontrées et ne permettent pas d'apporter d'élément de réponse sur sa distribution.

Ce travail contribue également à l'identification de nouveaux marqueurs des cellules du NP, et des cellules de l'AF. Ainsi, l'expression en collagène de type V, essentiellement retrouvée au niveau des cellules de l'AF, permet de les distinguer des cellules du NP et des

chondrocytes articulaires. Quant aux cellules du NP, l'analyse de l'expression de deux inhibiteurs de minéralisation permet de les distinguer des chondrocytes articulaires. Ainsi, les cellules du NP expriment essentiellement HtrA1 contrairement aux chondrocytes articulaires qui expriment essentiellement MGP. L'absence d'expression de MGP par les cellules du NP constitue elle-même un marqueur de leur phénotype. Ce résultat avait déjà été évoqué dans un travail de Lee et al. [46] mené sur le rat et qui rapportait une très faible expression de MGP. La simplification couramment réalisée d'apparenter le phénotype des cellules du NP à des chondrocytes articulaires a donc de plus en plus de mal à être défendue.

Ces données ouvrent également la voie à de nouvelles recherches sur les modalités de contrôle de la minéralisation au sein du DIV. En effet, les acteurs menant au contrôle de ce processus de minéralisation semblent être différents selon le tissu. Ainsi, des investigations supplémentaires devront être menées afin de définir le rôle précis de chacun. Celles-ci devraient permettre d'apporter de nouvelles connaissances sur l'importance du maintien de la non-minéralisation du DIV et sur son rôle dans le processus de dégénérescence.

A part MGP, qui a déjà été évoqué dans une étude précédente [46], HtrA1 et le collagène de type V constituent donc deux nouveaux marqueurs potentiellement spécifiques des cellules du NP et de l'AF. Ils s'ajoutent à la liste des autres marqueurs publiés dans la littérature [42, 44, 45, 46, 47-51] et démontrent bien la particularité du phénotype des cellules discales. La grande majorité de ces études, y compris la nôtre, a été réalisée chez l'animal avec les inconvénients que cela comporte pour permettre une transposition à l'homme [42, 45, 46, 48-51]. En revanche, la pertinence des résultats obtenus à partir de prélèvements humains doit également être modérée. En effet, ces prélèvements sont issus de disques intervertébraux « pathologiques » (dissectomie par hernie discale) [42, 44] ou de cadavres [47, 48]. Une seule étude utilise des disques intervertébraux humains prélevés au décours d'une intervention pour scoliose et qu'il est donc possible de considérer comme un prélèvement sain [50]. Afin de lever le doute sur le réel intérêt de tous les marqueurs proposés, l'obtention de prélèvements

« sains » humains sera indispensable. Dans ce contexte, nous avons obtenu l'autorisation de l'Agence de Biomédecine afin d'obtenir des prélèvements de disques intervertébraux chez des patients en mort cérébrale qui ont accepté le don d'organes. Actuellement, deux prélèvements ont été obtenus et ont permis d'obtenir des disques intervertébraux faiblement dégénérés (grade II selon la classification de Thompson). Après collecte de prélèvements supplémentaires, à partir d'âges différents de patients, une étude par puce à ADN sera menée afin de vérifier la pertinence des marqueurs identifiés précédemment et en identifier potentiellement de nouveaux.

Au cours de ce travail, seules les données qui comparent les chondrocytes articulaires avec les cellules du NP et de l'AF ont fait l'objet d'une publication. Des données supplémentaires sont à notre disposition et permettent de faire une comparaison avec le phénotype de chondrocytes nasaux. La figure 21 résume les résultats obtenus et montre l'existence de profils d'expression différents entre les chondrocytes nasaux, articulaires, les cellules du NP et de l'AF. Ces différences permettent de mettre en avant l'influence des contraintes mécaniques subies par un tissu. En effet, le cartilage nasal subit très peu de contraintes mécaniques en comparaison du cartilage articulaire. De même, les forces appliquées physiologiquement sur un cartilage articulaire sont différentes de celles appliquées sur un disque intervertébral. Ces variations biomécaniques suggèrent des profils phénotypiques distincts des cellules selon le tissu cartilagineux. Une autre explication à l'existence de différences phénotypiques entre les différents types cellulaires, peut également être reliée à l'origine embryologique différente des cartilages : notochorde pour le NP, mésodermique pour le cartilage articulaire et crête neurale pour le cartilage nasal.

Grâce à ce travail la nature du disque intervertébral et des cellules qui le constituent, chez le lapin, a été définie. L'existence de points communs avec l'homme permet d'envisager l'utilisation du lapin comme modèle animal pour des investigations futures. Il sera nécessaire,

au préalable de valider l'existence d'une dégénérescence discale chez le lapin selon des processus similaires à ceux observés chez l'homme. Il s'agit du sujet du travail abordé ci-après.

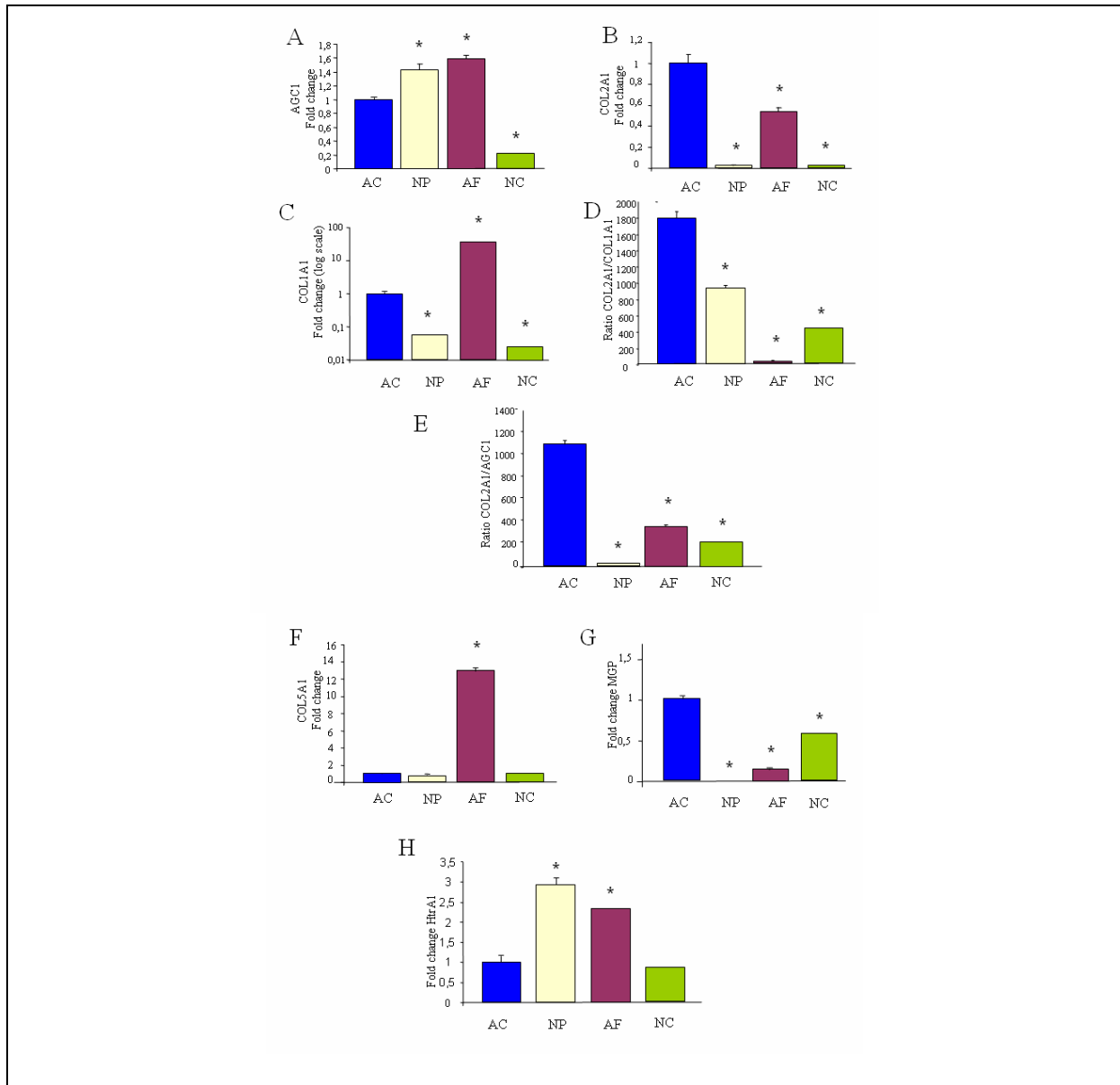


Figure 21 : Analyse phénotypique des chondrocytes nasaux, des cellules du Nucleus pulposus et de l'Annulus fibrosus en comparaison des chondrocytes articulaires chez le lapin. A : agrécan (AGC1), B : collagène de type II (COL2A1), C : collagène de type I (COL1A1), D : ratio collagène de type II sur collagène de type I (COL2A1/COL1A1), E : ratio collagène de type II sur agrécan (COL2A1/AGC1, F : collagène de type V (COL5A1), G : protéine Gla matricielle (MGP), H : HtrA1. * $p < 0.05$ comparé aux chondrocytes articulaires. AC : chondrocytes articulaires, NP : cellules du Nucleus pulposus, AF : cellules de l'Annulus fibrosus, NC : Chondrocytes nasaux.

III- Modèle animal de dégénérescence discale spontanée

1- Problématique

Avant d'envisager son utilisation en clinique humaine, toute nouvelle approche thérapeutique, et notamment celle d'ingénierie tissulaire, doit respecter des étapes validant sa faisabilité et évaluant son rapport bénéfice-risque. Depuis longtemps, ces étapes sont réglementées pour la mise sur le marché d'un médicament et peuvent-être appliquées à l'ingénierie tissulaire. En effet, depuis 2007, le contexte réglementaire a tranché sur le statut de ces produits. Le nouveau règlement CE/1394/2007 définit le produit issu de l'ingénierie tissulaire comme un médicament de thérapie innovante (ou MTI) qui doit faire l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché, au même titre que les médicaments. En parallèle, un cadre réglementaire très complet en ce qui concerne le développement de MTI portant sur les normes de qualité et de sécurité relatives à l'utilisation de tissus et de cellules humaines existe d'ores et déjà (directive 2004/23/CE). Dans ce contexte, le développement d'une approche d'ingénierie tissulaire doit respecter une succession d'étapes, pré-cliniques dans un premier temps puis cliniques. Le caractère « invasif » d'une telle stratégie conduit à privilégier les étapes pré-cliniques. En effet, il apparaît hautement improbable qu'un essai de phase I, mené sur des volontaires sains, puisse être envisagé.

Au regard de la place importante qui sera donnée aux résultats des essais pré-cliniques, avant une application potentielle en clinique humaine, les résultats obtenus au cours d'expérimentations animales se doivent d'être les plus informatifs possibles. Le choix du modèle animal est donc primordial. Parmi les modèles animaux, deux catégories sont couramment décrites :

- Les modèles naturels ou « spontanés » : ces animaux possèdent une maladie présente naturellement et identique à des maladies ou affections humaines.

- Les modèles expérimentaux ou « induits » : chez ces animaux, l'expérimentateur reproduit expérimentalement une affection ou une maladie.

L'intérêt de ces deux catégories de modèles animaux se complète et leur utilisation successive pour valider l'efficacité d'une approche d'ingénierie tissulaire est souhaitable.

Parmi les modèles expérimentaux aucun ne semble véritablement reproduire le processus de la dégénérescence discale. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement, au moment de discuter les perspectives de ce travail. En ce qui concerne les modèles spontanés, ceux disponibles sont essentiellement de petite taille (rat des sables, rat et souris transgéniques). Cette petite taille risque cependant de rendre difficile l'injection du médicament issu de l'ingénierie tissulaire. Nous nous sommes donc intéressés à un animal, le lapin, souvent utilisé dans les études et notamment pour la mise en œuvre d'une dégénérescence induite par aspiration à l'aiguille. Le processus de dégénérescence spontanée de cette espèce animale a été étudié. Le rachis de lapins d'âges croissants a été analysé par imagerie (IRM, radiographie) et histologie. En parallèle, une étude du phénotype des cellules du DIV a été menée.

2- Article 4 : Caractérisation du vieillissement précoce du disque intervertébral chez le lapin par corrélation entre l'IRM, l'histologie et l'analyse phénotypique.

J. Clouet, M. Pot-Vaucel, C. Vinatier, M. Masson, J. Lesoeur, B.H. Fellah, O. Gauthier, M. Fusellier, Y. Chérel, Y. Maugars, G. Grimandi, J. Guicheux. Spine, Soumis.

La présente étude a été menée afin de répondre à un double objectif : est-il envisageable d'utiliser le lapin (i) comme un modèle pertinent pour fournir de nouvelles connaissances dans le processus de vieillissement et de dégénérescence (au niveau cellulaire et tissulaire) du disque intervertébral (DIV) et (ii) représente-t'il un outil approprié pour étudier l'efficacité de l'ingénierie tissulaire appliquée au DIV.

Des DIV lombaires de lapins d'âges croissants (1, 6 et 30 mois) ont été comparés par IRM (séquence en T2) et analyse histologique en utilisant la classification de Pfirrmann et le score de Boos respectivement. En parallèle, l'expression des transcrits codant pour les collagènes de type II (COL2A1), I (COL1A1), l'agrécan (AGC1), la Matrix Metalloprotéinase 13 (MMP13), la Bone Morphogenetic Protein (BMP2), la protéine Gla matricielle (MGP) et p21 au sein des cellules du *Nucleus pulposus* par PCR en temps réel a été analysée.

Les résultats de l'IRM révèlent une augmentation précoce, âge-dépendant, du grade de Pfirrmann. Le score histologique de Boos est également augmenté, ce qui confirme les changements tissulaires observés à l'IRM en fonction de l'âge. L'analyse des transcrits montre une diminution significative de l'expression pour le COL2A1 et l'AGC1. Inversement, l'expression des COL1A1, MMP-13, BMP-2, MGP et p21 est significativement plus élevée dans les cellules du *Nucleus pulposus* de lapins âgés.

Partie II : Contribution au développement d'une stratégie d'ingénierie tissulaire.

Notre étude montre la pertinence du lapin en tant que modèle de vieillissement précoce du DIV, en corrélant l'altération tissulaire observée par IRM et l'histologie, aux changements cellulaires mesurés par l'analyse phénotypique. Ces données font du lapin un modèle pour acquérir de nouvelles connaissances sur les mécanismes moléculaires qui gouvernent la dégénérescence discale et pour le considérer comme un outil adéquat pour caractériser l'efficacité d'une approche d'ingénierie tissulaire.

Article 4

Characterization of the early aging of intervertebral disc by correlation between MRI, histology and gene expression in rabbit.

J. Clouet, M. Pot-Vaucel, C. Vinatier, M. Masson, J. Lesoeur, B.H. Fellah, O. Gauthier, M.
Fusellier, Y. Chérel, Y. Maugars, G. Grimandi, J. Guicheux.

Spine.
Soumis.

Editorial Manager(tm) for Spine Journal
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Characterization of the early aging of intervertebral disc by correlation between MRI, histology and gene expression in rabbit.

Article Type: Basic Science

Keywords: Intervertebral disc / Degeneration / Aging / Animal model / Rabbit

Corresponding Author: Pr jerome guicheux, Pr

Corresponding Author's Institution: INSERM U791 - LIOAD

First Author: Johann CLOUET

Order of Authors: Johann CLOUET; Marianne POT-VAUCEL; Claire VINATIER; Martial MASSON; Julie LESOEUR; Borhane Hakim FELLAH; Olivier GAUTHIER; Marion FUSELLIER; Yan CHEREL; Yves MAUGARS; Gael GRIMANDI; jerome guicheux, Pr

Characterization of the early aging of intervertebral disc.

1 Characterization of the early aging of intervertebral disc by correlation between MRI,
2 histology and gene expression in rabbit.

3 Johann CLOUET*^{1,2,3}, Marianne POT-VAUCEL*^{1,2,4}, Claire VINATIER^{1,2,8}, Martial
4 MASSON^{1,2}, Julie LESOEUR^{1,2}, Borhane Hakim FELLAH^{1,2,5}, Olivier GAUTHIER^{1,2,5},
5 Marion FUSELLIER^{1,2,6}, Yan CHEREL^{2,7}, Yves MAUGARS^{2,4}, Gaël GRIMANDI^{1,2,3} and
6 Jérôme GUICHEUX^{1,2}

7 *Both authors contributed equally to this work.

8 1 INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) U791, LIOAD, Group
9 Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology (STEP), University of Nantes, Nantes F-
10 44042, France.

11 2 PresUNAM, University of Nantes, Nantes, France.

12 3 Department of Pharmacy, University Hospital of Nantes, Nantes F-44093, France.

13 4 Department of Rheumatology, University Hospital of Nantes, Nantes F-44093, France.

14 5 Department of experimental Surgery, CRIP-VC, National Veterinary School (ONIRIS),
15 Nantes F-44307, France.

16 6 Department of Imagery, CRIP-VC, National Veterinary School (ONIRIS), Nantes F-44307,
17 France.

18 7 INRA UMR703, National Veterinary School (ONIRIS), Nantes F-44307, France.

19 8 Graftys SAS, Aix en Provence, France.

20

21 Corresponding author: Prof Jerome Guicheux, Ph. D.
22 INSERM U791
23 School of Dental Surgery
24 1-Place Alexis Ricordeau
25 44042, Nantes Cedex 1
26 France
27 Phone: +33-(0)2-40-41-29-19
28 Fax: +33-(0)2-40-08-37-12
29 Email: jerome.guicheux@inserm.fr

1 Acknowledgments

2 This study was supported by grants from Société Française de Rhumatologie, Fondation de
3 l’Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée (ET8-491 and ET9-541), Agence Nationale
4 de la Recherche AAP TeCSAN (chondrograft project), Agence de la Biomédecine, Institut
5 National de la Santé et de la Recherche Médicale, région des Pays de la Loire (BIOREGOS
6 project), and the University Hospital of Nantes.

7 The authors also gratefully acknowledge the technical assistance of Pierre Weiss, Maïthe
8 Gatus-Perré, Pierre Monmousseau, Patrice Roy, Stéphane Madec, Dominique Rouleau and
9 Christian Raphael ,as well as Joanna Ashton-Chess for the critical reading of the manuscript.
10 Finally, JC is particularly grateful to his young son Edgar, for all the sleepless nights that
11 helped the preparation of this manuscript.

12

13

14

15 Disclosure statement

16 The authors have declared no conflict of interest.

1 **ABSTRACT**

2 **Study design** A longitudinal study of New Zealand White rabbits from increasing ages was
3 performed. Tissular changes were investigated by serial magnetic resonance imaging (MRI)
4 and histological stainings. Cellular changes were analyzed by transcripts expression assessed.

5 **Objective** The present study was conducted to address whether the rabbit could be considered
6 (i) as a valuable model to provide new insights into the early tissular and cellular processes of
7 intervertebral disc (IVD) aging and degeneration and (ii) as an appropriate tool to investigate
8 the efficacy of IVD cell-based biotherapies.

9 **Summary of background data** The data about processes of IVD aging and degeneration
10 exhibit similarities. This study shows a correlation between tissular and cellular changes
11 during these two processes. Highlights on osteoarthritis and IVD degeneration have
12 characterized.

13 **Methods** Lumbar IVD from rabbits with increasing ages (1, 6 and 30 month-old) were
14 compared by MRI (T2ws intensity) and histological observation using Pfirrmann's grading
15 and Boos' scoring respectively. In parallel, the expression patterns of transcripts (COL2A1,
16 AGC1, COL1A1, MMP13, BMP2, MGP and p21) in nucleus pulposus (NP) cells were also
17 analysed by quantitative real-time PCR.

18 **Results** MRI analysis indicated an early age-dependent increase in the Pfirrmann's grading.
19 Histological Boos' scoring was also increased, thereby confirming the age-dependent tissular
20 changes shown by MRI. The analysis of transcript expression levels showed that COL2A1
21 and AGC1 were down-regulated as a function of age. Conversely, COL1A1, MMP-13, BMP-
22 2, MGP and p21 were significantly up-regulated in the NP cells of aged rabbit IVD.

23 **Conclusions** Our study describes the consistency of the rabbit as a model of early IVD aging
24 by correlating tissular alteration observed by MRI and histology with cellular changes
25 measured by phenotypic investigation. This data make the rabbit a valuable model that could

Characterization of the early aging of intervertebral disc.

- 1 help gain new insights into the early molecular mechanisms that govern IVD degeneration
- 2 and test the efficacy of tissue engineering strategies.

1 **KEY MESSAGES**

- 2 A correlation between early tissular and cellular changes can be described during IVD aging.
- 3 The rabbit is a valuable model of early age-dependent IVD degeneration.
- 4 The rabbit is a valuable tool to test the preclinical efficacy of tissue engineering strategy.
- 5 The physiopathological in the onset of IVD degeneration and osteoarthritis show similarities.

Characterization of the early aging of intervertebral disc.

1 **MINI-ABSTRACT**

2 To address whether the rabbit is a valuable model to provide insights into the process of
3 intervertebral disc degeneration and an appropriate tool to investigate the efficacy of IVD
4 cell-based biotherapies. To perform this study, lumbar IVD from rabbits with increasing ages
5 were compared by MRI, histological and phenotypical analysis.

1 **INTRODUCTION**

2 The intervertebral disc (IVD) lies between the vertebral bodies and links them together.
3 The components of the disc are *Nucleus pulposus* (NP), *Annulus fibrosus* (AF) and the end-
4 plates. The discs have a complex structure, with the outer AF having lamellae of organized
5 collagen fibrils (mainly type I and II collagen) and the inner NP having a more random
6 collagen organization (mainly type I and II) and an abundance of aggregating proteoglycans
7 (mainly aggrecan) [1]. Although the phenotype of IVD cells and the composition of the
8 extracellular matrix (ECM) is still the subject of considerable debate, they appear quite
9 comparable to those of articular cartilage particularly for NP cells [2, 3]. This composite
10 nature of IVD endows the disc with both the tension-resisting properties of a ligament and the
11 compression-resisting properties of articular cartilage. Unfortunately, disc structure and
12 function does not remain optimal throughout life, but undergoes a progressive age-dependent
13 degeneration. The IVD aging initiates early in the NP, as seen by a loss of cellularity and
14 alteration of the ECM, thus compromising the mechanical properties of IVD [4]. It is well
15 acknowledged that IVD degeneration encompasses several age-related processes influenced
16 primarily by mechanical, nutritional and genetic factors. However, the underlying cellular and
17 molecular mechanisms involved in the premature initiation and progression of IVD aging and
18 degeneration still remains poorly deciphered (for review see [5]). In this context, the
19 development of appropriate animal models capable of providing new insights into the IVD
20 physiopathology should be further investigated.

21 IVD blood supply terminated at the end-plate, making NP and AF non-vascularized tissue
22 [4]. In addition, IVD is a poorly cellularized tissue with NP and AF containing 3000 and
23 10000 cells/mm³ [4] respectively. Both these characteristics are responsible for the limited
24 intrinsic repair capacity of IVD. Accordingly, IVD damages are irreversible and often result
25 in clinical symptoms, such as low back pain, that require medical intervention [1]. Such

1 treatments currently involve removal or replacement (disc prosthesis) of the injured disc by
2 surgery rather than its repair, which would be the preferred course of action. Successful
3 transplantation of IVD autografts, fresh allografts, and fresh-frozen allografts have also been
4 considered in primate models and in humans [6]. However the safety and efficiency of such
5 techniques remain to be clarified. In this context, the use of cell-seeded biomaterials for tissue
6 engineering of the IVD has been recently investigated [7, 8]. Although results thus far are
7 promising, the development of an in vivo model that can closely mimic human IVD aging and
8 degeneration is crucial to test the efficacy of such future regenerative cell-based biotherapies.

9 The present study was conducted to address whether the rabbit could be considered (i) as a
10 valuable model to provide new insights into the precocious tissular and cellular processes of
11 IVD aging and degeneration and (ii) as an appropriate tool to investigate the efficacy of IVD
12 biotherapies. To this end, lumbar IVD from rabbits with increasing ages (1 to 30 months old)
13 were compared by MRI and histological staining. In an effort to determine whether a close
14 correlation may exist between the tissular and cellular changes observed during the early
15 course of aging, we also analyze the variation of transcript expression in NP cells with
16 increasing age.

17 **MATERIALS AND METHODS**

18 Materials

19 Decalcifier II[®] was purchased from Surgipath (Richmond, USA). Ketamine was Imalgene
20 1000 from Merial (Lyon, France) and Xylazine was Rompun 2% from Bayer (Puteaux,
21 France). Hyaluronidase, trypsin, type II collagenase, trypsin/EDTA, isopropanol, alcian blue,
22 Weigert's haematoxylin, Ponceau-fushine acid, Bovine Serum Albumin (BSA) was purchased
23 from Sigma-Aldrich (St-Louis, USA). Histosol[®] was obtained from Shandom (Brussels,
24 Belgium). Hank's Balanced Sodium Salt (HBSS), Phosphate-Buffered Saline (PBS),
25

1 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4.5 g/l glucose), penicillin/streptomycin, L-
2 glutamine, Trizol[®] and Dnase I were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK).
3 Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase (AMV-RT), random hexamers and
4 recombinant ribonuclease inhibitor were purchased from Promega Corporation (Madison, WI,
5 USA). Brilliant[®] SYBR Green Master Mix was obtained from Stratagene (La Jolla, CA,
6 USA). PCR primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Fetal Calf
7 Serum (FCS) was obtained from Dominique Dutscher (Brumath, France). All other chemicals
8 were obtained from standard laboratory suppliers and were from the highest purity available.

9 Animals and surgical procedures

10 All animal handling and surgical procedures were conducted according to European
11 Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE).
12 Experiments were performed in accordance with standard laboratory practices. New Zealand
13 White rabbits (Charles River, L'arbresle, France), 1, 6 and 30-month old, were used.

14 MRI scanning and image assessment

15 MRI scans were performed using a one Tesla clinical magnet (Siemens Magnetom
16 Harmony/Syngo). One, six, 30 month old rabbits (n=3) were anesthetized by intramuscular
17 injection of xylazine and ketamine. A 2.5 mm midsagittal section image was obtained, using a
18 T2-weighted imaging sequence (T2ws) (TR, 5000 milliseconds; TE, 111 milliseconds).

19 Images were analysed by Pfirrmann's grading [9]. This grading system is based on MRI
20 signal intensity, disc structure, distinction between NP and AF and disc height on T2-
21 weighted magnetic resonance images. The degree of disc degeneration was ranked from grade
22 1 (normal disc) to grade 5 (severe degeneration) as described previously [9]. An evaluation of
23 MRI scans was performed by three independent investigators expert in MRI image reading.

24 Histological analysis

1 After rabbit sacrifice, (n=3 for every ages) spinal columns were removed under aseptic
2 conditions. IVD were dissected [3] and fixed in 10% paraformaldehyde for four days,
3 decalcified for 24 hours in Decalcifier II[®]. After dehydration and incubation with HistoSol[®],
4 specimens were embedded in paraffin and sectioned into 3- μ m slices. For histological
5 analysis, 3 μ m thick paraffin sections were deparaffined using toluene, rehydrated through a
6 graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. Sections were stained with hematoxylin
7 phloxin safran (HPS), with 0.1% alcian blue and Masson's trichrome [10].

8 Histological sections were analyzed using Boos' modified scoring [11]. Four parameters were
9 specifically assessed to classify age-related changes in IVD: cell density, mucous
10 degeneration, tears and cleft formations and granular changes [11]. Each parameter was
11 ranked from 0 to 4 according to the intensity of the tested parameters (0: lowest; 4: highest).
12 A blind evaluation of histological samples was performed by three independent investigators
13 expert in reading histological slides.

14 Transcript expression analysis

15 Isolation of rabbit intervertebral disc cells

16 Five rabbits of each age were sacrificed. AF and NP tissues were isolated and enzymatically
17 digested by 0.05% hyaluronidase in HBSS at 37°C for 10 minutes, then with 0.2% trypsin for
18 15 minutes and finally with 0.2% type II collagenase for 30 minutes [3]. NP cells were frozen
19 for subsequent real time PCR analysis.

20 Reverse transcription and Real-Time Polymerase Chain Reaction

21 Total RNA was extracted using Trizol[®] reagent according to the manufacturer's instructions.
22 Briefly, lysis of cells in Trizol[®] was followed by centrifugation at 10000 g for 15 minutes at
23 4°C in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected, and RNA were

1 precipitated by the addition of isopropanol and centrifugation at 7500 g for 5 minutes at 4°C.
2 RNA pellets were then washed with cold 75% ethanol, dried, reconstituted in sterile water,
3 and quantified by spectrometry.

4 After deoxyribonuclease I digestion, RNA samples (2.5 µg) were reverse-transcribed using
5 AMV-RT and random primers in a total volume of 30µl. Complementary DNA (cDNA) was
6 amplified in a total volume of 25µl PCR reaction containing 12.5µl of brilliant SYBR Green
7 Master Mix (1x) and 30nM of SYBR green reference dye. The sequence of each primer set
8 used are given in Table I. Real-time PCR was performed in the Mx3000P QPCR System
9 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) under the following conditions: denaturation for 10 min at
10 95°C followed by cycles of 30 seconds of denaturation at 95°C, 1 minute of annealing at 60°C
11 and 15 seconds of elongation at 72°C. The efficiency and specificity of each primer set were
12 confirmed with standard curves of cycle threshold (Ct) values *versus* serial dilution of total
13 RNA and melting profile evaluation. Cycle thresholds were normalized to GAPDH in order to
14 verify cDNA quantification differences. Results are reported as fold change in gene
15 expression relative to 1-month-old rabbits.

16 Statistical analysis

17 Each experiment was repeated at least three times with similar results. Results are expressed
18 as mean +/- SEM of triplicate samples. Comparative studies of means were performed using
19 one-way ANOVA followed by a *post hoc* test (Fisher's projected least significant difference)
20 with a statistical significance at $p < 0.05$.

21 **RESULTS**

22 **MRI and histological characterization of 1-month-old rabbit**

1 Figure 1A is a representative MRI picture of one-month-old rabbit lumbar spine. A bright
2 T2ws intensity of NP was observed from L1 to L6 level (Figure 1A). In order to identify the
3 different structures of the rabbit IVD and characterize the histological organization of AF and
4 NP, histological analyses after HPS (Figure 1B), alcian blue (Figure 1C) and Masson's
5 trichrome (Figure 1D) staining were performed. The transversal section of IVD depicted in
6 Figure 1B shows that AF and NP have different structural organization. While AF appeared to
7 be precisely organized in concentric lamellae, NP tissue appeared as a less-organized tissue.
8 AF tissue showed a gradient of HPS staining from the center to the periphery, enabling 2
9 substructures to be distinguished within the AF: the outer and the inner AF. AF cells appeared
10 spindle shaped and were oriented parallel to the concentric lamellae. On the contrary, NP cells
11 were round and formed large clusters of approximately 10 cells. The ECM of AF and NP
12 were also analyzed by specific stainings for sulphated glycosaminoglycans (GAG) by alcian
13 blue staining (Figure 1C). IVD was positively stained by alcian blue indicating the presence
14 of sulphated GAG in both AF and NP (Figure 1C). Interestingly, an increasing gradient of
15 staining was observed from the outer AF to the inner AF and NP. Finally to address the
16 presence of collagen, Masson's trichrome staining was performed. Figure 1D indicates a
17 disparity in Masson's trichrome staining intensity between AF and NP. Contrarily to the NP
18 which exhibited a barely detectable Masson's trichrome staining, AF tissue was highly
19 stained with a decreasing gradient from its outer to its inner part.

MRI and histological characterization of IVD aging

22 In order to characterize the aging process of IVD, the T2ws intensity of lumbar spine from
23 one, six and 30-month-old rabbits was assessed. MRI picture of one-month-old IVD on
24 Figure 2A indicates a grade I according to the Pfirrmann'grading to IVD from L2 to L6

1 levels. The lowest lumbar IVD (L6-L7) appears non-homogeneous with a dark transverse
2 band. A grade II was assigned to this disc. The six-month-old rabbits' (Figure 2B) NP from
3 L2 to L7 level showed a nonhomogeneous T2ws intensity with the presence of a dark
4 transverse band and were assigned as grade II. Six-month-old disc height was not altered as
5 compared to that of one-month old disc but the distinction between NP and AF became less
6 discernable. For the 30-month-old rabbits (Figure 2C), all the IVD at lumbar level exhibited a
7 non-homogeneous T2 signal intensity (gray). The IVD height was slightly decreased, and no
8 distinction between NP and AF could be observed. These were scored as grade III. In
9 summary, MRI data indicate that rabbits exhibit scalable IVD degeneration evolving as early
10 as one-month old.

11 To further address whether the age-dependent MRI changes of rabbit IVD may correlate with
12 some tissular alteration, we then performed histological stainings. Analysis of histological
13 staining revealed a dramatic decrease in cell density as a function of age (Figure 3 A, B, C).
14 In addition, mucous degeneration and granular changes, shown by the presence of large
15 decoloured and heterogeneous areas in granulated regions, were markedly increased (Figure 3
16 D, E, F). Finally, the formation of tears and clefts shown by the presence of small thin defects
17 was also affected by aging. To quantitatively assess the histological damage observed as a
18 function of age, we next used a modified Boos' scoring [11] (Figure 3G). Our results show a
19 significant increase in the modified Boos' scoring from one to 30 months old. This scoring
20 was 5.5-times higher in the 30-month-old rabbits compared to one-month old rabbits
21 ($p < 0.05$).

22 **Alteration of transcript expression patterns during IVD aging**

23 To address whether the structural age-related changes identified by MRI and histology may
24 be related to alteration of cell phenotype, we analysed the expression levels of transcript

1 coding for several IVD associated genes in freshly isolated NP cells from increasing ages. We
 2 first focused our attention on transcript coding for ECM genes (type II collagen COL2A1,
 3 type I collagen COL1A1 and aggrecan AGC1). Our data indicated that COL2A1 mRNA
 4 levels decreased significantly with aging in NP cells (Figure 4A). The COL2A1 mRNA level
 5 was 100-fold lower in the 30-month-old rabbit compared to that of a one-month-old rabbit
 6 ($p < 0.05$). In parallel, a significant 2.5-fold decrease in AGC1 mRNA levels was also noted
 7 between one and 30-month-old rabbits ($p < 0.05$) (Figure 4B). In contrast to the decrease in
 8 COL2A1 and AGC1 mRNA levels, the COL1A1 mRNA level increased significantly with
 9 aging in NP cells (Figure 4C) with a 2.5-fold increase in COL1A1 mRNA at the age of 30-
 10 months compared to one-month. Taken together, this data indicates that the expression of
 11 chondrogenic markers (COL2A1 and AGC1) decreases as a function of age whereas that of
 12 the dedifferentiation marker (COL1A1) increases as early as six months.

13 Since it has been reported that the expression of matrix metalloprotease 13 (MMP13), bone
 14 morphogenetic protein-2 (BMP2) and the matrix Gla protein (MGP) were affected during the
 15 course of osteoarthritis [12] and IVD aging [13], we were interested in deciphering whether
 16 these genes may also be affected by aging in rabbit NP. Whilst a significant decrease in
 17 MMP-13 mRNA levels was found between one and six-month-old NP, our data indicate that
 18 MMP13 mRNA levels increased significantly between 6 and 30-month old rabbit (2.8-fold
 19 higher) ($p < 0.05$) (Figure 4D). In addition, BMP2 mRNA levels was found to be significantly
 20 up-regulated between one and 30-month-old rabbits with a 2.5 fold increase ($p < 0.05$) (Figure
 21 4E). MGP mRNA levels were significantly increased as a function of age with a significant
 22 seven-fold increase between one-and 30-month-old rabbits (Figure 4F).

23 Finally, since IVD aging has recently been associated with cellular senescence [14], we
 24 investigated whether the level of p21 mRNA may vary as a function of age (Figure 4G).

1 Interestingly, our transcript analysis revealed that p21 mRNA level was significantly up-
2 regulated (2 fold increase) between six month and 30-month-old rabbits.

3 Viewed together, our data strongly suggest that the age-dependent tissular damages evidenced
4 by MRI and histology were associated with dramatic alteration of the phenotype of NP cells.

5 **DISCUSSION**

6 The current therapeutic strategies for patients with lower back pain remain symptomatic and
7 are mainly dedicated to relieving painful symptoms. Our current understanding of the
8 physiopathology of IVD degeneration allows us to consider regenerative medicine as a
9 promising strategy. Indeed, recent reviews have considered the imbalance between anabolism
10 and catabolism as a pivotal factor of the IVD degeneration process. This imbalance between
11 anabolism and catabolism contributes to the disorganization of the ECM. Accordingly,
12 increasing attention has been paid to the regeneration of functional tissue based on the
13 restoration of the ECM integrity by cell therapy and/or tissue engineering [4, 15, 16].
14 Nevertheless, before these promising biotherapies may enter the therapeutic arsenal, some
15 preclinical tests in adapted animal models that closely mimic the physiological aging and
16 degeneration process of human IVD should be performed. In this context, the present study
17 aims at characterizing IVD aging and degeneration in the rabbit to propose this model as a
18 suitable tool to i) gain new insights in the complex mechanisms of IVD degeneration and ii)
19 to perform preclinical experiments dedicated to the evaluation of the safety and efficacy of
20 IVD tissue engineering strategies.

21 To address whether the rabbit could be a reliable model of age-dependent IVD degeneration,
22 we focused our attention on the characterization of IVD from rabbits with increasing ages.
23 Consistently with the study of Murakami et al [17], we have used rabbits with ages including
24 the main periods of life: childhood (one-month-old), adolescence (six-months old) and adult

1 age (30 months old). Since only young adult rabbits were commercially available, we were
2 unable to perform our study in elderly rabbits.

3 In humans, the gold standard for the clinical investigation of IVD integrity is MRI. This
4 technique allows the definition of IVD integrity based on the tissular hydration shown by the
5 intensity of the T2ws in the NP. The MRI pictures of rabbit lumbar spines showed an age-
6 dependent decrease in the T2ws and the appearance of a dark transverse band. This data is
7 quite similar to that observed in humans during the course of IVD degeneration [18]. The
8 decrease in T2ws intensity in human IVD after 20 years of age is well-acknowledged and
9 reflects the decrease in water and proteoglycan contents during aging [19]. The dark
10 transverse band is considered to be a normal structure in persons of 30 years or older [18].
11 Histological studies have thus suggested that this dark transverse band may likely to be due to
12 the accumulation of fibrous tissue in the central zone of NP [20]. To precisely assess disc
13 degeneration on routine T2ws in human, Pfirrmann et al. have developed a reliable grading
14 system [9]. Interestingly, the use of Pfirrmann's system to grade IVD degeneration in rabbit
15 reveals the same profile of T2ws variation as a function of age, thereby confirming the
16 reliability of the different periods of life in rabbits: grade I for childhood (one-month old in
17 rabbits is similar to a child in humans), grade II for adolescent rabbit (six months old in
18 rabbits is similar to an adolescent in humans) and grade III in adult age (30 months old in
19 rabbits is similar to an adult in humans). All these MRI data suggest that the age-related
20 changes that occurs in rabbit IVD share consistent similarities with those traditionally
21 observed during the course of human IVD aging and degeneration.

22 To further address whether the age-related changes observed by MRI may correlate with some
23 tissular alteration, we then performed histological stainings. Our histological data first
24 confirmed the similarities between rabbit and human IVD with the NP being englobed by the
25 AF. With respect to this resemblance, we were interested in addressing whether the modified

1 Boos' scoring, originally developed to histologically assess IVD degeneration in humans,
2 could be transposed to rabbit IVD degeneration. Accordingly, the main features of human
3 IVD degeneration were found in rabbit IVD with mucous degeneration, granular changes as
4 well as cracks and tears being formed as a function of age. Interestingly, these histological
5 changes perfectly corroborate the changes observed by MRI (loss of T2ws intensity and
6 formation of a dark band) [17]. Taken together, our MRI and histological data show some
7 similarities between the process of IVD aging in rabbits and humans thereby strongly
8 suggesting that rabbits could be considered as a valuable spontaneous model of IVD aging
9 and degeneration. In addition to being a reliable model of early IVD aging, such a kind of
10 spontaneous model of degeneration is likely to be the most closest to the physiopathology of
11 IVD degeneration in humans compared to the conventional models of degeneration induced
12 by needle aspiration or chemonucleolysis [21-25].

13 To our knowledge there is only one other study which partially describes IVD aging or the
14 degeneration process [26]. In this previous study, rabbit IVD aging is longitudinally evaluated
15 between the age of six and 42 months. On the contrary to our study, no result is available for
16 the period ranging from one to six months which is nevertheless an essential period for the
17 onset of IVD aging. In fact, it is well known that the NP of less than six-month-old rabbits
18 contain some remnant cells originating from the embryonic notochord [27]. Whether the age-
19 dependent loss of notochordal cells, most likely by apoptosis, is intimately related to IVD
20 aging is not yet fully deciphered but has been proposed as a possible initiating mechanism for
21 IVD degeneration [28, 29].

22 NP is the structure in which IVD degeneration is initiated by dehydration followed by an
23 alteration of the structural organization of the tissue [11]. Therefore, to strengthen our MRI
24 and histological data, we finally sought to decipher whether the above described age-
25 dependent tissular changes may correlate with alteration in the NP cell phenotype. To address

1 this issue, we focused our attention on the expression levels of molecules that were previously
2 shown to be modulated during the onset of IVD degeneration or osteoarthritis (COL1A1,
3 COL2A1, AGC1, BMP2, MMP13, MGP and P21) [12, 14, 30]. Since it remains difficult to
4 quantitatively evaluate the level of the corresponding proteins, particularly in the rabbit, we
5 embarked on the analysis of the corresponding transcript levels by real-time RT-PCR. Our
6 data describing an age-dependent increase in COL1A1 expression with a concomitant
7 decrease in COL2A1 and AGC1 expression suggest that NP cells experience a process of
8 dedifferentiation. Interestingly, this dedifferentiation process has been well described in
9 cultured articular chondrocytes [31] and in osteoarthritic joints [32]. Our data also suggests
10 that during the process of IVD aging, the molecules with a longer half-life (collagen type II)
11 exhibit an early decrease in the corresponding transcript levels. Conversely, the molecules
12 with a shorter half-life (aggrecan) have a transcript expression levels that starts to decline later
13 on. Whether this differential regulation of ECM molecules may be of importance for the
14 maintenance of IVD integrity deserves further attention.

15 Among the various genes that are modulated in osteoarthritic chondrocytes [12], MMP-13 is
16 probably the most trustworthy. We were therefore interested to find a significant modulation
17 of these genes during IVD degeneration. MMP-13 is known to degrade collagens and
18 glycosaminoglycans [33]. The increase in MMP13 could therefore be a major contributor of
19 IVD degeneration [14] as it has been extensively reported in cartilage degradation during OA
20 [12].

21 BMP-2, a growth factor that stimulates the production of ECM components in IVD [17] and
22 articular cartilage [34], was also shown to be stimulated as a function of age in rabbit IVD.
23 One can assume that the increase in BMP2 expression during IVD aging is related to the
24 existence of reparative mechanisms that could contribute to slowing down ECM degradation.
25 In line with this suggestion, MGP, one of the most potent inhibitors of calcification in

1 mammals [35], was also found to be up-regulated as a function of age [36] thereby supporting
2 our hypothesis of the existence of such compensatory mechanisms. Of note, similar
3 compensatory mechanisms have been described in osteoarthritic cartilage, which draws
4 attention to the physiopathological vicinity of IVD degeneration and osteoarthritis. Finally,
5 the age-dependent increase in p21, a cycline dependant kinase inhibitor that in addition to
6 being involved in cellular senescence [14, 37] has also been reported to inhibit type II
7 collagen expression in articular chondrocytes [38], further highlights the similarities between
8 OA and IVD degeneration.

9 **CONCLUSION**

10 In conclusion, this study describes the consistency of the rabbit as a spontaneous model of
11 early age-dependent IVD degeneration by correlating tissular alteration observed by MRI and
12 histology with cellular changes measured by phenotypic investigation. Our data also highlight
13 some similarities between the physiopathological processes involved in the onset of IVD
14 degeneration and those described for osteoarthritis.

15 Finally, our study makes the rabbit a valuable tool (i) to gain new insights into the complex
16 molecular mechanisms that govern early IVD degeneration and (ii) to test the preclinical
17 efficacy of tissue engineering strategy that may offer the possibility of regenerating damaged
18 IVD.

1 **REFERENCES**

- 2 1. Raj, P.P., *Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment*. Pain
3 Pract, 2008. 8(1): p. 18-44.
- 4 2. Sive, J.I., P. Baird, M. Jeziorsk, et al., *Expression of chondrocyte markers by cells of*
5 *normal and degenerate intervertebral discs*. Mol Pathol, 2002. 55(2): p. 91-7.
- 6 3. Clouet, J., G. Grimandi, M. Pot-Vaucel, et al., *Identification of phenotypic*
7 *discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes*.
8 Rheumatology, 2009. 48(11): p. 1447-50.
- 9 4. Clouet, J., C. Vinatier, C. Merceron, et al., *The intervertebral disc: from*
10 *pathophysiology to tissue engineering*. Joint Bone Spine, 2009. 76(6): p. 614-8.
- 11 5. Hadjipavlou, A.G., M.N. Tzermiadianos, N. Bogduk, and M.R. Zindrick, *The*
12 *pathophysiology of disc degeneration: a critical review*. J Bone Joint Surg Br, 2008.
13 90(10): p. 1261-70.
- 14 6. Ruan, D., Q. He, Y. Ding, et al., *Intervertebral disc transplantation in the treatment of*
15 *degenerative spine disease: a preliminary study*. Lancet, 2007. 369(9566): p. 993-9.
- 16 7. Alini, M., W. Li, P. Markovic, et al., *The potential and limitations of a cell-seeded*
17 *collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix*. Spine,
18 2003. 28(5): p. 446-54; 453.
- 19 8. Roughley, P., C. Hoemann, E. DesRosiers, et al., *The potential of chitosan-based gels*
20 *containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation*.
21 Biomaterials, 2006. 27(3): p. 388-96.
- 22 9. Pfirrmann, C.W., A. Metzdorf, M. Zanetti, J. Hodler, and N. Boos, *Magnetic*
23 *resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration*. Spine, 2001.
24 26(17): p. 1873-8.
- 25 10. Vinatier, C., O. Gauthier, M. Masson, et al., *Nasal chondrocytes and fibrin sealant for*
26 *cartilage tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2009. 89(1): p. 176-85.
- 27 11. Boos, N., S. Weissbach, H. Rohrbach, et al., *Classification of age-related changes in*
28 *lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science*. Spine, 2002. 27(23):
29 p. 2631-44.
- 30 12. Goldring, M.B., M. Otero, K. Tsuchimochi, K. Ijiri, and Y. Li, *Defining the roles of*
31 *inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism*. Ann Rheum Dis, 2008.
32 67 Suppl 3: p. iii75-82.

- 1 13. Lee, C.R., D. Sakai, T. Nakai, et al., *A phenotypic comparison of intervertebral disc*
2 *and articular cartilage cells in the rat*. Eur Spine J, 2007. 16(12): p. 2174-85.
- 3 14. Le Maitre, C.L., A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Accelerated cellular senescence in*
4 *degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral*
5 *disc degeneration*. Arthritis Res Ther, 2007. 9(3): p. R45.
- 6 15. Kalson, N.S., S. Richardson, and J.A. Hoyland, *Strategies for regeneration of the*
7 *intervertebral disc*. Regen Med, 2008. 3(5): p. 717-29.
- 8 16. Richardson, S.M., A. Mobasher, A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Intervertebral disc*
9 *biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine*
10 *therapies*. Histol Histopathol, 2007. 22(9): p. 1033-41.
- 11 17. Murakami, H., S.T. Yoon, E.S. Attallah-Wasif, et al., *The expression of anabolic*
12 *cytokines in intervertebral discs in age-related degeneration*. Spine, 2006. 31(16): p.
13 1770-4.
- 14 18. Aguila, L.A., D.W. Piraino, M.T. Modic, et al., *The intranuclear cleft of the*
15 *intervertebral disk: magnetic resonance imaging*. Radiology, 1985. 155(1): p. 155-8.
- 16 19. Sether, L.A., S. Yu, V.M. Haughton, and M.E. Fischer, *Intervertebral disk: normal*
17 *age-related changes in MR signal intensity*. Radiology, 1990. 177(2): p. 385-8.
- 18 20. Yu, S.W., V.M. Haughton, P.S. Ho, et al., *Progressive and regressive changes in the*
19 *nucleus pulposus. Part II. The adult*. Radiology, 1988. 169(1): p. 93-7.
- 20 21. Sobajima, S., J.F. Kompel, J.S. Kim, et al., *A slowly progressive and reproducible*
21 *animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and*
22 *histology*. Spine, 2005. 30(1): p. 15-24.
- 23 22. Hoogendoorn, R.J., M.N. Helder, P.I. Wuisman, et al., *Adjacent segment*
24 *degeneration: observations in a goat spinal fusion study*. Spine, 2008. 33(12): p.
25 1337-43.
- 26 23. Kim, K.S., S.T. Yoon, J. Li, J.S. Park, and W.C. Hutton, *Disc degeneration in the*
27 *rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models*.
28 Spine, 2005. 30(1): p. 33-7.
- 29 24. Yamada, K., M. Nakagawa, T. Kato, et al., *Application of short-time magnetic*
30 *resonance examination for intervertebral disc diseases in dogs*. J Vet Med Sci, 2001.
31 63(1): p. 51-4.
- 32 25. Zhou, H., S. Hou, W. Shang, et al., *A new in vivo animal model to create*
33 *intervertebral disc degeneration characterized by MRI, radiography, CT/discogram,*
34 *biochemistry, and histology*. Spine, 2007. 32(8): p. 864-72.

- 1 26. Sowa, G., G. Vadala, R. Studer, et al., *Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression*. Spine, 2008. 33(17): p. 1821-8.
- 2
- 3
- 4 27. Hunter, C.J., J.R. Matyas, and N.A. Duncan, *The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering*. Tissue Eng, 2003. 9(4): p. 667-77.
- 5
- 6
- 7 28. Hunter, C.J., J.R. Matyas, and N.A. Duncan, *The functional significance of cell clusters in the notochordal nucleus pulposus: survival and signaling in the canine intervertebral disc*. Spine, 2004. 29(10): p. 1099-104.
- 8
- 9
- 10 29. Aguiar, D.J., S.L. Johnson, and T.R. Oegema, *Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis*. Exp Cell Res, 1999. 246(1): p. 129-37.
- 11
- 12
- 13 30. Canfield, A.E., K.D. Hadfield, C.F. Rock, E.C. Wylie, and F.L. Wilkinson, *HtrA1: a novel regulator of physiological and pathological matrix mineralization?* Biochem Soc Trans, 2007. 35(Pt 4): p. 669-71.
- 14
- 15
- 16 31. Schnabel, M., S. Marlovits, G. Eckhoff, et al., *Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. 10(1): p. 62-70.
- 17
- 18
- 19 32. Clouet, J., C. Vinatier, C. Merceron, et al., *From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage*. Drug Discov Today, 2009. 14(19-20): p. 913-25.
- 20
- 21 33. Roberts, S., B. Caterson, J. Menage, et al., *Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc*. Spine, 2000. 25(23): p. 3005-13.
- 22
- 23
- 24 34. Cheng, C., E. Conte, N. Pleshko-Camacho, and C. Hidaka, *Differences in matrix accumulation and hypertrophy in superficial and deep zone chondrocytes are controlled by bone morphogenetic protein*. Matrix Biol, 2007. 26(7): p. 541-53.
- 25
- 26
- 27 35. Luo, G., P. Ducy, M.D. McKee, et al., *Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein*. Nature, 1997. 386(6620): p. 78-81.
- 28
- 29 36. Lee, C.R., D. Sakai, T. Nakai, et al., *A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat*. Eur Spine J, 2007.
- 30
- 31 37. Ohtani, N., Y. Imamura, K. Yamakoshi, et al., *Visualizing the dynamics of p21(Waf1/Cip1) cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(38): p. 15034-9.
- 32
- 33

- 1 38. Sironen, R.K., H.M. Karjalainen, M.A. Elo, et al., *cDNA array reveals*
2 *mechanosensitive genes in chondrocytic cells under hydrostatic pressure*. *Biochim*
3 *Biophys Acta*, 2002. 1591(1-3): p. 45-54.

4

Gene (Abbreviation)	Accession number (Gene Bank)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length
<i>GAPDH</i>	NM_002046	agccacatcgctcagaca	gcccaatacgaccaaattcc	66 pb
Type II collagen <i>COL2A1</i>	D83228	acagcaggttcacctataaccg	cccacttacgggtgtgttc	60 pb
Aggrecan <i>AGC1</i>	L38480	gaggatggcttcaccagt	tggggtacctgacagtctga	61 pb
Type I collagen <i>COL1A1</i>	D49399	agcgatggctcctccaggt	gccagggtaccacgttct	63 pb
Matrix metalloproteinase 13 <i>MMP13</i>	NM_001082037	tttgaagacacgggcaag	tcatcatagctccagacttggt	60 pb
Bone Morphogenic Protein 2 <i>BMP2</i>	NM_001082650	tcagaactcaggttttcg	tggaaaccgctgtcgtct	63 pb
Matrix Gla protein <i>MGP</i>	D21265	tggatataatgctgctacaatcg	ttccaatctattcagctctgc	64 pb
P21-activated protein kinase I <i>P21</i>	NM_001082756	agaaagaaaagaacgaccagaga	cgtggatggtgtgctcaa	60 pb

Table 1: GenBank reference of the genes evaluated and oligonucleotide primers used for real-time PCR.

Figure 1: MRI and histological characterization of intervertebral disc of one-month-old rabbit.

(A) T2-weighted midsagittal image were recorded as described in the materials and methods section. Histological sections of IVD were stained with (B) Hematoxilin Phloxin Safran, (C) Alcian blue and (D) Masson's trichrome as described in the materials and methods section. NP: *Nucleus Pulposus*, AF: *Annulus fibrosus*. Bar: 200 μ m. Representative images are shown.

Figure 2: MRI images of the lumbar spine of rabbits with increasing ages. T2-weighted midsagittal images of (A) one-, (B) six- and (C) 30-month-old rabbits. Representative MRI images are shown.

Figure 3: Histological characterization of the *Nucleus pulposus* from IVD of rabbits with increasing ages. Histological sections of IVD from (A,D) one-, (B,E) six-, (C,F) 30-month-old rabbits were stained with (A, B, C) Haematoxilin Phloxin Safran and (D, E, F) alcian blue . Bar: 50 μ m. Representative images are shown. (G) A Modified Boos's scoring was used to assess quantitatively the age-dependent tissular changes. *: $p < 0.05$ as compared to 1-month old rabbits; #: $p < 0.05$ as compared to 6-month old rabbits.

Figure 4: Analysis of the expression levels of transcripts coding for the phenotypic markers (A) type II collagen, (B) Aggrecan, (C) type I collagen, (D) MMP-13, (E) BMP-2, (F) MGP and (G) p21 in *Nucleus pulposus* (NP) cells from IVD of rabbits with increasing ages. Messenger RNAs were purified from freshly isolated NP cells and analyzed by real-time PCR as described in the materials and methods section. Results are reported as fold change in gene expression related to one month old rabbits. *: $p < 0.05$ as compared to one-month-old rabbits; #: $p < 0.05$ as compared to six-month old rabbits.

Figure 1

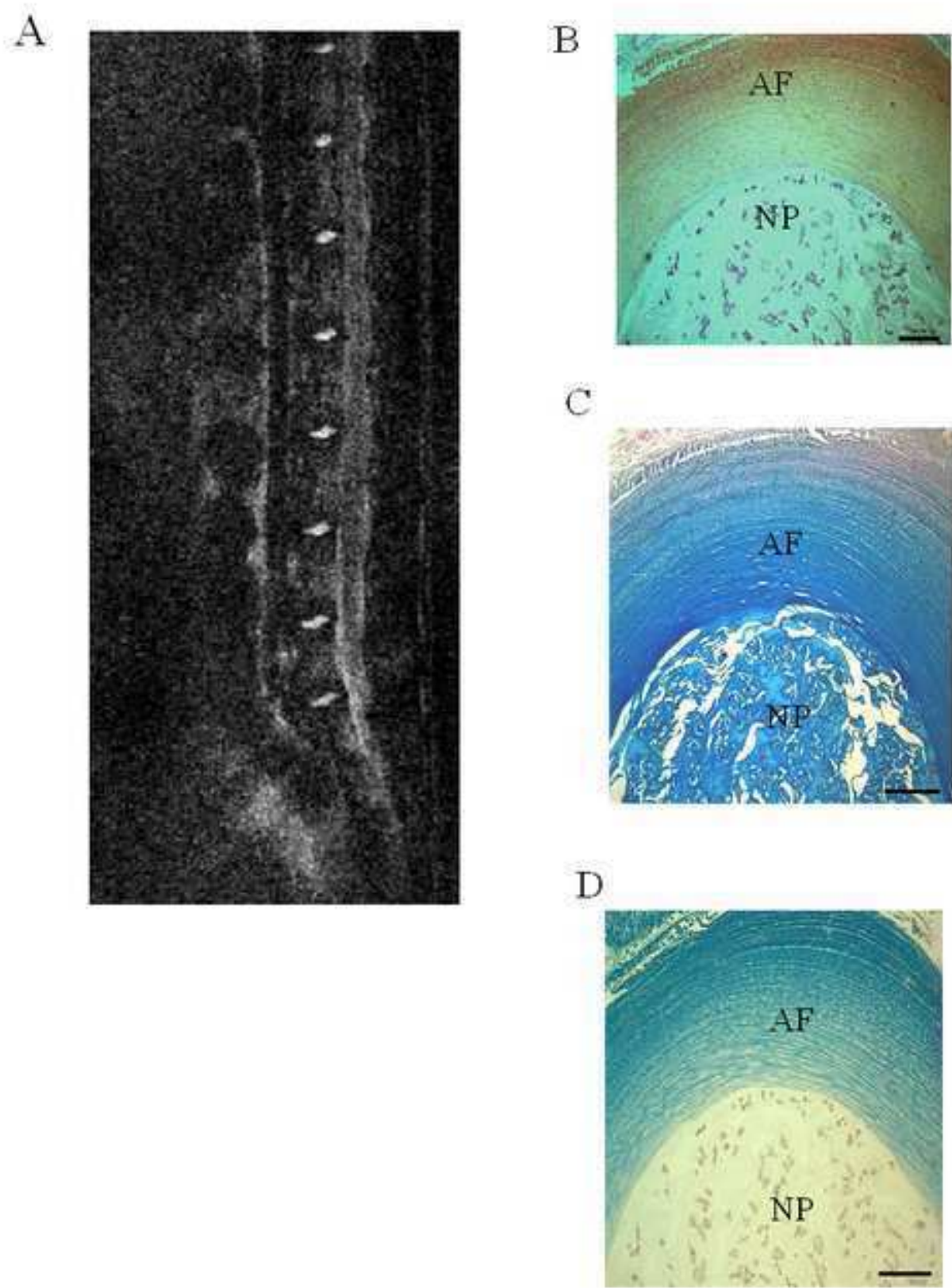


Figure 2

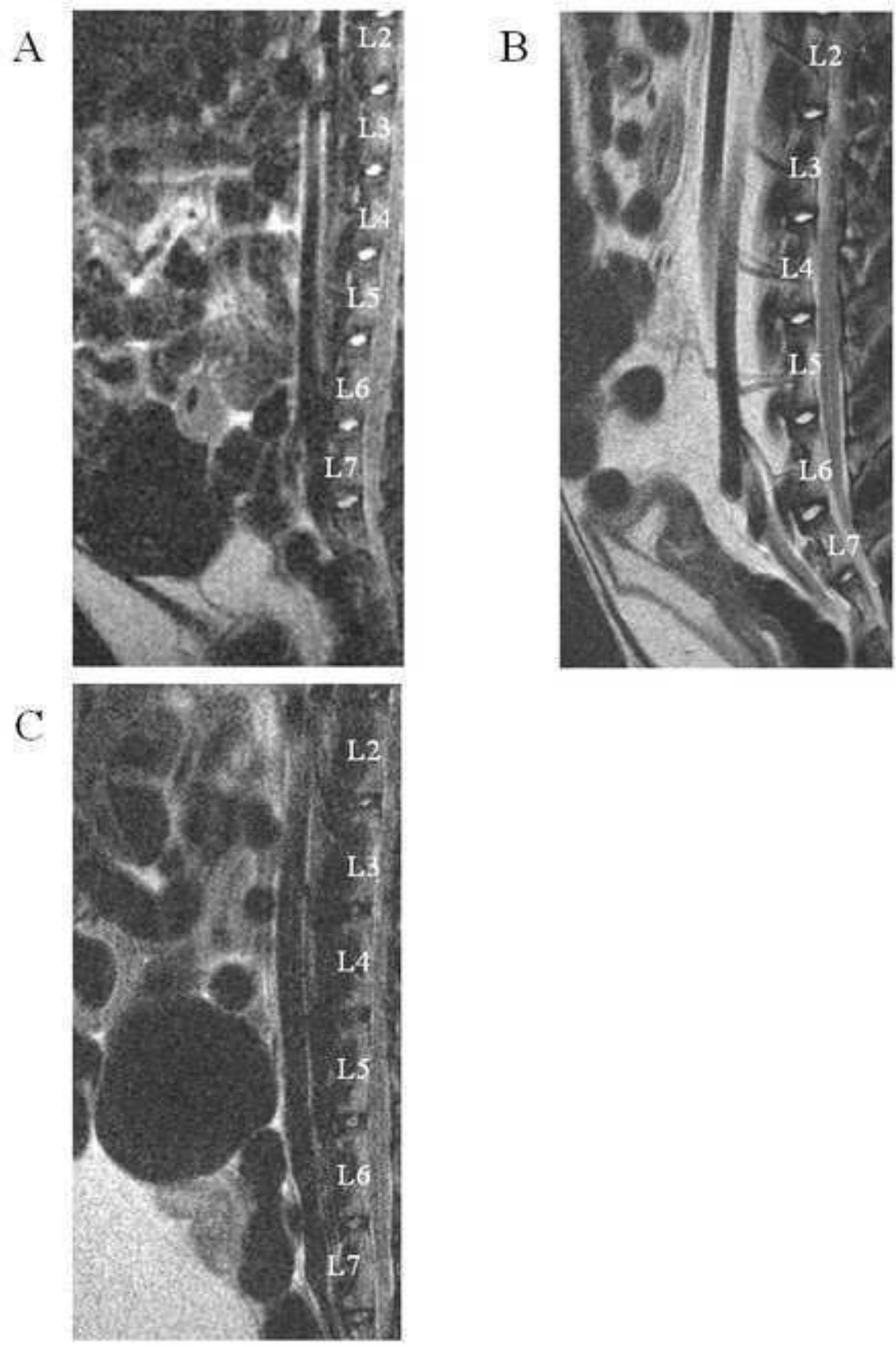


Figure 3

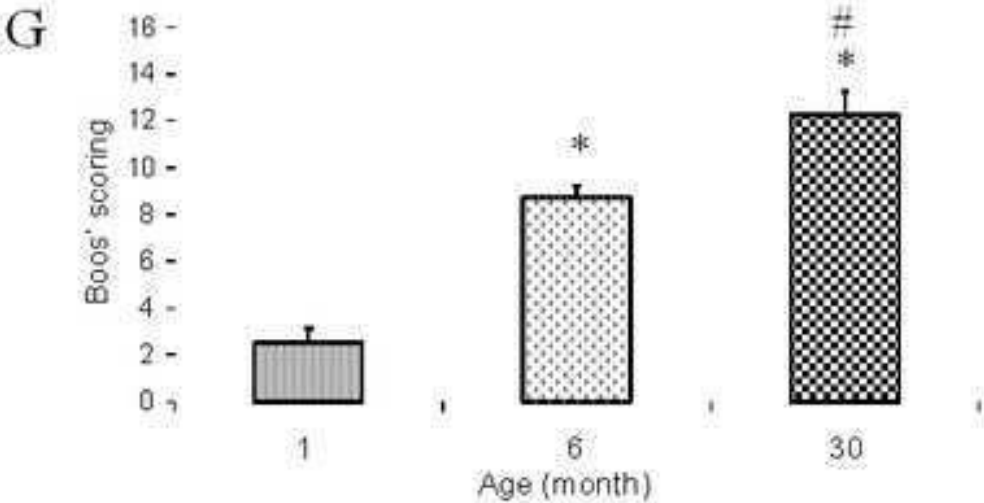
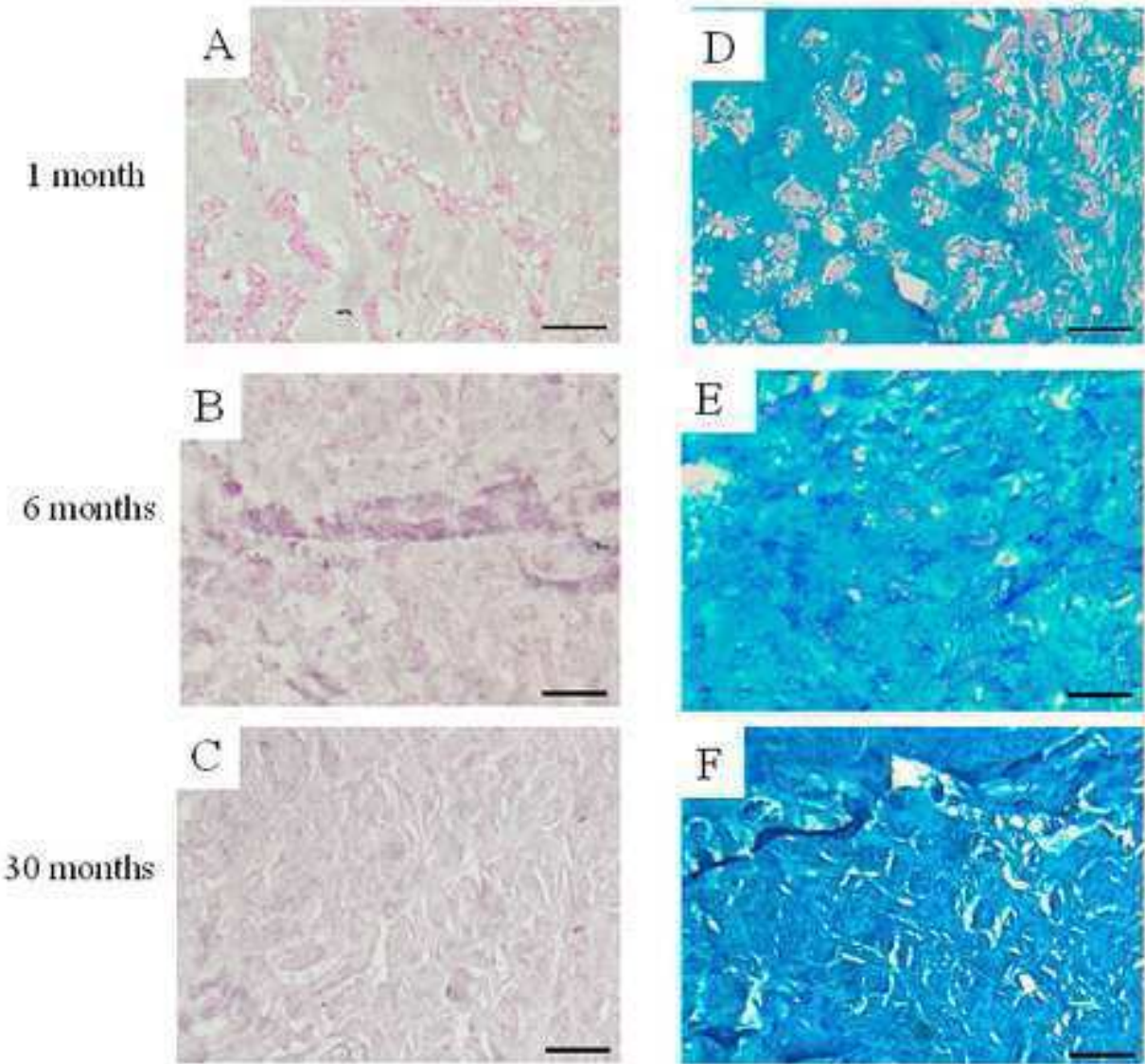
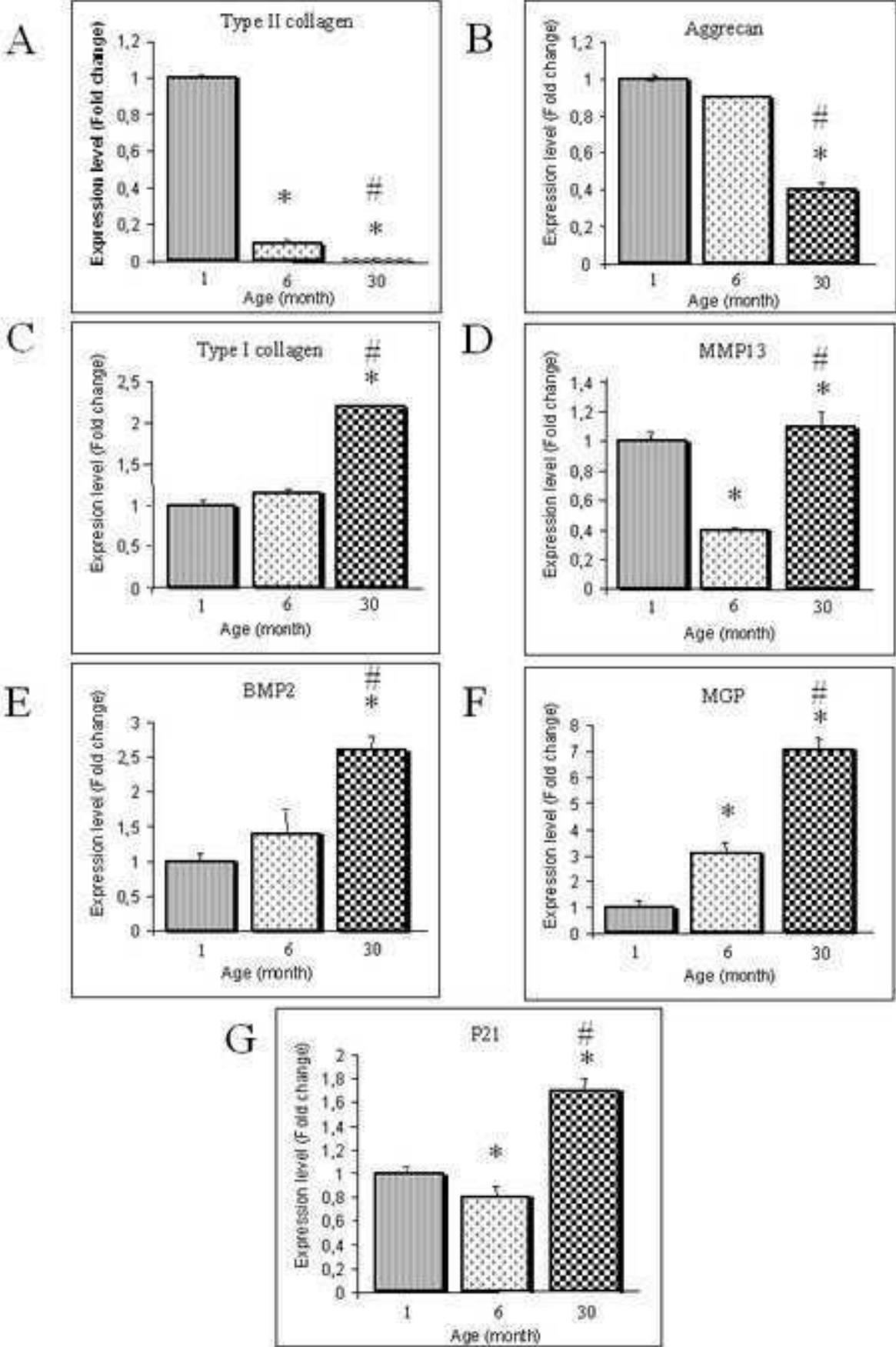


Figure 4



3- Discussion

Ces travaux montrent que le lapin présente une dégénérescence comparable à celle observée chez l'homme. Les résultats indiquent en effet que :

- La hauteur discale du disque intervertébral diminue en fonction de l'âge.
- Le signal en T2 à l'IRM des disques intervertébraux au niveau lombaire, décroît en fonction de l'âge coïncidant avec une augmentation du grade de Pfirrmann.
- L'étude histologique confirme l'existence de modifications tissulaires suggérées par les résultats radiologiques. Ainsi, ces modifications se traduisent par une augmentation du score histologique de Boos.
- L'atteinte tissulaire qui révèle une atteinte de la matrice extra-cellulaire pourrait trouver son origine dans une modification du phénotype des cellules. En effet, une modification du phénotype cellulaire est démontrée en fonction de l'âge. Une modification du réseau collagénique peut être envisagée notamment au regard de l'augmentation de l'expression en collagène de type I. De même, la déshydratation de la matrice extra-cellulaire, mise en évidence par la diminution du signal en T2 à l'IRM, est corrélée à la diminution drastique de l'expression en agrécane. L'homéostasie métabolique est également altérée (BMP-2, MMP-13, MGP) pouvant suggérer la mise en place de mécanismes de compensation afin de tenter une réparation des dommages matriciels. Enfin, l'augmentation en fonction de l'âge de p21 suggère une augmentation de la sénescence des cellules.

Toutes ces données confirment l'intérêt du lapin comme modèle naturel ou « spontané » de dégénérescence discale. Il constituera une aide précieuse pour permettre de tester l'efficacité des stratégies d'ingénierie tissulaire. Ainsi, des animaux âgés d'environ 1 an, présentant une dégénérescence intermédiaire, correspondent à des patients âgés d'environ 30 ans. A cet âge et

à ce stade de la dégénérescence, il s'agit, *a priori*, de la cible parfaite pour un traitement par ingénierie tissulaire. Un autre critère qui confirme l'intérêt du lapin peut être énoncé. Que ce soit chez l'homme ou chez le lapin, la durée de vie des cellules notochordales semble superposable. En effet, l'adolescence marque la disparition de celles-ci (6 mois pour le lapin, 12 ans chez l'homme). Ce critère est important et il renforce le fait que le lapin est un modèle approprié. Pour rappel, le rat qui a été largement utilisé également dans les études d'efficacité de l'ingénierie tissulaire, et au delà de sa petite taille qui rend difficile d'imaginer l'injection d'un substitut, présente des cellules notochordales tout au long de sa vie. Les résultats des études obtenus dans ce cas présenteraient des biais avec la possibilité d'interactions entre les cellules notochordales et un substitut matrice-cellules. Il est bon de rappeler également que la pertinence d'utilisation d'un modèle quadrupède a été démontrée par les résultats de plusieurs études [159, 160]. La différence entre les forces gravitationnelles soumises aux disques est largement compensée par les forces ligamento-musculaires. Le lapin représente donc un modèle spontané approprié. Sa taille, son faible coût, l'existence d'un processus de dégénérescence semblable en de nombreux points à celui observé chez l'homme en fait un modèle très intéressant pour des tests futurs de faisabilité de l'ingénierie tissulaire du disque intervertébral.

Ce travail a permis également de valider certaines méthodes qui seront nécessaires à la validation de l'efficacité de l'ingénierie tissulaire. Pour cela, l'expérience acquise lors de la lecture des images IRM et radiographiques, la validation du grade de Pfirrmann chez le lapin et du score anatomo-pathologique de Boos est primordiale. Ainsi, il est facile d'imaginer les critères de validation de l'efficacité d'une telle approche :

- Une augmentation du signal en T2 et donc une amélioration du grade de Pfirrmann ;
- Une augmentation de la hauteur discale ;
- Une amélioration du score de Boos.

Au niveau des transcrits, une augmentation de l'expression du collagène de type II et de l'agrécanne pourra également être recherchée, afin de confirmer la nature appropriée de la matrice extra-cellulaire néo-formée. De même, la réalisation de colorations immunohistochimiques spécifiques du collagène de type II, par exemple, permettra de répondre à ce même objectif.

En parallèle, la possibilité d'associer des études biomécaniques devra être discutée afin de valider les propriétés de résistance du tissu néo-formé. Celles-ci sont en cours dans le cadre de la thèse d'Olivier Hamel (MCU-PH, CHU de Nantes, département de Neurochirurgie) au sein du laboratoire. Son premier objectif a été de déterminer la résistance mécanique et la composante visco-élastique de la matrice extra-cellulaire du disque intervertébral. Le second objectif consiste en la comparaison de ces données avec celles disponibles pour notre hydrogel d'HPMC-Si. Pour ce faire, des disques intervertébraux de lapins sont prélevés afin d'analyser leur propriété biomécanique par des études de fluage et de relaxation en utilisant un analyseur de texture (Texture Analyser TAHD plus, Stable Microsystems UK). Les résultats préliminaires montrent la complexité du comportement du disque intervertébral dans sa globalité. Afin de comprendre la participation de chaque élément dans le comportement global du disque intervertébral, une analyse de façon séparée de l'AF, du NP et des plateaux vertébraux est en cours. Elle devrait être facilitée grâce à l'acquisition récente d'un nouvel équipement DMA de chez Bose. Ces mêmes études seront menées également en utilisant des prélèvements de disques intervertébraux humains issus de cadavres.

IV- Discussion générale

Les travaux qui ont été entrepris au cours de cette thèse constituent des préalables indispensables au développement d'une stratégie d'ingénierie tissulaire du disque intervertébral.

Avant de traiter une maladie, il est nécessaire de bien connaître le tissu lésé et les mécanismes de son altération. Le disque intervertébral est un tissu complexe et sa régénération constitue un véritable challenge. Assimiler les cellules du NP à des chondrocytes constitue aujourd'hui une simplification. Il est difficile de penser que des cellules différenciées comme les cellules chondrocytaires pourraient permettre une réparation adaptée de la matrice extra-cellulaire du disque intervertébral.

Au cours de nos travaux, nous avons identifié des marqueurs qui s'ajoutent à ceux déjà publiés [42, 44, 45, 46, 47-51]. L'ensemble de ces données permettent de définir une signature phénotypique des cellules du NP. Cependant, il faut tenir compte des variations interspèces et qui impliquent la nécessité de confirmer certains résultats chez l'homme, notamment au regard de l'utilisation d'animaux présentant des cellules notochordales à l'âge auxquels ils sont utilisés.

Cette signature phénotypique constitue un point de départ pour définir le phénotype de différenciation des CSM qu'il sera nécessaire de respecter afin d'obtenir des cellules « NP-like » susceptibles d'être injectées. Ainsi, les cellules implantées présenteront les caractéristiques de cellules natives afin de synthétiser une MEC adaptée et conduire à la restauration du tissu. Néanmoins, de nombreuses interrogations persistent sur les modalités à suivre afin d'orienter la différenciation des CSM. C'est pourquoi les modalités d'obtention de cellules exprimant HtrA1 mais pas MGP sont un point de réflexion intéressant qu'il est possible de prendre en exemple. Quel(s) sera(ont) le(s) morphogène(s) qui permettra(ont)

cette différenciation ? Faudra-t'il utiliser des CSM modifiées génétiquement afin qu'elles n'expriment plus MGP mais au contraire HtrA1 après leur différenciation ? Quel serait l'impact de l'injection de cellules exprimant MGP et pas HtrA1 au niveau du disque dégénéré ? Est-ce que l'environnement discal suffirait à orienter la différenciation des CSM dans le cadre d'une approche *in vivo* d'ingénierie tissulaire ? Les réponses à ces questions devront être apportées afin de ne pas négliger le rapport bénéfice-risque d'une approche d'ingénierie tissulaire.

Un choix parmi les marqueurs sera nécessaire. Plus qu'un marqueur spécifique c'est l'utilisation d'un profil d'expression de quelques marqueurs qui devra être pris en compte afin de se rapprocher au plus près du phénotype de cellules du NP.

Afin d'envisager de futures applications en clinique humaine, des expérimentations chez l'animal devront être menées. De ce fait, il est crucial d'anticiper sur la pertinence du choix du modèle à utiliser. Dans ce contexte, nous avons démontré la possibilité d'utiliser le lapin comme modèle de dégénérescence spontanée, avec des modifications tissulaires et cellulaires en fonction de l'âge très proches de celles observées chez l'homme. Certains critères d'évaluation permettant de conclure à l'efficacité d'une approche d'ingénierie tissulaire ont été également validés (classification de Pfirrmann, score anatomo-pathologique de Boos).

Ces travaux permettent donc aujourd'hui d'envisager de premiers tests pré-cliniques de faisabilité sur l'animal. Toutefois, les résultats obtenus devront être confirmés avec l'aide d'un modèle animal expérimental. Malheureusement, tous ne présentent pas les critères de satisfaction préalables (taille inadaptée, morbidité importante pour les animaux, dégénérescence obtenue éloignée de la dégénérescence humaine) et il sera très certainement nécessaire de réfléchir au développement d'un nouveau modèle pertinent. Une des pistes envisagée a été le développement d'un modèle reproduisant de façon accélérée la déshydratation du NP, qui constitue un élément essentiel au cours de la dégénérescence

discale. Pour cela, l'utilisation d'un laser a été envisagée avec l'utilisation de paramètres permettant d'induire cette déshydratation. Ces travaux, menés lors de l'encadrement du Master II d'Olivier Lucas (interne en neurochirurgie), montrent la faisabilité de ce modèle induit par voie laparotomique. Contrairement à la technique d'aspiration à l'aiguille (technique de référence), la technique utilisant le laser permet d'obtenir une dégénérescence progressive dont les caractéristiques ressemblent fortement à l'atteinte tissulaire observée au cours de la dégénérescence discale chez l'homme (Figures 22 et 23). Ainsi, une diminution significative de la hauteur discale et du signal en T2 à l'IRM est observée. En parallèle de ces résultats, une évaluation histologique de l'atteinte discale a permis de démontrer l'existence de ce même processus progressif de dégénérescence tissulaire. Le score anatomo-pathologique de Boos augmente progressivement en fonction du temps post-opératoire dans la condition laser. Un manuscrit portant sur ce travail est en cours de préparation pour publication.

Tous ces travaux réunis permettent d'envisager très prochainement les futurs essais d'ingénierie tissulaire du disque intervertébral.

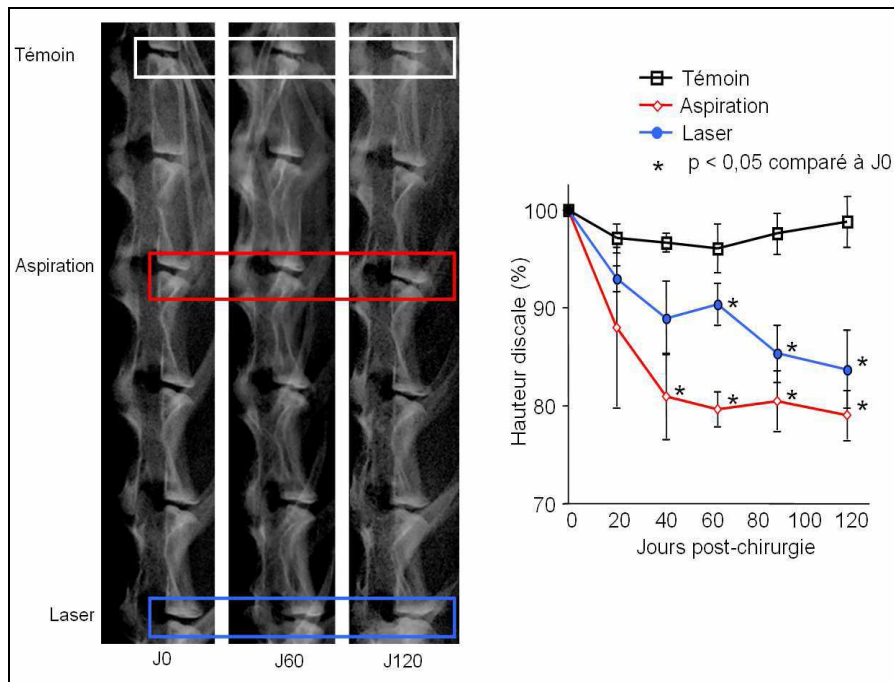


Figure 22: Suivi radiographique de la dégradation discale en fonction du temps, par aspiration à l'aiguille et par traitement laser. Une diminution significative de la hauteur discale est observée pour l'aspiration et le traitement au laser par rapport au témoin. Cette diminution de la hauteur discale est plus progressive avec le traitement au laser (J60).

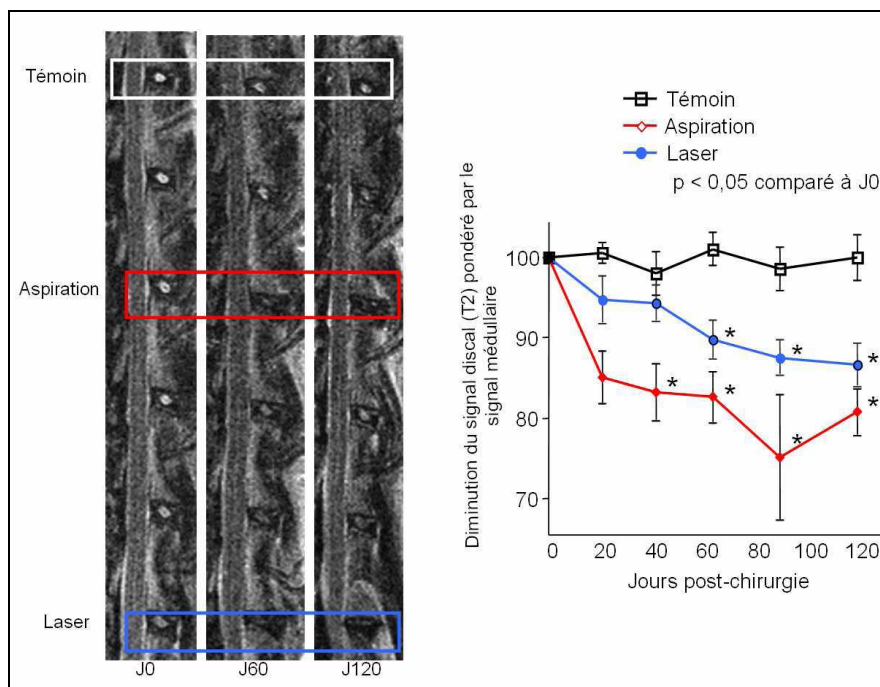


Figure 23 : Analyse par IRM de la dégradation discale en fonction du temps, par aspiration à l'aiguille et par traitement laser. Une diminution significative du signal en T2 est observée pour l'aspiration et le traitement au laser par rapport au témoin. Cette diminution de la hauteur discale est plus progressive avec le traitement au laser (J60).

PARTIE III : Conclusions générales – Perspectives

La prise en charge des patients lombalgiques pourrait d'ici quelques années connaître une évolution majeure. En effet, les traitements proposés de façon courante s'intéressent aux symptômes douloureux et ne s'occupent pas de l'origine véritable de la maladie. Cette origine est pourtant de mieux en mieux identifiée chez les patients et peut être expliquée dans 40% des cas par une dégénérescence des disques intervertébraux. Aujourd'hui, la connaissance des mécanismes menant à cette dégénérescence offre des perspectives intéressantes au regard de l'importance des cellules et de la matrice-extracellulaire qu'elles synthétisent. Il semble en effet, que la restauration d'une synthèse appropriée de cette matrice extra-cellulaire par la supplémentation en cellules offre une solution thérapeutique prometteuse. Dans ce contexte, la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire occupent une place de choix. L'analyse de la littérature montre que la thérapie cellulaire souffre d'obstacles que l'ingénierie tissulaire pourrait lever grâce à l'association de cellules avec une matrice adaptée au contexte discal. Cette approche d'ingénierie tissulaire est encore à son balbutiement et apporter la preuve de la réelle faisabilité d'un tel concept constitue un véritable challenge.

L'objectif principal de ce travail s'est inscrit dans ce contexte. Ainsi, la première étude a été consacrée à l'identification des caractéristiques du disque intervertébral au niveau tissulaire et cellulaire. Ces résultats constituent des pré-requis afin de déterminer la nature véritable des cellules du disque intervertébral. Ils serviront à définir l'objectif de différenciation des cellules souches mésenchymateuses utilisées pour permettre la formation d'un tissu approprié. Une signature phénotypique a ainsi pu être déterminée et des marqueurs potentiellement spécifiques identifiés.

La seconde étude s'est attachée à développer les outils qui permettront d'évaluer la faisabilité de notre concept d'ingénierie tissulaire. Ainsi, l'analyse de la dégénérescence discale en fonction de l'âge chez le lapin a constitué l'objectif principal de cette étude. Les objectifs secondaires étaient la validation d'outils de suivi de cette dégénérescence, notamment la

classification de Pfirrmann basée sur les images IRM et le score anatomo-pathologique de Boos. Il apparaît clairement que le lapin répond aux critères d'un modèle animal naturel ou « spontané » avec un processus de dégénérescence semblable à l'homme au niveau tissulaire et cellulaire.

Ces deux étapes sont et seront suivies d'investigations complémentaires afin de conduire aux premières études cliniques chez l'homme.

- Parmi les investigations en cours, le développement d'un modèle de dégénérescence induite a été évoqué précédemment. Il consiste en l'utilisation d'un laser afin de reproduire la déshydratation du NP. Une première étape a permis de valider ce modèle en mettant en œuvre une approche chirurgicale par voie laparotomique. Une seconde étape a été le sujet du Master II d'Anne Blanchais (interne de rhumatologie). Ce projet a eu pour objectif de valider le modèle de dégénérescence au laser, cette fois-ci par une approche chirurgicale percutanée. Cette approche mini-invasive permettrait de diminuer la morbidité chez les animaux et de se rapprocher d'autant plus des voies d'abord utilisées chez l'homme pour la chirurgie du rachis. Des résultats tout à fait satisfaisants ont été obtenus et permettent d'envisager l'utilisation de ce modèle pour des expérimentations futures. Ces résultats font l'objet d'un manuscrit en cours de préparation.

- En parallèle, au cours de l'encadrement d'Anne Blanchais, les premiers tests d'injection d'un substitut matrice (HPMC-Si) – cellules ont été réalisés. Ces premiers tests ont été menés afin de développer des méthodes de suivi de la matrice et du substitut matrice-cellules. Ces méthodes seront indispensables dans le cadre de notre projet d'ingénierie tissulaire. Les résultats confirment, d'une part, la possibilité d'observer le devenir de la matrice par microtomographie aux rayons X lorsque celle-ci a été supplémentée en sulfate de baryum, produit de contraste classiquement utilisé en médecine humaine. D'autre part, l'utilisation de cellules surexprimant la luciférase et l'évaluation de leur bioluminescence ont

été entreprises. L'observation de ces cellules après injection *in situ* a été validée mais des inconvénients semblent persister avec cette méthode. Il est ainsi envisagé d'orienter nos études vers d'autres moyens pour suivre ces cellules.

- Des investigations complémentaires, menées au sein du laboratoire, portant sur la matrice d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si) sont également en cours afin de compléter les données obtenues dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, décrites précédemment. Il s'agit notamment de la détermination du caractère résorbable de la matrice et de l'optimisation des paramètres rhéologiques de la matrice en présence ou non de cellules pour permettre une injection dans le *Nucleus pulposus*.

- Parmi les travaux qui vont être menés prochainement, l'évaluation d'un radiotracer permettant l'imagerie moléculaire fonctionnelle *in vivo* de la dégénérescence discale va être réalisée en collaboration avec une équipe de recherche de Clermont-Ferrand (Inserm U484). Ce radiotracer possède la capacité de se lier aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Son utilisation devrait permettre de suivre au niveau moléculaire la néo-formation de protéoglycanes à la suite de l'injection d'un substitut matrice-cellules.

- La réflexion autour de ce projet d'ingénierie tissulaire nous a amené également à envisager avec un intérêt certain la possibilité de coupler à cette approche la thérapie génique et notamment la possibilité de développer des ARN interférents. Ainsi, une collaboration a vu le jour avec l'équipe d'Abhay Pandit (Galway, Irlande ; Network of Excellence in Functional Biomaterials) afin d'identifier par une approche génomique certains miRNA. Ceux-ci pourraient constituer des cibles potentielles pour des ARN interférents synthétiques transfectés au sein des cellules du DIV. Afin de réaliser ce travail, des prélèvements de disques intervertébraux issus de patients en mort cérébrale ayant accepté le don d'organes seront utilisés. Ceux-ci serviront également à la réalisation de puces à ADN afin de consolider les résultats relatifs aux marqueurs phénotypiques des cellules du disque.

▪ Le domaine de la modélisation mathématique des contraintes mécaniques du disque intervertébral est également exploré dans le cadre d'une collaboration avec l'Ecole Centrale de Nantes (Violette Brulliard, Steven Le Corre et Erwan Verron). La définition d'éléments finis permettra d'appréhender la nature véritable des propriétés biomécaniques du disque intervertébral et de les relier à des données de rhéologie.

Toutes ces perspectives entrent dans le cadre d'un projet global d'ingénierie tissulaire dont la finalité est la mise en place d'essais cliniques chez l'homme afin de permettre l'émergence de cette technique au sein de l'arsenal thérapeutique pour la prise en charge du patient lombalgique. Nous avons en notre possession tous les outils nécessaires pour mener à bien ce projet :

- une matrice d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée ;
- une source de cellules (cellules souches mésenchymateuses isolées du tissu adipeux) ;
- des conditions de différenciation partiellement identifiées pour permettre la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en cellules au phénotype proche de celui de cellules du NP ;
- un modèle animal de dégénérescence spontanée ;
- un modèle animal de dégénérescence induite ;
- des méthodes et des critères d'évaluation : IRM, signal en T2 et score de Pfirrmann, radiographies et hauteur discale, histologie et score anatomo-pathologique de Boos.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Colombini, A., G. Lombardi, M.M. Corsi, and G. Banfi, *Pathophysiology of the human intervertebral disc*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(5): p. 837-42.
2. Urban, J.P. and S. Roberts, *Degeneration of the intervertebral disc*. Arthritis Res Ther, 2003. 5(3): p. 120-30.
3. Hsieh, A.H. and J.D. Twomey, *Cellular mechanobiology of the intervertebral disc: new directions and approaches*. J Biomech, 2009. 43(1): p. 137-45.
4. Marchand, F. and A.M. Ahmed, *Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus*. Spine, 1990. 15(5): p. 402-10.
5. Wallin, J., J. Wilting, H. Koseki, et al., *The role of Pax-1 in axial skeleton development*. Development, 1994. 120(5): p. 1109-21.
6. Neubuser, A., H. Koseki, and R. Balling, *Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1*. Dev Biol, 1995. 170(2): p. 701-16.
7. Joosten, P.H., E.J. van Zoelen, and C. Murre, *Pax1/E2a double-mutant mice develop non-lethal neural tube defects that resemble human malformations*. Transgenic Res, 2005. 14(6): p. 983-7.
8. Noll, M., *Evolution and role of Pax genes*. Curr Opin Genet Dev, 1993. 3(4): p. 595-605.
9. Barrionuevo, F., M.M. Taketo, G. Scherer, and A. Kispert, *Sox9 is required for notochord maintenance in mice*. Dev Biol, 2006. 295(1): p. 128-40.
10. Lefebvre, V., R.R. Behringer, and B. de Crombrughe, *L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. 9 Suppl A: p. S69-75.
11. Smits, P. and V. Lefebvre, *Sox5 and Sox6 are required for notochord extracellular matrix sheath formation, notochord cell survival and development of the nucleus pulposus of intervertebral discs*. Development, 2003. 130(6): p. 1135-48.
12. Mallo, M., T. Vinagre, and M. Carapuco, *The road to the vertebral formula*. Int J Dev Biol, 2009. 53(8-10): p. 1469-81.
13. Adams, M.A. and P.J. Roughley, *What is intervertebral disc degeneration, and what causes it?* Spine, 2006. 31(18): p. 2151-61.
14. Kaplan, K.M., J.M. Spivak, and J.A. Bendo, *Embryology of the spine and associated congenital abnormalities*. Spine J, 2005. 5(5): p. 564-76.

Références bibliographiques

15. Cassidy, J.J., A. Hiltner, and E. Baer, *Hierarchical structure of the intervertebral disc*. Connect Tissue Res, 1989. 23(1): p. 75-88.
16. Buckwalter, J.A., R.R. Cooper, and J.A. Maynard, *Elastic fibers in human intervertebral discs*. J Bone Joint Surg Am, 1976. 58(1): p. 73-6.
17. Eyre, D.R. and H. Muir, *Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus*. Biochem J, 1976. 157(1): p. 267-70.
18. Rannou, F., P. Poiraudou, M. Corvol, and M. Revel, *Biochimie et biologie du disque intervertébral*. Revue du Rhumatisme, 2000. 67 (4): p. 214-218.
19. Hayes, A.J., M. Benjamin, and J.R. Ralphs, *Extracellular matrix in development of the intervertebral disc*. Matrix Biol, 2001. 20(2): p. 107-21.
20. Johnstone, B., J.P. Urban, S. Roberts, and 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, 1992. 17(4): p. 412-6.
21. Elsaid, K.A., G.D. Jay, M.L. Warman, D.K. Rhee, and C.O. Chichester, *Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 2005. 52(6): p. 1746-55.
22. Shine, K.M. and M. Spector, *The presence and distribution of lubricin in the caprine intervertebral disc*. J Orthop Res, 2008. 26(10): p. 1398-406.
23. Shine, K.M., J.A. Simson, and M. Spector, *Lubricin distribution in the human intervertebral disc*. J Bone Joint Surg Am, 2009. 91(9): p. 2205-12.
24. Poiraudou, S., I. Monteiro, P. Anract, et al., *Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells. Comparison with cartilage cells from the same animals*. Spine, 1999. May 1;24(9): p. 837-44.
25. Kalson, N.S., S. Richardson, and J.A. Hoyland, *Strategies for regeneration of the intervertebral disc*. Regen Med, 2008. 3(5): p. 717-29.
26. Oegema, T.R., Jr., *Biochemistry of the intervertebral disc*. Clin Sports Med, 1993. 12(3): p. 419-39.
27. Chelberg, M.K., G.M. Banks, D.F. Geiger, and T.R. Oegema, Jr., *Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc*. J Anat, 1995. 186 (Pt 1): p. 43-53.
28. Sive, J.I., P. Baird, M. Jeziorski, et al., *Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs*. Mol Pathol, 2002. 55(2): p. 91-7.

Références bibliographiques

29. Anderson, D.G., M.V. Risbud, I.M. Shapiro, A.R. Vaccaro, and T.J. Albert, *Cell-based therapy for disc repair*. Spine J, 2005. 5(6 Suppl): p. 297S-303S.
30. Hunter, C.J., J.R. Matyas, and N.A. Duncan, *The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering*. Tissue Eng, 2003. 9(4): p. 667-77.
31. Hunter, C.J., J.R. Matyas, and N.A. Duncan, *The functional significance of cell clusters in the notochordal nucleus pulposus: survival and signaling in the canine intervertebral disc*. Spine, 2004. 29(10): p. 1099-104.
32. Aguiar, D.J., S.L. Johnson, and T.R. Oegema, *Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis*. Exp Cell Res, 1999. 246(1): p. 129-37.
33. Moussad, E.E. and D.R. Brigstock, *Connective tissue growth factor: what's in a name?* Mol Genet Metab, 2000. 71(1-2): p. 276-92.
34. Erwin, W.M., K. Ashman, P. O'Donnel, and R.D. Inman, *Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2006. 54(12): p. 3859-67.
35. Erwin, W.M., *The Notochord, Notochordal cell and CTGF/CCN-2: ongoing activity from development through maturation*. J Cell Commun Signal, 2008. 2(3-4): p. 59-65.
36. Rufai, A., M. Benjamin, and J.R. Ralphs, *The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc*. Anat Embryol (Berl), 1995. 192(1): p. 53-62.
37. Kim, K.W., T.H. Lim, J.G. Kim, et al., *The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs*. Spine, 2003. 28(10): p. 982-90.
38. Vujovic, S., S. Henderson, N. Presneau, et al., *Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas*. J Pathol, 2006. 209(2): p. 157-65.
39. Choi, K.S., M.J. Cohn, and B.D. Harfe, *Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: implications for disk degeneration and chordoma formation*. Dev Dyn, 2008. 237(12): p. 3953-8.
40. Anderson, D.G., M.W. Izzo, D.J. Hall, et al., *Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model*. Spine, 2002. 27(12): p. 1291-6.

Références bibliographiques

41. Mwale, F., P. Roughley, and J. Antoniou, *Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc*. Eur Cell Mater, 2004. 8: p. 58-63.
42. Fujita, N., T. Miyamoto, J. Imai, et al., *CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 338(4): p. 1890-6.
43. Risbud, M.V., A. Guttapalli, D.G. Stokes, et al., *Nucleus pulposus cells express HIF-1alpha under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment*. J Cell Biochem, 2006. 98(1): p. 152-9.
44. Ha, K.Y., I.J. Koh, P.A. Kirpalani, et al., *The expression of hypoxia inducible factor-1alpha and apoptosis in herniated discs*. Spine, 2006. 31(12): p. 1309-13.
45. Rajpurohit, R., M.V. Risbud, P. Ducheyne, E.J. Vresilovic, and I.M. Shapiro, *Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2*. Cell Tissue Res, 2002. 308(3): p. 401-7.
46. Lee, C.R., D. Sakai, T. Nakai, et al., *A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat*. Eur Spine J, 2007. 16(12): p. 2174-5.
47. Sztrolovics, R., J. Grover, G. Cs-Szabo, et al., *The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc*. J Orthop Res, 2002. 20(2): p. 257-66.
48. Minogue, B.M., S.M. Richardson, L.A. Zeef, A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Transcriptional profiling of bovine intervertebral disc cells: implications for identification of normal and degenerate human intervertebral disc cell phenotypes*. Arthritis Res Ther, 2010. 12(1): p. R22.
49. Sakai, D., T. Nakai, J. Mochida, M. Alini, and S. Grad, *Differential phenotype of intervertebral disc cells: microarray and immunohistochemical analysis of canine nucleus pulposus and annulus fibrosus*. Spine, 2009. 34(14): p. 1448-56.
50. Rutges, J., L.B. Creemers, W. Dhert, et al., *Variations in gene and protein expression in human nucleus pulposus in comparison with annulus fibrosus and cartilage cells: potential associations with aging and degeneration*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. 18(3): p. 416-23.
51. Gilson, A., M. Dreger, and J.P. Urban, *Differential expression level of cytokeratin 8 in cells of the bovine nucleus pulposus complicates the search for specific intervertebral disc cell markers*. Arthritis Res Ther, 2010. 12(1): p. R24.

Références bibliographiques

52. Roberts, S., J. Menage, and J.P. Urban, *Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc*. Spine, 1989. 14(2): p. 166-74.
53. Roberts, S., E.H. Evans, D. Kletsas, D.C. Jaffray, and S.M. Eisenstein, *Senescence in human intervertebral discs*. Eur Spine J, 2006. 15 Suppl 3: p. S312-6.
54. Bartels, E.M., J.C. Fairbank, C.P. Winlove, and J.P. Urban, *Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain*. Spine, 1998. 23(1): p. 1-7; 8.
55. Provot, S., D. Zinyk, Y. Gunes, et al., *Hif-1alpha regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development*. J Cell Biol, 2007. 177(3): p. 451-64.
56. Wang, G.L., B.H. Jiang, E.A. Rue, and G.L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(12): p. 5510-4.
57. Maynard, M.A., A.J. Evans, T. Hosomi, et al., *Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma*. Faseb J, 2005. 19(11): p. 1396-406.
58. Murphy, C.L., B.L. Thoms, R.J. Vaghjiani, and J.E. Lafont, *Hypoxia. HIF-mediated articular chondrocyte function: prospects for cartilage repair*. Arthritis Res Ther, 2009. 11(1): p. 213.
59. Agrawal, A., A. Guttapalli, S.B. Narayan, et al., *Normoxic stabilization of HIF-1{alpha} drives glycolytic metabolism and regulates aggrecan gene expression in rat nucleus pulposus cells of the intervertebral disc*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. 293(2): p. 621-31.
60. Husa, M., R. Liu-Bryan, and R. Terkeltaub, *Shifting HIFs in osteoarthritis*. Nat Med, 2010. 16(6): p. 641-4.
61. Schipani, E., H.E. Ryan, S. Didrickson, et al., *Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival*. Genes Dev, 2001. 15(21): p. 2865-76.
62. Lafont, J.E., S. Talma, and C.L. Murphy, *Hypoxia-inducible factor 2alpha is essential for hypoxic induction of the human articular chondrocyte phenotype*. Arthritis Rheum, 2007. 56(10): p. 3297-306.
63. Hirsch, C. and A. Nachemson, *New observations on the mechanical behavior of lumbar discs*. Acta Orthop Scand, 1954. 23(4): p. 254-83.

Références bibliographiques

64. Sivan, S.S., E. Tsitron, E. Wachtel, et al., *Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs*. Biochem J, 2006. 399(1): p. 29-35.
65. Sivan, S.S., E. Wachtel, E. Tsitron, et al., *Collagen turnover in normal and degenerate human intervertebral discs as determined by the racemization of aspartic acid*. J Biol Chem, 2008. 283(14): p. 8796-801.
66. Iatridis, J.C., M. Weidenbaum, L.A. Setton, and V.C. Mow, *Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc*. Spine, 1996. 21(10): p. 1174-84.
67. Setton, L.A. and J. Chen, *Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration*. J Bone Joint Surg Am, 2006. 88 Suppl 2: p. 52-7.
68. Iatridis, J.C., J.J. MacLean, P.J. Roughley, and M. Alini, *Effects of mechanical loading on intervertebral disc metabolism in vivo*. J Bone Joint Surg Am, 2006. 88 Suppl 2: p. 41-6.
69. Lotz, J.C., A. Staples, A. Walsh, and A.H. Hsieh, *Mechanobiology in intervertebral disc degeneration and regeneration*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2004. 7: p. 5459.
70. Masuoka, K., A.J. Michalek, J.J. MacLean, I.A. Stokes, and J.C. Iatridis, *Different effects of static versus cyclic compressive loading on rat intervertebral disc height and water loss in vitro*. Spine, 2007. 32(18): p. 1974-9.
71. Le Maitre, C.L., J. Frain, J. Millward-Sadler, et al., *Altered integrin mechanotransduction in human nucleus pulposus cells derived from degenerated discs*. Arthritis Rheum, 2009. 60(2): p. 460-9.
72. Li, S., V.C. Duance, and E.J. Blain, *Zonal variations in cytoskeletal element organization, mRNA and protein expression in the intervertebral disc*. J Anat, 2008. 213(6): p. 725-32.
73. Roberts, S., S.M. Eisenstein, J. Menage, E.H. Evans, and I.K. Ashton, *Mechanoreceptors in intervertebral discs. Morphology, distribution, and neuropeptides*. Spine, 1995. 20(24): p. 2645-51.
74. Dimitroulias, A., C. Tsonidis, K. Natsis, et al., *An immunohistochemical study of mechanoreceptors in lumbar spine intervertebral discs*. J Clin Neurosci, 2010. 17(6): p. 742-5.

Références bibliographiques

75. Bechmann, I., G. Mor, J. Nilsen, et al., *FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier*. *Glia*, 1999. 27(1): p. 62-74.
76. Griffith, T.S., T. Brunner, S.M. Fletcher, D.R. Green, and T.A. Ferguson, *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege*. *Science*, 1995. 270(5239): p. 1189-92.
77. Bellgrau, D., D. Gold, H. Selawry, et al., *A role for CD95 ligand in preventing graft rejection*. *Nature*, 1995. 377(6550): p. 630-2.
78. Runic, R., C.J. Lockwood, Y. Ma, B. Dipasquale, and S. Guller, *Expression of Fas ligand by human cytotrophoblasts: implications in placentation and fetal survival*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81(8): p. 3119-22.
79. Nishida, K., J.D. Kang, L.G. Gilbertson, et al., *Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene*. *Spine*, 1999. 24(23): p. 2419-25.
80. Nishida, K., J.D. Kang, J.K. Suh, et al., *Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration*. *Spine*, 1998. 23(22): p. 2437-42; 2443.
81. Bobechko, W.P. and C. Hirsch, *Auto-Immune Response to Nucleus Pulposus in the Rabbit*. *J Bone Joint Surg Br*, 1965. 47: p. 574-80.
82. Gertzbein, S.D., J.H. Tait, and S.R. Devlin, *The stimulation of lymphocytes by nucleus pulposus in patients with degenerative disk disease of the lumbar spine*. *Clin Orthop Relat Res*, 1977(123): p. 149-54.
83. McCarron, R.F., M.W. Wimpee, P.G. Hudkins, and G.S. Laros, *The inflammatory effect of nucleus pulposus. A possible element in the pathogenesis of low-back pain*. *Spine*, 1987. 12(8): p. 760-4.
84. Olmarker, K., J. Blomquist, J. Stromberg, et al., *Inflammatogenic properties of nucleus pulposus*. *Spine*, 1995. 20(6): p. 665-9.
85. Satoh, K., S. Konno, K. Nishiyama, K. Olmarker, and S. Kikuchi, *Presence and distribution of antigen-antibody complexes in the herniated nucleus pulposus*. *Spine*, 1999. 24(19): p. 1980-4.
86. Takada, T., K. Nishida, M. Doita, and M. Kurosaka, *Fas ligand exists on intervertebral disc cells: a potential molecular mechanism for immune privilege of the disc*. *Spine*, 2002. 27(14): p. 1526-30.

Références bibliographiques

87. Inui, Y., K. Nishida, M. Doita, et al., *Fas-ligand expression on nucleus pulposus begins in developing embryo*. Spine, 2004. 29(21): p. 2365-9.
88. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor*. Science, 1995. 267(5203): p. 1449-56.
89. Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, and S. Nagata, *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. 75(6): p. 1169-78.
90. Kaneyama, S., K. Nishida, T. Takada, et al., *Fas ligand expression on human nucleus pulposus cells decreases with disc degeneration processes*. J Orthop Sci, 2008. 13(2): p. 130-5.
91. Wang, J., T. Tang, H. Yang, et al., *The expression of Fas ligand on normal and stabbed-disc cells in a rabbit model of intervertebral disc degeneration: a possible pathogenesis*. J Neurosurg Spine, 2007. 6(5): p. 425-30.
92. Valat, J.P., S. Rozenberg, and L. Bellaïche, *Lombalgie. Critères cliniques et d'imagerie*. Revue du Rhumatisme, 2010. 77: p. 158-166.
93. Deyo, R.A. and J.N. Weinstein, *Low back pain*. N Engl J Med, 2001. 344(5): p. 363-70.
94. Luoma, K., H. Riihimaki, R. Luukkonen, et al., *Low back pain in relation to lumbar disc degeneration*. Spine, 2000. 25(4): p. 487-92.
95. Cotten, A. and X. Demondion, *Développement et vieillissement du DIV lombaire*. Rev Rhum, 2000. 67 (4): p. 207-13.
96. Anderson, D.G. and C. Tannoury, *Molecular pathogenic factors in symptomatic disc degeneration*. Spine J, 2005. 5(6 Suppl): p. 260S-266S.
97. Modic, M.T., T.J. Masaryk, J.S. Ross, and J.R. Carter, *Imaging of degenerative disk disease*. Radiology, 1988. 168(1): p. 177-86.
98. Modic, M.T., P.M. Steinberg, J.S. Ross, T.J. Masaryk, and J.R. Carter, *Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging*. Radiology, 1988. 166(1 Pt 1): p. 193-9.
99. Boden, S.D., D.O. Davis, T.S. Dina, N.J. Patronas, and S.W. Wiesel, *Abnormal magnetic-resonance scans of the lumbar spine in asymptomatic subjects. A prospective investigation*. J Bone Joint Surg Am, 1990. 72(3): p. 403-8.
100. Jensen, M.C., M.N. Brant-Zawadzki, N. Obuchowski, et al., *Magnetic resonance imaging of the lumbar spine in people without back pain*. N Engl J Med, 1994. 331(2): p. 69-73.

Références bibliographiques

101. Roberts, S., H. Evans, J. Trivedi, and J. Menage, *Histology and pathology of the human intervertebral disc*. J Bone Joint Surg Am, 2006. 88 Suppl 2: p. 10-4.
102. Sowa, G., G. Vadala, R. Studer, et al., *Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression*. Spine, 2008. 33(17): p. 1821-8.
103. Freemont, A.J., *The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain*. Rheumatology, 2009. 48(1): p. 5-10.
104. Kim, K.W., H.N. Chung, K.Y. Ha, J.S. Lee, and Y.Y. Kim, *Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs*. Spine J, 2009. 9(8): p. 658-66.
105. Le Maitre, C.L., A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration*. Arthritis Res Ther, 2007. 9(3): p. R45.
106. Gruber, H.E., J.A. Ingram, H.J. Norton, and E.N. Hanley, Jr., *Senescence in cells of the aging and degenerating intervertebral disc: immunolocalization of senescence-associated beta-galactosidase in human and sand rat discs*. Spine, 2007. 32(3): p. 321-7.
107. Homma, Y., M. Tsunoda, and H. Kasai, *Evidence for the accumulation of oxidative stress during cellular ageing of human diploid fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. 203(2): p. 1063-8.
108. Martin, J.A., T.D. Brown, A.D. Heiner, and J.A. Buckwalter, *Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis*. Clin Orthop Relat Res, 2004(427 Suppl): p. S96-103.
109. Dai, S.M., Z.Z. Shan, H. Nakamura, et al., *Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2006. 54(3): p. 818-31.
110. Antoniou, J., T. Steffen, F. Nelson, et al., *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, 1996. 98(4): p. 996-1003.
111. Thompson, J.P., R.H. Pearce, M.T. Schechter, et al., *Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc*. Spine, 1990. 15(5): p. 411-5.

Références bibliographiques

112. Boos, N., S. Weissbach, H. Rohrbach, et al., *Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science*. Spine, 2002. 27(23): p. 2631-44.
113. Hadjipavlou, A.G., M.N. Tzermiadianos, N. Bogduk, and M.R. Zindrick, *The pathophysiology of disc degeneration: a critical review*. J Bone Joint Surg Br, 2008. 90(10): p. 1261-70.
114. Mavrogenatou, E. and D. Kletsas, *High osmolality activates the G1 and G2 cell cycle checkpoints and affects the DNA integrity of nucleus pulposus intervertebral disc cells triggering an enhanced DNA repair response*. DNA Repair, 2009. 8(8): p. 930-43.
115. Freemont, A.J., T.E. Peacock, P. Goupille, et al., *Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain*. Lancet, 1997. 350(9072): p. 178-81.
116. Coppes, M.H., E. Marani, R.T. Thomeer, and G.J. Groen, *Innervation of "painful" lumbar discs*. Spine, 1997. 22(20): p. 2342-9; 2349-50.
117. Diamant, B., J. Karlsson, and A. Nachemson, *Correlation between lactate levels and pH in discs of patients with lumbar rhizopathies*. Experientia, 1968. 24(12): p. 1195-6.
118. Nachemson, A., *Intradiscal measurements of pH in patients with lumbar rhizopathies*. Acta Orthop Scand, 1969. 40(1): p. 23-42.
119. Razaq, S., R.J. Wilkins, and J.P. Urban, *The effect of extracellular pH on matrix turnover by cells of the bovine nucleus pulposus*. Eur Spine J, 2003. 12(4): p. 341-9.
120. Rutges, J.P., R.A. Duit, J.A. Kummer, et al., *Hypertrophic Differentiation and Calcification During Intervertebral Disc Degeneration*. Osteoarthritis Cartilage, 2010.
121. Buttle, D.J., *Factors controlling matrix turnover in health and disease*. Biochem Soc Trans, 2007. 35(Pt 4): p. 643-6.
122. Peng, B., J. Chen, Z. Kuang, et al., *Expression and role of connective tissue growth factor in painful disc fibrosis and degeneration*. Spine, 2009. 34(5): p. E178-82.
123. Yoon, S.T., *Molecular therapy of the intervertebral disc*. Spine J, 2005. 5(6 Suppl): p. 280S-286S.
124. Ali, R., C.L. Le Maitre, S.M. Richardson, J.A. Hoyland, and A.J. Freemont, *Connective tissue growth factor expression in human intervertebral disc: implications for angiogenesis in intervertebral disc degeneration*. Biotech Histochem, 2008. 83(5): p. 239-45.
125. Li, X., H.S. An, M. Ellman, et al., *Action of fibroblast growth factor-2 on the intervertebral disc*. Arthritis Res Ther, 2008. 10(2): p. R48.

Références bibliographiques

126. Hoyland, J.A., C. Le Maitre, and A.J. Freemont, *Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc*. Rheumatology, 2008. 47(6): p. 809-14.
127. Le Maitre, C.L., A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration*. Arthritis Res Ther, 2005. 7(4): p. R732-45.
128. Weiler, C., A.G. Nerlich, J. Zipperer, B.E. Bachmeier, and 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, 2002. 11(4): p. 308-20.
129. Roberts, S., B. Caterson, J. Menage, et al., *Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc*. Spine, 2000. 25(23): p. 3005-13.
130. Rutges, J.P., J.A. Kummer, F.C. Oner, et al., *Increased MMP-2 activity during intervertebral disc degeneration is correlated to MMP-14 levels*. J Pathol, 2008. 214(4): p. 523-30.
131. Le Maitre, C.L., A. Pockert, D.J. Buttle, A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration*. Biochem Soc Trans, 2007. 35(Pt 4): p. 652-5.
132. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res, 2003. 92(8): p. 827-39.
133. Bachmeier, B.E., A. Nerlich, N. Mittermaier, et al., *Matrix metalloproteinase expression levels suggest distinct enzyme roles during lumbar disc herniation and degeneration*. Eur Spine J, 2009. 18(11): p. 1573-86.
134. Goupille, P., M.I. Jayson, J.P. Valat, and A.J. Freemont, *Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration?* Spine, 1998. 23(14): p. 1612-26.
135. Nemoto, O., M. Yamagishi, H. Yamada, T. Kikuchi, and H. Takaishi, *Matrix metalloproteinase-3 production by human degenerated intervertebral disc*. J Spinal Disord, 1997. 10(6): p. 493-8.
136. Pockert, A.J., S.M. Richardson, C.L. Le Maitre, et al., *Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration*. Arthritis Rheum, 2009. 60(2): p. 482-91.

Références bibliographiques

137. Gunja-Smith, Z. and J.F. Woessner, Jr., *Activation of cartilage stromelysin-1 at acid pH and its relation to enzyme pH optimum and osteoarthritis*. Agents Actions, 1993. 40(3-4): p. 228-31.
138. Ariga, K., K. Yonenobu, T. Nakase, et al., *Localization of cathepsins D, K, and L in degenerated human intervertebral discs*. Spine, 2001. 26(24): p. 2666-72.
139. Cawston, T., C. Billington, C. Cleaver, et al., *The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover*. Ann N Y Acad Sci, 1999. 878: p. 120-9.
140. Richardson, S.M., P. Doyle, B.M. Minogue, K. Gnanalingham, and J.A. Hoyland, *Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral disc*. Arthritis Res Ther, 2009. 11(4): p. R126.
141. Wako, M., H. Haro, T. Ando, et al., *Novel function of TWEAK in inducing intervertebral disc degeneration*. J Orthop Res, 2007. 25(11): p. 1438-46.
142. Huh, H., Y.J. Lee, J.H. Kim, et al., *The Effects of TWEAK, Fn14, and TGF-beta1 on Degeneration of Human Intervertebral Disc*. J Korean Neurosurg Soc, 2010. 47(1): p. 30-5.
143. Iida, R., K. Akeda, Y. Kasai, et al., *Expression of proteinase-activated receptor-2 in the intervertebral disc*. Spine, 2009. 34(5): p. 470-8.
144. Ohba, T., H. Haro, T. Ando, et al., *TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues*. J Orthop Res, 2009. 27(2): p. 229-35.
145. Zhao, C.Q., L.M. Wang, L.S. Jiang, and L.Y. Dai, *The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration*. Ageing Res Rev, 2007. 6(3): p. 247-61.
146. Park, J.B., H. Chang, and K.W. Kim, *Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue*. Spine, 2001. 26(6): p. 618-21.
147. Ariga, K., K. Yonenobu, T. Nakase, et al., *Mechanical stress-induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral discs: an ex vivo study*. Spine, 2003. 28(14): p. 1528-33.
148. Heyde, C.E., S.K. Tschoeke, M. Hellmuth, et al., *Trauma induces apoptosis in human thoracolumbar intervertebral discs*. BMC Clin Pathol, 2006. 6: p. 5.
149. Zhao, C.Q., L.S. Jiang, and L.Y. Dai, *Programmed cell death in intervertebral disc degeneration*. Apoptosis, 2006. 11(12): p. 2079-88.
150. Han, D., Y. Ding, S.L. Liu, et al., *Double role of Fas ligand in the apoptosis of intervertebral disc cells in vitro*. Acta Biochim Biophys Sin, 2009. 41(11): p. 938-47.

Références bibliographiques

151. Bertram, H., A. Nerlich, G. Omlor, et al., *Expression of TRAIL and the death receptors DR4 and DR5 correlates with progression of degeneration in human intervertebral disks*. Mod Pathol, 2009. 22(7): p. 895-905.
152. Chen, J., W. Yan, and L.A. Setton, *Molecular phenotypes of notochordal cells purified from immature nucleus pulposus*. Eur Spine J, 2006. 15 Suppl 3: p. 303-11.
153. Oguz, E., T.T. Tsai, A. Di Martino, et al., *Galectin-3 expression in the intervertebral disc: a useful marker of the notochord phenotype?* Spine, 2007. 32(1): p. 9-16.
154. Horner, H.A. and 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, 2001. 26(23): p. 2543-9.
155. Ishii, T., H. Tsuji, A. Sano, et al., *Histochemical and ultrastructural observations on brown degeneration of human intervertebral disc*. J Orthop Res, 1991. 9(1): p. 78-90.
156. Ohshima, H. and J.P. Urban, *The effect of lactate and pH on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc*. Spine, 1992. 17(9): p. 1079-82.
157. Videman, T., L.E. Gibbons, M.C. Battie, et al., *The relative roles of intragenic polymorphisms of the vitamin d receptor gene in lumbar spine degeneration and bone density*. Spine, 2001. 26(3): p. E7-E12.
158. Kawaguchi, Y., M. Kanamori, H. Ishihara, et al., *The association of lumbar disc disease with vitamin-D receptor gene polymorphism*. J Bone Joint Surg Am, 2002. 84-A(11): p. 2022-8.
159. Smit, T.H., *The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations*. Eur Spine J, 2002. 11(2): p. 137-44.
160. Wilke, H.J., A. Rohlmann, S. Neller, et al., *ISSLS prize winner: A novel approach to determine trunk muscle forces during flexion and extension: a comparison of data from an in vitro experiment and in vivo measurements*. Spine, 2003. 28(23): p. 2585-93.
161. O'Connell, G.D., E.J. Vresilovic, and D.M. Elliott, *Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry*. Spine, 2007. 32(3): p. 328-33.
162. Alini, M., S.M. Eisenstein, K. Ito, et al., *Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration?* Eur Spine J, 2008. 17(1): p. 2-19.
163. Lotz, J.C., *Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned*. Spine, 2004. 29(23): p. 2742-50.

Références bibliographiques

164. Elliott, D.M. and J.J. Sarver, *Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc*. Spine, 2004. 29(7): p. 713-22.
165. Sahlman, J., R. Inkinen, T. Hirvonen, et al., *Premature vertebral endplate ossification and mild disc degeneration in mice after inactivation of one allele belonging to the Col2a1 gene for Type II collagen*. Spine, 2001. 26(23): p. 2558-65.
166. Kimura, T., K. Nakata, N. Tsumaki, et al., *Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation*. Int Orthop, 1996. 20(3): p. 177-81.
167. Weinreich, S., B. Hoebe, and P. Ivanyi, *Maternal age influences risk for HLA-B27 associated ankylosing enthesopathy in transgenic mice*. Ann Rheum Dis, 1995. 54(9): p. 754-6.
168. Kroeber, M.W., F. Unglaub, H. Wang, et al., *New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration*. Spine, 2002. 27(23): p. 2684-90.
169. Phillips, F.M., J. Reuben, and F.T. Wetzel, *Intervertebral disc degeneration adjacent to a lumbar fusion. An experimental rabbit model*. J Bone Joint Surg Br, 2002. 84(2): p. 289-94.
170. Stokes, I.A., D.F. Counts, and J.W. Frymoyer, *Experimental instability in the rabbit lumbar spine*. Spine, 1989. 14(1): p. 68-72.
171. Kaigle, A.M., S.H. Holm, and T.H. Hansson, *Kinematic behavior of the porcine lumbar spine: a chronic lesion model*. Spine, 1997. 22(24): p. 2796-806.
172. Sobajima, S., J.F. Kompel, J.S. Kim, et al., *A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology*. Spine, 2005. 30(1): p. 15-24.
173. Kim, K.S., S.T. Yoon, J. Li, J.S. Park, and W.C. Hutton, *Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models*. Spine, 2005. 30(1): p. 33-7.
174. Yamada, K., S. Tanabe, H. Ueno, et al., *Investigation of the short-term effect of chemonucleolysis with chondroitinase ABC*. J Vet Med Sci, 2001. 63(5): p. 521-5.
175. Zhou, H., S. Hou, W. Shang, et al., *A new in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration characterized by MRI, radiography, CT/discogram, biochemistry, and histology*. Spine, 2007. 32(8): p. 864-72.

Références bibliographiques

176. Millward-Sadler, S.J. and J.A. Hoyland. *Comparison of intervertebral disc and articular cartilage*. in *ICRS, International Cartilage Repair Society*. 2007. Warsaw, Poland.
177. Kalichman, L. and D.J. Hunter, *The genetics of intervertebral disc degeneration. Associated genes*. *Joint Bone Spine*, 2008. 75(4): p. 388-96.
178. Andersson, G.B., *Epidemiological features of chronic low-back pain*. *Lancet*, 1999. 354(9178): p. 581-5.
179. Hohaus, C., T.M. Ganey, Y. Minkus, and H.J. Meisel, *Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease*. *Eur Spine J*, 2008. 17 Suppl 4: p. 492-503.
180. Cheung, K.M., J. Karppinen, D. Chan, et al., *Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals*. *Spine*, 2009. 34(9): p. 934-40.
181. Battie, M.C., T. Videman, and E. Parent, *Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetic influences*. *Spine*, 2004. 29(23): p. 2679-90.
182. Battie, M.C., T. Videman, J. Kaprio, et al., *The Twin Spine Study: contributions to a changing view of disc degeneration*. *Spine J*, 2009. 9(1): p. 47-59.
183. Kawaguchi, Y., R. Osada, M. Kanamori, et al., *Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration*. *Spine*, 1999. 24(23): p. 2456-60.
184. Pluijm, S.M., H.W. van Essen, N. Bravenboer, et al., *Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women*. *Ann Rheum Dis*, 2004. 63(1): p. 71-7.
185. Bei, T., C. Tilkeridis, S. Garantziotis, et al., *A novel, non-functional, COL1A1 polymorphism is not associated with lumbar disk disease in young male Greek subjects unlike that of the Sp1 site*. *Hormones*, 2008. 7(3): p. 251-4.
186. Annunen, S., P. Paasilta, J. Lohiniva, et al., *An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease*. *Science*, 1999. 285(5426): p. 409-12.
187. Karppinen, J., E. Paakko, S. Raina, et al., *Magnetic resonance imaging findings in relation to the COL9A2 tryptophan allele among patients with sciatica*. *Spine*, 2002. 27(1): p. 78-83.
188. Seki, S., Y. Kawaguchi, M. Mori, et al., *Association study of COL9A2 with lumbar disc disease in the Japanese population*. *J Hum Genet*, 2006. 51(12): p. 1063-7.
189. Wrocklage, C., H. Wassmann, and W. Paulus, *COL9A2 allelotypes in intervertebral disc disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 279(2): p. 398-400.

Références bibliographiques

190. Mio, F., K. Chiba, Y. Hirose, et al., *A functional polymorphism in COL11A1, which encodes the alpha 1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation*. Am J Hum Genet, 2007. 81(6): p. 1271-7.
191. Urano, T., K. Narusawa, S. Kobayashi, et al., *Association of HTRAI promoter polymorphism with spinal disc degeneration in Japanese women*. J Bone Miner Metab, 2009. 28(11): p. 220-6.
192. Kizawa, H., I. Kou, A. Iida, et al., *An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis*. Nat Genet, 2005. 37(2): p. 138-44.
193. Gruber, H.E., J.A. Ingram, G.L. Hoelscher, et al., *Asporin, a susceptibility gene in osteoarthritis, is expressed at higher levels in the more degenerate human intervertebral disc*. Arthritis Res Ther, 2009. 11(2): p. R47.
194. Virtanen, I.M., Y.Q. Song, K.M. Cheung, et al., *Phenotypic and population differences in the association between CILP and lumbar disc disease*. J Med Genet, 2007. 44(4): p. 285-8.
195. Takahashi, M., H. Haro, Y. Wakabayashi, et al., *The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene*. J Bone Joint Surg Br, 2001. 83(4): p. 491-5.
196. Heliovaara, M., O. Impivaara, K. Sievers, et al., *Lumbar disc syndrome in Finland*. J Epidemiol Community Health, 1987. 41(3): p. 251-8.
197. Nojonen-Hietala, N., I. Virtanen, R. Karttunen, et al., *Genetic variations in IL6 associate with intervertebral disc disease characterized by sciatica*. Pain, 2005. 114(1-2): p. 186-94.
198. Valdes, A.M., G. Hassett, D.J. Hart, and T.D. Spector, *Radiographic progression of lumbar spine disc degeneration is influenced by variation at inflammatory genes: a candidate SNP association study in the Chingford cohort*. Spine, 2005. 30(21): p. 2445-51.
199. Durocher, A. and S. Laversin, *Recommandations de l'ANAES pour le suivi, la prise en charge et le suivi des malades atteints de lombalgie chronique*. Available from: www.has-sante.fr, 2000.
200. Zhang, W., M. Doherty, B.F. Leeb, et al., *EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCSIT)*. Ann Rheum Dis, 2007. 66(3): p. 377-88.

Références bibliographiques

201. Zhang, W., R.W. Moskowitz, G. Nuki, et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(2): p. 137-62.
202. Chrubasik, S., H. Junck, H. Breitschwerdt, C. Conradt, and H. Zappe, *Effectiveness of Harpagophytum extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomized, placebo-controlled, double-blind study*. *Eur J Anaesthesiol*, 1999. 16(2): p. 118-29.
203. Valat, J.P. and S. Rozenberg, *Local corticosteroid injections for low back pain and sciatica*. *Joint Bone Spine*, 2008. 75(4): p. 403-7.
204. Martin, B.I., S.K. Mirza, B.A. Comstock, et al., *Are lumbar spine reoperation rates falling with greater use of fusion surgery and new surgical technology?* *Spine*, 2007. 32(19): p. 2119-26.
205. DiPaola, C.P. and R.W. Molinari, *Posterior lumbar interbody fusion*. *J Am Acad Orthop Surg*, 2008. 16(3): p. 130-9.
206. Deyo, R.A. and S.K. Mirza, *Trends and variations in the use of spine surgery*. *Clin Orthop Relat Res*, 2006. 443: p. 139-46.
207. Brower, R.S. and N.M. Vickroy, *A case of psoas ossification from the use of BMP-2 for posterolateral fusion at L4-L5*. *Spine*, 2008. 33(18): p. E653-5.
208. Wong, D.A., A. Kumar, S. Jatana, G. Ghiselli, and K. Wong, *Neurologic impairment from ectopic bone in the lumbar canal: a potential complication of off-label PLIF/TLIF use of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)*. *Spine J*, 2008. 8(6): p. 1011-8.
209. Garrison, K.R., S. Donell, J. Ryder, et al., *Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review*. *Health Technol Assess*, 2007. 11(30): p. 1-150, iii-iv.
210. Lewandrowski, K.U., C. Nanson, and R. Calderon, *Vertebral osteolysis after posterior interbody lumbar fusion with recombinant human bone morphogenetic protein 2: a report of five cases*. *Spine J*, 2007. 7(5): p. 609-14.
211. McClellan, J.W., D.S. Mulconrey, R.J. Forbes, and N. Fullmer, *Vertebral bone resorption after transforaminal lumbar interbody fusion with bone morphogenetic protein (rhBMP-2)*. *J Spinal Disord Tech*, 2006. 19(7): p. 483-6.
212. Joseph, V. and Y.R. Rampersaud, *Heterotopic bone formation with the use of rhBMP2 in posterior minimal access interbody fusion: a CT analysis*. *Spine*, 2007. 32(25): p. 2885-90.

Références bibliographiques

213. Perri, B., M. Cooper, C. Lauryssen, and N. Anand, *Adverse swelling associated with use of rh-BMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion: a case study*. Spine J, 2007. 7(2): p. 235-9.
214. Aslan, H., D. Sheyn, and D. Gazit, *Genetically engineered mesenchymal stem cells: applications in spine therapy*. Regen Med, 2009. 4(1): p. 99-108.
215. Wang, J.C., L.E. Kanim, S. Yoo, et al., *Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats*. J Bone Joint Surg Am, 2003. 85-A(5): p. 905-11.
216. Peterson, B., R. Iglesias, J. Zhang, J.C. Wang, and J.R. Lieberman, *Genetically modified human derived bone marrow cells for posterolateral lumbar spine fusion in athymic rats: beyond conventional autologous bone grafting*. Spine, 2005. 30(3): p. 283-9; 289-90.
217. Hsu, W.K., J.C. Wang, N.Q. Liu, et al., *Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model*. J Bone Joint Surg Am, 2008. 90(5): p. 1043-52.
218. Miyazaki, M., O. Sugiyama, J. Zou, et al., *Comparison of lentiviral and adenoviral gene therapy for spinal fusion in rats*. Spine, 2008. 33(13): p. 1410-7.
219. Sheyn, D., G. Pelled, Y. Zilberman, et al., *Nonvirally engineered porcine adipose tissue-derived stem cells: use in posterior spinal fusion*. Stem Cells, 2008. 26(4): p. 1056-64.
220. Dumont, R.J., H. Dayoub, J.Z. Li, et al., *Ex vivo bone morphogenetic protein-9 gene therapy using human mesenchymal stem cells induces spinal fusion in rodents*. Neurosurgery, 2002. 51(5): p. 1239-44; 1244-5.
221. Fairbank, J., H. Frost, J. Wilson-MacDonald, et al., *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*. Bmj, 2005. 330(7502): p. 1233.
222. Lin, E.L. and J.C. Wang, *Total disk arthroplasty*. J Am Acad Orthop Surg, 2006. 14(13): p. 705-14.
223. O'Halloran D, M. and A.S. Pandit, *Tissue-Engineering Approach to Regenerating the Intervertebral Disc*. Tissue Eng, 2007. 13(8): p. 1927-54.
224. Szpalski, M., R. Gunzburg, and M. Mayer, *Spine arthroplasty: a historical review*. Eur Spine J, 2002. 11 Suppl 2: p. S65-84.

Références bibliographiques

225. Bono, C.M. and S.R. Garfin, *History and evolution of disc replacement*. Spine J, 2004. 4(6 Suppl): p. 145S-150S.
226. Anderson, P.A. and J.P. Rouleau, *Intervertebral disc arthroplasty*. Spine, 2004. 29(23): p. 2779-86.
227. Gamradt, S.C. and J.C. Wang, *Lumbar disc arthroplasty*. Spine J, 2005. 5(1): p. 95-103.
228. Zeh, A., M. Planert, G. Siegert, et al., *Release of cobalt and chromium ions into the serum following implantation of the metal-on-metal Maverick-type artificial lumbar disc (Medtronic Sofamor Danek)*. Spine, 2007. 32(3): p. 348-52.
229. Damie, F. and L. Favard, *Metal serum levels in 48 patients bearing a chromium-cobalt total hip arthroplasty with a metal-on-polyethylene combination*. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot, 2004. 90(3): p. 241-8.
230. Freeman, B.J. and J. Davenport, *Total disc replacement in the lumbar spine: a systematic review of the literature*. Eur Spine J, 2006. 15 Suppl 3: p. S439-47.
231. van den Eerenbeemt, K.D., R.W. Ostelo, B.J. van Royen, W.C. Peul, and M.W. van Tulder, *Total disc replacement surgery for symptomatic degenerative lumbar disc disease: a systematic review of the literature*. Eur Spine J, 2010. 19(8): p. 1262-80.
232. Guyer, R.D., P.C. McAfee, S.H. Hochschuler, et al., *Prospective randomized study of the Charite artificial disc: data from two investigational centers*. Spine J, 2004. 4(6 Suppl): p. 252S-259S.
233. David, T., *Long-term results of one-level lumbar arthroplasty: minimum 10-year follow-up of the CHARITE artificial disc in 106 patients*. Spine, 2007. 32(6): p. 661-6.
234. Lemaire, J.P., W. Skalli, F. Lavaste, et al., *Intervertebral disc prosthesis. Results and prospects for the year 2000*. Clin Orthop Relat Res, 1997(337): p. 64-76.
235. Le Huec, J.C., H. Mathews, Y. Basso, et al., *Clinical results of Maverick lumbar total disc replacement: two-year prospective follow-up*. Orthop Clin North Am, 2005. 36(3): p. 315-22.
236. McAfee, P.C., B. Cunningham, G. Holsapple, et al., *A prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemption study of lumbar total disc replacement with the CHARITE artificial disc versus lumbar fusion: part II: evaluation of radiographic outcomes and correlation of surgical technique accuracy with clinical outcomes*. Spine, 2005. 30(14): p. 1576-83; E388-90.
237. Blumenthal, S., P.C. McAfee, R.D. Guyer, et al., *A prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemptions study of*

- lumbar total disc replacement with the CHARITE artificial disc versus lumbar fusion: part I: evaluation of clinical outcomes.* Spine, 2005. 30(14): p. 1565-75; E387-91.
238. Zeegers, W.S., L.M. Bohnen, M. Laaper, and M.J. Verhaegen, *Artificial disc replacement with the modular type SB Charite III: 2-year results in 50 prospectively studied patients.* Eur Spine J, 1999. 8(3): p. 210-7.
239. Cinotti, G., T. David, and F. Postacchini, *Results of disc prosthesis after a minimum follow-up period of 2 years.* Spine, 1996. 21(8): p. 995-1000.
240. Griffith, S.L., A.P. Shelokov, K. Buttner-Janz, J.P. LeMaire, and W.S. Zeegers, *A multicenter retrospective study of the clinical results of the LINK SB Charite intervertebral prosthesis. The initial European experience.* Spine, 1994. 19(16): p. 1842-9.
241. Regan, J.J., *Clinical results of charite lumbar total disc replacement.* Orthop Clin North Am, 2005. 36(3): p. 323-40.
242. Ross, R., A.H. Mirza, H.E. Norris, and M. Khatri, *Survival and clinical outcome of SB Charite III disc replacement for back pain.* J Bone Joint Surg Br, 2007. 89(6): p. 785-9.
243. Warachit, P., *Results of Charite artificial lumbar disc replacement: experience in 43 Thais.* J Med Assoc Thai, 2008. 91(8): p. 1212-7.
244. Sasso, R.C., D.M. Foulk, and M. Hahn, *Prospective, randomized trial of metal-on-metal artificial lumbar disc replacement: initial results for treatment of discogenic pain.* Spine, 2008. 33(2): p. 123-31.
245. Fraser, R.D., E.R. Ross, G.L. Lowery, B.J. Freeman, and M. Dolan, *AcroFlex design and results.* Spine J, 2004. 4(6 Suppl): p. 245S-251S.
246. Zigler, J., R. Delamarter, J.M. Spivak, et al., *Results of the prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemption study of the ProDisc-L total disc replacement versus circumferential fusion for the treatment of 1-level degenerative disc disease.* Spine, 2007. 32(11): p. 1155-62; 1163.
247. Tropiano, P., R.C. Huang, F.P. Girardi, and T. Marnay, *Lumbar disc replacement: preliminary results with ProDisc II after a minimum follow-up period of 1 year.* J Spinal Disord Tech, 2003. 16(4): p. 362-8.
248. Bertagnoli, R. and S. Kumar, *Indications for full prosthetic disc arthroplasty: a correlation of clinical outcome against a variety of indications.* Eur Spine J, 2002. 11 Suppl 2: p. S131-6.

Références bibliographiques

249. Mayer, H.M., K. Wiechert, A. Korge, and I. Qose, *Minimally invasive total disc replacement: surgical technique and preliminary clinical results*. Eur Spine J, 2002. 11 Suppl 2: p. S124-30.
250. Chung, S.S., C.S. Lee, and C.S. Kang, *Lumbar total disc replacement using ProDisc II: a prospective study with a 2-year minimum follow-up*. J Spinal Disord Tech, 2006. 19(6): p. 411-5.
251. Siepe, C.J., H.M. Mayer, K. Wiechert, and A. Korge, *Clinical results of total lumbar disc replacement with ProDisc II: three-year results for different indications*. Spine, 2006. 31(17): p. 1923-32.
252. Ogon, M., N. Howanietz, A. Tuschel, et al., *[Implantation of the ProDisc intervertebral disk prosthesis for the lumbar spine]*. Oper Orthop Traumatol, 2007. 19(2): p. 209-30.
253. Fernstrom, U., *Arthroplasty with intercorporal endoprosthesis in herniated disc and in painful disc*. Acta Chir Scand Suppl, 1966. 357: p. 154-9.
254. Coric, D. and P.V. Mummaneni, *Nucleus replacement technologies*. J Neurosurg Spine, 2008. 8(2): p. 115-20.
255. Klara, P.M. and C.D. Ray, *Artificial nucleus replacement: clinical experience*. Spine, 2002. 27(12): p. 1374-7.
256. Olson, E.J., E.N. Hanley, Jr., M.J. Rudert, and M.E. Baratz, *Vertebral column allografts for the treatment of segmental spine defects. An experimental investigation in dogs*. Spine, 1991. 16(9): p. 1081-8.
257. Frick, S.L., E.N. Hanley, Jr., R.A. Meyer, Jr., W.K. Ramp, and T.M. Chapman, *Lumbar intervertebral disc transfer. A canine study*. Spine, 1994. 19(16): p. 1826-34; 1834-5.
258. Luk, K.D., D.K. Ruan, D.H. Chow, and J.C. Leong, *Intervertebral disc autografting in a bipedal animal model*. Clin Orthop Relat Res, 1997(337): p. 13-26.
259. Luk, K.D., D.K. Ruan, D.S. Lu, and Z.Q. Fei, *Fresh frozen intervertebral disc allografting in a bipedal animal model*. Spine, 2003. 28(9): p. 864-9; 870.
260. Ruan, D., Q. He, Y. Ding, et al., *Intervertebral disc transplantation in the treatment of degenerative spine disease: a preliminary study*. Lancet, 2007. 369(9566): p. 993-9.
261. Luk, K.D. and D.K. Ruan, *Intervertebral disc transplantation: a biological approach to motion preservation*. Eur Spine J, 2008. 17 Suppl 4: p. 504-10.
262. Li, X., F.M. Phillips, H.S. An, et al., *The action of resveratrol, a phytoestrogen found in grapes, on the intervertebral disc*. Spine, 2008. 33(24): p. 2586-95.

Références bibliographiques

263. Singh, J.A., S. Beg, and M.A. Lopez-Olivo, *Tocilizumab for rheumatoid arthritis*. Cochrane Database Syst Rev, 2010. 7: p. CD008331.
264. Gruber, H.E., H.J. Norton, and E.N. Hanley, Jr., *Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro*. Spine, 2000. 25(17): p. 2153-7.
265. Park, J.B., I.C. Park, S.J. Park, et al., *Anti-apoptotic effects of caspase inhibitors on rat intervertebral disc cells*. J Bone Joint Surg Am, 2006. 88(4): p. 771-9.
266. Wang, Y.J., Q. Shi, P. Sun, et al., *Insulin-like growth factor-1 treatment prevents anti-Fas antibody-induced apoptosis in endplate chondrocytes*. Spine, 2006. 31(7): p. 736-41.
267. Studer, R.K., A.M. Aboka, L.G. Gilbertson, et al., *p38 MAPK inhibition in nucleus pulposus cells: a potential target for treating intervertebral disc degeneration*. Spine, 2007. 32(25): p. 2827-33.
268. Rannou, F., T.S. Lee, R.H. Zhou, et al., *Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload*. Am J Pathol, 2004. 164(3): p. 915-24.
269. Cohen, S. and R. Fleischmann, *Kinase inhibitors: a new approach to rheumatoid arthritis treatment*. Curr Opin Rheumatol, 2010. 22(3): p. 330-5.
270. Studer, R.K., L.G. Gilbertson, H. Georgescu, et al., *p38 MAPK inhibition modulates rabbit nucleus pulposus cell response to IL-1*. J Orthop Res, 2008. 26(7): p. 991-8.
271. Cattaneo, A., *Tanezumab, a recombinant humanized mAb against nerve growth factor for the treatment of acute and chronic pain*. Curr Opin Mol Ther, 2010. 12(1): p. 94-106.
272. Masuda, K., *Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors*. Eur Spine J, 2008. 17 Suppl 4: p. 441-51.
273. Masuda, K. and H.S. An, *Prevention of disc degeneration with growth factors*. Eur Spine J, 2006. 15 Suppl 3: p. S422-32.
274. An, H.S., K. Masuda, and N. Inoue, *Intervertebral disc degeneration: biological and biomechanical factors*. J Orthop Sci, 2006. 11(5): p. 541-52.
275. Walsh, A.J., D.S. Bradford, and J.C. Lotz, *In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs*. Spine, 2004. 29(2): p. 156-63.
276. An, H.S., K. Takegami, H. Kamada, et al., *Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits*. Spine, 2005. 30(1): p. 25-31; 31-2.

Références bibliographiques

277. Imai, Y., H. An, E. Thonar, et al., *Co-injected recombinant human osteogenic protein-1 minimizes chondroitinase ABC-induced intervertebral disc degeneration: an in vivo study using a rabbit model*. Trans Orthop Res Soc, 2003. 1143.
278. Masuda, K., Y. Imai, M. Okuma, et al., *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. 31(7): p. 742-54.
279. Chujo, T., H.S. An, K. Akeda, 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, 2006. 31(25): p. 2909-17.
280. Miyamoto, K., K. Masuda, J.G. Kim, et al., *Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs*. Spine J, 2006. 6(6): p. 692-703.
281. Imai, Y., M. Okuma, H.S. An, et al., *Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC*. Spine, 2007. 32(11): p. 1197-205.
282. Huang, K.Y., J.J. Yan, C.C. Hsieh, M.S. Chang, and R.M. Lin, *The in vivo biological effects of intradiscal recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the injured intervertebral disc: an animal experiment*. Spine, 2007. 32(11): p. 1174-80.
283. Nagae, M., T. Ikeda, Y. Mikami, et al., *Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres*. Tissue Eng, 2007. 13(1): p. 147-58.
284. Gilbertson, L., S.H. Ahn, P.N. Teng, et al., *The effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2, recombinant human bone morphogenetic protein-12, and adenoviral bone morphogenetic protein-12 on matrix synthesis in human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells*. Spine J, 2008. 8(3): p. 449-56.
285. Friedmann, T. and R. Roblin, *Gene therapy for human genetic disease?* Science, 1972. 175(25): p. 949-55.
286. Shimer, A.L., R.C. Chadderdon, L.G. Gilbertson, and J.D. Kang, *Gene therapy approaches for intervertebral disc degeneration*. Spine, 2004. 29(23): p. 2770-8.
287. Wehling, P., K.P. Schulitz, P.D. Robbins, C.H. Evans, and J.A. Reinecke, *Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy*. Spine, 1997. 22(10): p. 1092-7.

Références bibliographiques

288. Lattermann, C., W.M. Oxner, X. Xiao, et al., *The adeno associated viral vector as a strategy for intradiscal gene transfer in immune competent and pre-exposed rabbits*. Spine, 2005. 30(5): p. 497-504.
289. Liu, X., K. Li, J. Song, et al., *Efficient and stable gene expression in rabbit intervertebral disc cells transduced with a recombinant baculovirus vector*. Spine, 2006. 31(7): p. 732-5.
290. Leo, B.M., X. Li, G. Balian, and D.G. Anderson, *In vivo bioluminescent imaging of virus-mediated gene transfer and transduced cell transplantation in the intervertebral disc*. Spine, 2004. 29(8): p. 838-44.
291. Pitard, B., *Convergence of opposite sciences for the future development of non viral gene therapy*. Curr Gene Ther, 2008. 8(5): p. 295.
292. Herweijer, H. and J.A. Wolff, *Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy*. Gene Ther, 2003. 10(6): p. 453-8.
293. Morrey, M.E., P.A. Anderson, G. Chambers, and R. Paul, *Optimizing nonviral-mediated transfection of human intervertebral disc chondrocytes*. Spine J, 2008. 8(5): p. 796-803.
294. Nishida, K., M. Doita, T. Takada, et al., *Sustained transgene expression in intervertebral disc cells in vivo mediated by microbubble-enhanced ultrasound gene therapy*. Spine, 2006. 31(13): p. 1415-9.
295. Moon, S.H., K. Nishida, L.G. Gilbertson, et al., *Biologic Response of Human Intervertebral Disc Cells to Gene Therapy Cocktail*. Spine, 2008. 33(17): p. 1850-5.
296. Paul, R., R.C. Haydon, H. Cheng, et al., *Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease*. Spine, 2003. 28(8): p. 755-63.
297. Wang, H., M. Kroeber, M. Hanke, et al., *Release of active and depot GDF-5 after adenovirus-mediated overexpression stimulates rabbit and human intervertebral disc cells*. J Mol Med, 2004. 82(2): p. 126-34.
298. Zhan, Z., Z. Shao, X. Xiong, et al., *Ad/CMV- hTGF-beta1 treats rabbit intervertebral discs degeneration in vivo*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2004. 24(6): p. 599-601, 624.
299. Liang, H., S.Y. Ma, G. Feng, F.H. Shen, and 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. 10(1): p. 32-41.
300. Hannon, G.J., *RNA interference*. Nature, 2002. 418(6894): p. 244-51.

Références bibliographiques

301. Nishida, K., T. Suzuki, K. Kakutani, et al., *Gene therapy approach for disc degeneration and associated spinal disorders*. Eur Spine J, 2008. 17 Suppl 4: p. 459-66.
302. Suzuki, T., K. Nishida, K. Kakutani, et al., *Sustained long-term RNA interference in nucleus pulposus cells in vivo mediated by unmodified small interfering RNA*. Eur Spine J, 2009. 18(2): p. 263-70.
303. Watanabe, K., J. Mochida, T. Nomura, et al., *Effect of reinsertion of activated nucleus pulposus on disc degeneration: an experimental study on various types of collagen in degenerative discs*. Connect Tissue Res, 2003. 44(2): p. 104-8.
304. Nomura, T., J. Mochida, M. Okuma, K. Nishimura, and K. Sakabe, *Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration*. Clin Orthop Relat Res, 2001(389): p. 94-101.
305. Okuma, M., J. Mochida, K. Nishimura, K. Sakabe, and K. Seiki, *Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study*. J Orthop Res, 2000. 18(6): p. 988-97.
306. Kandel, R., S. Roberts, and J.P. Urban, *Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges*. Eur Spine J, 2008. 17 Suppl 4: p. 480-91.
307. Meisel, H.J., V. Siodla, T. Ganey, et al., *Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc*. Biomol Eng, 2007. 24(1): p. 5-21.
308. Gorenssek, M., C. Jaksimovic, N. Kregar-Velikonja, et al., *Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes*. Cell Mol Biol Lett, 2004. 9(2): p. 363-73.
309. Ganey, T., J. Libera, V. Moos, et al., *Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc*. Spine, 2003. 28(23): p. 2609-20.
310. Hunziker, E.B., *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. 10(6): p. 432-63.
311. Schnabel, M., S. Marlovits, G. Eckhoff, et al., *Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. 10(1): p. 62-70.
312. Howell, D.S., *Pathogenesis of osteoarthritis*. Am J Med, 1986. 80(4B): p. 24-8.

Références bibliographiques

313. Leung, V.Y., D. Chan, and K.M. Cheung, *Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction*. Eur Spine J, 2006. 15 Suppl 3: p. S406-13.
314. Hiyama, A., J. Mochida, and D. Sakai, *Stem cell applications in intervertebral disc repair*. Cell Mol Biol, 2008. 54(1): p. 24-32.
315. Merceron, C., C. Vinatier, J. Clouet, et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering*. Joint Bone Spine, 2008. 75(6): p. 672-4.
316. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. 8(4): p. 315-7.
317. Richardson, S.M., J.A. Hoyland, R. Mobasher, et al., *Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering*. J Cell Physiol, 2010. 222(1): p. 23-32.
318. Vinatier, C., C. Bouffi, C. Merceron, et al., *Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy*. Curr Stem Cell Res Ther, 2009. 4(4): p. 318-29.
319. Gimble, J. and F. Guilak, *Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential*. Cytotherapy, 2003. 5(5): p. 362-9.
320. Liu, T.M., M. Martina, D.W. Hutmacher, et al., *Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages*. Stem Cells, 2007. 25(3): p. 750-60.
321. Awad, H.A., M.Q. Wickham, H.A. Leddy, J.M. Gimble, and F. Guilak, *Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds*. Biomaterials, 2004. 25(16): p. 3211-22.
322. Ehlicke, F., D. Freimark, B. Heil, A. Dorresteyn, and P. Czermak, *Intervertebral disc regeneration: influence of growth factors on differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC)*. Int J Artif Organs, 2010. 33(4): p. 244-52.
323. Chen, S., S.E. Emery, and M. Pei, *Coculture of synovium-derived stem cells and nucleus pulposus cells in serum-free defined medium with supplementation of transforming growth factor-beta1: a potential application of tissue-specific stem cells in disc regeneration*. Spine, 2009. 34(12): p. 1272-80.

Références bibliographiques

324. Morito, T., T. Muneta, K. Hara, et al., *Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans*. *Rheumatology*, 2008. 47(8): p. 1137-43.
325. Jones, E.A., A. English, K. Henshaw, et al., *Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(3): p. 817-27.
326. Murrell, W., E. Sanford, L. Anderberg, B. Cavanagh, and A. Mackay-Sim, *Olfactory stem cells can be induced to express chondrogenic phenotype in a rat intervertebral disc injury model*. *Spine J*, 2009. 9(7): p. 585-94.
327. Murrell, W., F. Feron, A. Wetzig, et al., *Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa*. *Dev Dyn*, 2005. 233(2): p. 496-515.
328. Henriksson, H., M. Thornemo, C. Karlsson, 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*, 2009. 34(21): p. 2278-87.
329. Blanco, J.F., I.F. Graciani, F.M. Sanchez-Guijo, 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*, 2010.
330. Ryan, J.M., F.P. Barry, J.M. Murphy, and B.P. Mahon, *Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection*. *J Inflamm*, 2005. 2: p. 8.
331. Sakai, D., J. Mochida, Y. Yamamoto, et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration*. *Biomaterials*, 2003. 24(20): p. 3531-41.
332. Le Maitre, C.L., P. Baird, A.J. Freemont, and 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*, 2009. 11(1): p. R20.
333. Henriksson, H.B., T. Svanvik, M. Jonsson, et al., *Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model*. *Spine*, 2009. 34(2): p. 141-8.
334. Wei, A., S.A. Chung, H. Tao, et al., *Differentiation of rodent bone marrow mesenchymal stem cells into intervertebral disc-like cells following coculture with rat disc tissue*. *Tissue Eng Part A*, 2009. 15(9): p. 2581-95.

Références bibliographiques

335. Le Visage, C., S.W. Kim, K. Tateno, et al., *Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis*. Spine, 2006. 31(18): p. 2036-42.
336. Yang, S.H., C.C. Wu, T.T. Shih, Y.H. Sun, and F.H. Lin, *In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation*. Spine, 2008. 33(18): p. 1951-7.
337. Richardson, S.M., R.V. Walker, S. Parker, et al., *Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation*. Stem Cells, 2006. 24(3): p. 707-16.
338. Korecki, C.L., J.M. Taboas, R.S. Tuan, and J.C. Iatridis, *Notochordal cell conditioned medium stimulates mesenchymal stem cell differentiation toward a young nucleus pulposus phenotype*. Stem Cell Res Ther, 2010. 1(2): p. 18.
339. Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher, *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. Cell, 2006. 126(4): p. 677-89.
340. Bonfanti, P., S. Claudinot, A.W. Amici, et al., *Microenvironmental reprogramming of thymic epithelial cells to skin multipotent stem cells*. Nature, 2010. 466(7309): p. 978-82.
341. Sakai, D., *Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease*. Eur Spine J, 2008. 17 Suppl 4: p. 452-8.
342. Zhang, Y.G., X. Guo, P. Xu, L.L. Kang, and J. Li, *Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans*. Clin Orthop Relat Res, 2005(430): p. 219-26.
343. Hiyama, A., J. Mochida, T. Iwashina, et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model*. J Orthop Res, 2008. 26(5): p. 589-600.
344. Jeong, J.H., E.S. Jin, J.K. Min, et al., *Human mesenchymal stem cells implantation into the degenerated coccygeal disc of the rat*. Cytotechnology, 2009. 59(1): p. 55-64.
345. Yang, F., V.Y. Leung, K.D. Luk, D. Chan, and K.M. Cheung, *Mesenchymal Stem Cells Arrest Intervertebral Disc Degeneration Through Chondrocytic Differentiation and Stimulation of Endogenous Cells*. Mol Ther, 2009. 17(11): p. 1959-66.
346. Ganey, T., W.C. Hutton, T. Moseley, M. Hedrick, and H.J. Meisel, *Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model*. Spine, 2009. 34(21): p. 2297-304.
347. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. 260(5110): p. 920-6.

Références bibliographiques

348. Vinatier, C., D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux, and D. Noel, *Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors*. Trends Biotechnol, 2009. 27(5): p. 307-14.
349. Richardson, S.M., A. Mobasher, A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Intervertebral disc biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies*. Histol Histopathol, 2007. 22(9): p. 1033-41.
350. Yang, X. and X. Li, *Nucleus pulposus tissue engineering: a brief review*. Eur Spine J, 2009. 18(11): p. 1564-72.
351. Roughley, P., C. Hoemann, E. DesRosiers, et al., *The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation*. Biomaterials, 2006. 27(3): p. 388-96.
352. Richardson, S.M., N. Hughes, J.A. Hunt, A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels*. Biomaterials, 2008. 29(1): p. 85-93.
353. Bourges, X., P. Weiss, G. Daculsi, and G. Legeay, *Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use*. Adv Colloid Interface Sci, 2002. 99(3): p. 215-28.
354. Vinatier, C., D. Magne, P. Weiss, et al., *A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes*. Biomaterials, 2005. 26(33): p. 6643-51.
355. Vinatier, C., O. Gauthier, M. Masson, et al., *Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2009. 89(1): p. 176-85.
356. Vinatier, C., O. Gauthier, A. Fatimi, et al., *An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects*. Biotechnol Bioeng, 2009. 102(4): p. 1259-67.
357. Darling, E.M. and K.A. Athanasiou, *Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations*. J Orthop Res, 2005. 23(2): p. 425-32.
358. Bonaventure, J., N. Kadhom, L. Cohen-Solal, et al., *Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads*. Exp Cell Res, 1994. 212(1): p. 97-104.
359. Domm, C., M. Schunke, K. Christesen, and B. Kurz, *Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. 10(1): p. 13-22.

Références bibliographiques

360. Malda, J., E. Kreijveld, J.S. Temenoff, C.A. van Blitterswijk, and J. Riesle, *Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation*. *Biomaterials*, 2003. 24(28): p. 5153-61.
361. Malda, J., C.A. van Blitterswijk, M. Grojec, et al., *Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation*. *Tissue Eng*, 2003. 9(5): p. 939-48.
362. Benya, P.D. and J.D. Shaffer, *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels*. *Cell*, 1982. 30(1): p. 215-24.
363. Hegewald, A.A., A. Enz, M. Endres, et al., *Engineering of polymer-based grafts with cells derived from human nucleus pulposus tissue of the lumbar spine*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2010.
364. Estes, B.T., B.O. Diekman, J.M. Gimble, and F. Guilak, *Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype*. *Nat Protoc*, 2010. 5(7): p. 1294-311.
365. Steck, E., H. Bertram, R. Abel, et al., *Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 2005. 23(3): p. 403-11.
366. Domm, C., M. Schunke, J. Steinhagen, S. Freitag, and B. Kurz, *Influence of various alginate brands on the redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate bead culture under high and low oxygen tension*. *Tissue Eng*, 2004. 10(11-12): p. 1796-805.
367. Malladi, P., Y. Xu, M. Chiou, A.J. Giaccia, and M.T. Longaker, *Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. 290(4): p. C1139-46.
368. Robins, J.C., N. Akeno, A. Mukherjee, et al., *Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9*. *Bone*, 2005. 37(3): p. 313-22.
369. Wang, D.W., B. Fermor, J.M. Gimble, H.A. Awad, and F. Guilak, *Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells*. *J Cell Physiol*, 2005. 204(1): p. 184-91.
370. Merceron, C., C. Vinatier, S. Portron, et al., *Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. 298(2): p. C355-64.

Références bibliographiques

371. Semenza, G.L., P.H. Roth, H.M. Fang, and G.L. Wang, *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1994. 269(38): p. 23757-63.
372. Risbud, M.V., T.J. Albert, A. Guttapalli, et al., *Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy*. Spine, 2004. 29(23): p. 2627-32.
373. Chen, X.C., R. Wang, X. Zhao, et al., *Prophylaxis against carcinogenesis in three kinds of unestablished tumor models via IL12-gene-engineered MSCs*. Carcinogenesis, 2006. 27(12): p. 2434-41.
374. Betre, H., S.R. Ong, F. Guilak, et al., *Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide*. Biomaterials, 2006. 27(1): p. 91-9.
375. Grodzinsky, A.J., M.E. Levenston, M. Jin, and E.H. Frank, *Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces*. Annu Rev Biomed Eng, 2000. 2: p. 691-713.
376. Arokoski, J.P., J.S. Jurvelin, U. Vaatainen, and H.J. Helminen, *Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading*. Scand J Med Sci Sports, 2000. 10(4): p. 186-98.
377. Schulz, R.M. and A. Bader, *Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes*. Eur Biophys J, 2007. 36(4-5): p. 539-68.
378. Kim, D.H., S.H. Kim, S.J. Heo, et al., *Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells into NP-like cells via 3D co-culturing with mechanical stimulation*. J Biosci Bioeng, 2009. 108(1): p. 63-7.
379. Nerurkar, N.L., D.M. Elliott, and R.L. Mauck, *Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering*. J Biomech, 2009. 43(6): p. 1017-30.
380. Kawasaki, K., M. Ochi, Y. Uchio, N. Adachi, and M. Matsusaki, *Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels*. J Cell Physiol, 1999. 179(2): p. 142-8.
381. Gruber, H.E., A.A. Stasky, and E.N. Hanley, Jr., *Characterization and phenotypic stability of human disc cells in vitro*. Matrix Biol, 1997. 16(5): p. 285-8.
382. Rong, Y., G. Sugumaran, J.E. Silbert, and M. Spector, *Proteoglycans synthesized by canine intervertebral disc cells grown in a type I collagen-glycosaminoglycan matrix*. Tissue Eng, 2002. 8(6): p. 1037-47.

Références bibliographiques

383. Sato, M., M. Kikuchi, M. Ishihara, et al., *Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured annulus fibrosus cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold)*. *Med Biol Eng Comput*, 2003. 41(3): p. 365-71.
384. Reza, A.T. and S.B. Nicoll, *Characterization of novel photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels for encapsulation of nucleus pulposus cells*. *Acta Biomater*, 2010. 6(1): p. 179-86.
385. Tian, H., J. Wang, C. Chen, J. Liu, and Y. Zhou, *Construction of injectable tissue engineered nucleus pulposus in vitro*. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2009. 23(2): p. 173-7.
386. Halloran, D.O., S. Grad, M. Stoddart, et al., *An injectable cross-linked scaffold for nucleus pulposus regeneration*. *Biomaterials*, 2008. 29(4): p. 438-47.
387. Yang, S.H., P.Q. Chen, Y.F. Chen, and F.H. Lin, *An in-vitro study on regeneration of human nucleus pulposus by using gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan tri-copolymer scaffold*. *Artif Organs*, 2005. 29(10): p. 806-14.
388. Seguin, C.A., M.D. Grynepas, R.M. Pilliar, S.D. Waldman, and R.A. Kandel, *Tissue engineered nucleus pulposus tissue formed on a porous calcium polyphosphate substrate*. *Spine*, 2004. 29(12): p. 1299-306; 1306-7.
389. Brown, R.Q., A. Mount, and K.J. Burg, *Evaluation of polymer scaffolds to be used in a composite injectable system for intervertebral disc tissue engineering*. *J Biomed Mater Res A*, 2005. 74(1): p. 32-9.
390. Sun, Y., M. Hurtig, R.M. Pilliar, M. Grynepas, and R.A. Kandel, *Characterization of nucleus pulposus-like tissue formed in vitro*. *J Orthop Res*, 2001. 19(6): p. 1078-84.
391. Mauth, C., E. Bono, S. Haas, et al., *Cell-seeded polyurethane-fibrin structures--a possible system for intervertebral disc regeneration*. *Eur Cell Mater*, 2009. 18: p. 27-38; 38-9.
392. Sha'ban, M., S.J. Yoon, Y.K. Ko, et al., *Fibrin promotes proliferation and matrix production of intervertebral disc cells cultured in three-dimensional poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008. 19(9): p. 1219-37.
393. Chiba, K., G.B. Andersson, K. Masuda, and E.J. Thonar, *Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate*. *Spine*, 1997. 22(24): p. 2885-93.

Références bibliographiques

394. Le Visage, C., S.H. Yang, L. Kadakia, et al., *Small intestinal submucosa as a potential bioscaffold for intervertebral disc regeneration*. Spine, 2006. 31(21): p. 2423-30; 2431.
395. Baer, A.E., J.Y. Wang, V.B. Kraus, and L.A. Setton, *Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures*. J Orthop Res, 2001. 19(1): p. 2-10.
396. Alini, M., W. Li, P. Markovic, et al., *The potential and limitations of a cell-seeded collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix*. Spine, 2003. 28(5): p. 446-54; 453.
397. Dang, J.M., D.D. Sun, Y. Shin-Ya, et al., *Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disk cells*. Biomaterials, 2006. 27(3): p. 406-18.
398. Crevensten, G., A.J. Walsh, D. Ananthakrishnan, et al., *Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs*. Ann Biomed Eng, 2004. 32(3): p. 430-4.
399. Sakai, D., J. Mochida, T. Iwashina, et al., *Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration*. Spine, 2005. 30(21): p. 2379-87.
400. Sakai, D., J. Mochida, T. Iwashina, et al., *Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc*. Biomaterials, 2006. 27(3): p. 335-45.
401. Revell, P.A., E. Damien, L. Di Silvio, et al., *Tissue engineered intervertebral disc repair in the pig using injectable polymers*. J Mater Sci Mater Med, 2007. 18(2): p. 303-8.
402. Liu, J., J. Wang, and Y. Zhou, *BMSCs-chitosan hydrogel complex transplantation for treating intervertebral disc degeneration*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2009. 23(2): p. 178-82.
403. Bertram, H., M. Kroeber, H. Wang, et al., *Matrix-assisted cell transfer for intervertebral disc cell therapy*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 331(4): p. 1185-92.
404. Ruan, D.K., H. Xin, C. Zhang, et al., *Experimental intervertebral disc regeneration with tissue-engineered composite in a canine model*. Tissue Eng Part A, 2010. 16(7): p. 2381-9.
405. Roughley, P.J., *Point of view*. Spine, 2007. 32(12): p. 1310.

Abstract

Low back pain affects 80% of the population at least once during life and constitutes a public health problem for our modern industrialized societies. Usually, they are the consequences of the intervertebral disc degeneration. Currently, the knowledges about mechanisms leading to this disc degeneration are well understood and allow to define new targets to treat the origin of the intervertebral disc degeneration. The first promising results in tissue engineering of articular cartilage associated with the existence of similarities between articular cartilage and intervertebral disc allow to considered the same approach to treat the intervertebral disc. The principle of this approach is based on the use of cells associated with a biomaterial and the substitute is injected into the degenerated disc. An update of current advances in this area is achieved and the various problems encountered during the development of such projects are discussed. These include the choice of cells and scaffolds injected, the choice of appropriate culture conditions, and the choice of evaluation methods and reliable animal models.

Keywords

Intervertebral disc, tissue engineering, phenotype, animal models.

Johann Clouet

Thèse : Doctorat d'Université, Nantes (2010)

.....
Résumé

**DEVELOPPEMENT DE L'INGENIERIE TISSULAIRE DU DISQUE
INTERVERTEBRAL : DE LA PHYSIOPATHOLOGIE AUX MODELES ANIMAUX.**

Les douleurs lombaires touchent 80% de la population au moins une fois dans la vie et constituent un véritable problème de santé publique pour nos sociétés modernes industrialisées. Ces douleurs lombaires sont, dans la grande majorité des cas, la conséquence clinique d'une atteinte des articulations vertébrales marquée par une dégénérescence progressive des disques intervertébraux. La connaissance des mécanismes menant à cette dégénérescence discale sont aujourd'hui de mieux en mieux connus et laisse envisager une prise en charge étiologique, et non plus uniquement symptomatique. Les premiers résultats concluants en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire associés à l'existence de points communs entre le cartilage articulaire et le disque intervertébral laissent suggérer la possibilité de régénérer ce dernier, et en particulier le *Nucleus pulposus* (élément central du disque intervertébral), par ce même type d'approche. Le principe de cette approche est basé sur l'utilisation de cellules associées à un biomatériau. L'ensemble est injecté au sein d'un disque dégénéré afin de le restaurer. Un état des avancées actuelles dans ce domaine est réalisé et les différentes problématiques rencontrées au cours de la mise en œuvre de ce type de projet sont abordées. Il s'agit notamment du choix des cellules à injecter et des matrices associées, des conditions de culture adéquates, ainsi que du choix des méthodes d'évaluation et des modèles animaux.

Mots clefs

Disque intervertébral, ingénierie tissulaire, signature phénotypique, modèles animaux.

Laboratoire

UMR S/INSERM U791, LIOAD, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaires et Dentaires ;
Groupe STEP « Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology », 1 Place Alexis
Ricordeau, 44042 NANTES Cédex 1, France.