

Thèse de Doctorat

Pauline COLOMBIER

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Spécialité : *Médecine régénératrice*

Unité de recherche : **INSERM UMRS791-Laboratoire d'Ingénierie OstéoArticulaire et Dentaire**

Soutenue le 11 mars 2016

Thèse N° : (10)

Médecine régénératrice du disque intervertébral : Intérêt des cellules souches mésenchymateuses et pluripotentes induites

JURY

Rapporteurs :	Ludovic VALLIER , Professeur, Université de Cambridge, Royaume Uni François RANNOU , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université Paris Descartes, France
Examineurs :	John DE VOS , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Montpellier, France
Invité(s) :	Laurent DAVID , Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, Université de Nantes, France
Directeur de Thèse :	Jérôme GUICHEUX , Directeur de recherche INSERM, Université de Nantes, France
Co-directeur de Thèse :	Anne CAMUS , Chargée de recherche CNRS, Université de Nantes, France
Encadrant de Thèse :	Johann CLOUET , Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, Université de Nantes, France

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement M. Pierre Weiss pour son accueil au sein du laboratoire INSERM UMRS791.

Mes remerciements vont également à M. Jérôme Guicheux pour avoir dirigé cette thèse malgré de nouvelles fonctions très prenantes. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir appris tant de choses et de m'avoir soutenue tout au long de ces 5 années.

Je remercie également Mme Anne Camus pour la co-direction de ce travail, pour sa patience, sa sagesse, sa rigueur et ses conseils avisés. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la biologie du développement.

Je remercie M. Johann Clouet, pour avoir encadré cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance dès le master 2 et merci de m'avoir guidé dans tous les aspects translationnels et cliniques.

Je remercie également M. Laurent David, pour son implication dans ce projet et ses précieux conseils. Merci de la confiance et de la liberté que tu m'as accordée.

Mes remerciements les plus sincères vont également à :

M. Ludovic Vallier et M. François Rannou pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs. Merci Mr Rannou pour vos conseils avisés tout au long de cette thèse.

M. John De Vos pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant qu'examinateur.

Mais tellement plus encore...

Pierre Weiss, pour les bons moments qu'on a passé en congrès ou autour d'un verre...

Jérôme, merci d'avoir compris et soutenu ma curiosité scientifique. Merci de la liberté que tu m'as accordée ainsi que les moyens que tu as mis en œuvre pour mener à bien notre projet. Merci de m'avoir encadré comme tu l'as fait, avec le peu de temps que tu avais. J'ai appris énormément à tes côtés parce que tu m'as laissé apprendre en m'impliquant dans de nombreuses activités. Merci également pour ces bons moments autour d'une voire plusieurs bières .. Une dédicace spéciale à la « Mirta de la muerte »
Merci chef !

Anne, ta rencontre aura marqué ma vie scientifique et personnelle. Nous avons tout d'abord travaillé ensemble puis, après de nombreuses heures de dissection, d'analyse de résultats et un week end au ski, nous avons créé une relation qui m'a beaucoup apportée. La patience et l'énergie que tu as mis dans ma formation à ta discipline est remarquable ! Merci de porter ce projet comme tu le fais et de ne jamais avoir reculé malgré les difficultés. Merci d'être cette femme forte et juste, dont la passion de la Science se voit comme le nez au milieu du visage !

Laurent, tous ces vendredi soirs à travailler ensemble et tout le temps que tu as pris pour me transmettre ton savoir m'a beaucoup apporté. Merci de ne pas avoir abandonné malgré les difficultés au démarrage de ce projet. Merci pour ton écoute, ton soutien, tes mots encourageants et réconfortants. Merci de m'avoir fait prendre conscience de quoi j'étais capable.

Je ne pourrais jamais assez vous remercier tous les trois pour m'avoir fait confiance, m'avoir écouté et avoir considéré mon point de vue. Cette expérience a été pour moi formidable, j'en ressors grandie et fière d'avoir évolué à vos côtés. J'espère avoir été à la hauteur de ce que vous m'avez apporté.

Merci pour les moments intenses et délicieux de Science et pour la liberté d'expression dont j'ai bénéficié. Ma passion pour la Science n'a fait qu'augmenter à vos côtés.

Je tiens à remercier particulièrement Claire Chédeville et Caroline Chariou sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Merci les filles d'avoir donné tout ce que vous pouviez dans ce projet. Merci pour votre implication dans cette thèse. Lire dans vos yeux votre volonté de faire avancer ce projet et de me soutenir au maximum a été pour moi une réelle source de motivation.

Merci à Anne Gaignerie pour tous nos bons moments passés à rire et refaire le monde en salle de culture... Je me souviendrai toujours d'une phrase: « c'est dangeureux d'être toutes les deux Paulette.. » et oui, je pense que nous sommes synergiques !

Johann, merci d'avoir compris et accepté ma soif d'indépendance et ma volonté d'aller le plus loin possible dans nos projets scientifiques. Merci d'avoir souligné mon travail par un « y'en a sous la pédale » et pour nos discussions à batons rompus.

Laurent Lescaudron, je vous remercie pour vos conseils, votre bienveillance et vos mots encourageants. Je vous remercie d'avoir considéré mon point de vue et de m'avoir fait confiance pour l'encadrement de nos étudiants. Prenez bien soin de vous.

Je remercie Catherine le Visage pour ses éclats de rire communicatifs et nos très bons moments à Aarhus. Merci pour tes mots, il m'ont beaucoup touchés.

Je remercie chaleureusement Julie Lesoeur, Maëva Dutilleul et Sophie Sourice pour leurs conseils, leur expertise et leur sourire. Mention spéciale à Julie qui a géré les « coups de bourre » comme un vrai chef d'orchestre.

Je remercie les étudiants en Master 2 que j'ai eu le plaisir d'encadrer. Merci à Pierre-Antoine, Maëva, Gaëlle et Audrey de m'avoir fait confiance, d'avoir travaillé comme vous l'avez fait. Merci pour votre implication dans ce projet, j'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. Mention spéciale à Maëva, cette jeune fille a marqué mon début de vie d'encadrante. Ton écoute et toutes nos soirées à n'en pas finir de parler de Science restent gravées. Bien sur je ne parle pas des innombrables bières bues ensemble...

Merci à Marion Fusellier et Olivier Hamel pour leur contribution à ce travail et leur expertise clinique.

Merci à Jérôme Abadie et Anne Moreau pour leurs yeux experts en qualité d'anatomopathologistes.

Merci à Joëlle Vézier et Paul Pilet pour leur aide en microscopie et en analyse d'images.

Merci à Laurent et Sarah Beck pour leur expertise scientifique et leur disponibilité. Merci pour l'esprit de cohésion que vous cultivez au laboratoire. Merci pour les barbecues annuels et pour tous ces bons moments à l'embuscade. Ne changez rien, vous êtes au TOP !

Je remercie la clinique Brétéché et plus particulièrement le Dr Lejeune pour les prélèvements de tissus adipeux.

Je remercie sincèrement Mme Françoise Le Bouffant pour m'avoir pris sous son aile dès la troisième année de ma licence. C'est un peu grâce à vous que j'aime autant la Science. Vous êtes ma « maman scientifique ».

Je remercie la SFBTM et tous ses membres pour les 4 congrès auxquels j'ai eu le plaisir et l'honneur de participer. Merci pour vos encouragements auprès des étudiants en thèse. Je remercie Hervé Kempf, pour ses conseils et pour tous ces bons moments passés lors des JFBTM. Sans parler des vieux murs de Paris...

Parce que j'ai vécu une aventure humaine formidable, je voudrais remercier mes copains du labo :

Greig, mon frère de Science, mon pote de tous les jours et mon copain de St Chignan ! Merci d'avoir été là, pour ton soutien et ta joie de vivre ! On a tout vécu ensemble depuis le début, ce qui nous a permis de créer de vrais liens solides. J'espère qu'on se reverra de l'autre côté de l'océan atlantique !

Mélanie, je suis très fière de t'avoir à mes côtés. Tu es une femme forte, remarquable et tu m'as vraiment apporté beaucoup d'amour et de force durant ces 5 dernières années. J'espère qu'on se retrouvera vite !

Christophe, je t'ai connu thésard au labo, puis post doc maintenant avec 3 ans écoulés entre les deux. J'ai l'impression qu'on ne s'est jamais vraiment quitté.. tu es vraiment quelqu'un de formidable et j'ai eu beaucoup de plaisir à te retrouver. Le seul bémol, on picole beaucoup trop ensemble !!

Charlotte, merci de ne pas m'avoir fermé la porte malgré des débuts difficiles. Merci pour ta générosité et ta présence tout au long de ces années. Fait bien attention à toi... merci pour tout.

Cécile, merci pour ton aide ces dernières années. Mais merci surtout d'être comme tu es, franche, dur à cuire et pleine d'humour. Merci pour ce super week-end au ski que nous avons passé ensemble et c'est avec un peu de regrets que je pars sans t'avoir assez connu...

Elodie, Maude, Nina H, Nina B, mes coupines je vous souhaite tout le meilleur pour votre thèse. Je ne serai pas là pour assister à votre grand jour mais sachez que vous m'avez apporté vraiment beaucoup durant ces dernières années. J'étais peu disponible mais j'ai aimé chaque vendredi soir à finir à pas d'heure.. Chaque moment passé à vos côtés a été pour moi une immense joie. Donnez vous à fond, déplacez les montagnes et soyez fière de vous.

Eva, pour toutes nos folles soirées et ta façon de boire du champagne à la bouteille,

Vincent, pour ton côté raleur de première classe, mais aussi pour ta disponibilité et ton aide

Oliv', pour ton humour particulier et ton sourire

Elsa, pour ta gentillesse et ta douceur,

Boris, pour ton humanité et ta générosité,

Cyril, pour ton bon vin et ton sourire ravageur,

Laure, pour tous les bons gueuletons que tu nous a concoctés et ton écoute,

Aurore, pour nos rigolades du matin, quand personne était encore là,

Nicolas Maillard, pour avoir passé une année en face de moi et m'avoir fait rire tous les jours.

Je remercie tous les membres du laboratoire de m'avoir fait passé tant de bons moments à leur cotés. Une pensée spéciale à Allan, Guéno, Richard et Kathrine, Janel, Louise, Leslie, Kilian et Kéké. Je remercie également Etienne,

Jean Marie, Ronan, Patrice et Fred, les patrons de l'Embuscade et du De Danan, sans qui une thèse est difficile à terminer ! Merci d'avoir abreuvé notre savoir de vin rouge et d'avoir nourrit nos ambitions au saucisson !

Je tiens à remercier aussi mes supers copains que j'ai depuis des années, que je n'ai pas vu autant que je l'aurai voulu ces derniers temps... Caro (alias ma carotte), voilà 25 ans qu'on se connaît. Après avoir vécu avec toi pendant 3 années, plus rien n'est comme avant. Merci pour ton amour inconditionnel, ta présence et ton écoute. Merci d'avoir supporté chaque étape douloureuse à mes côtés. Tu es une grande force pour moi.

Thibault, mon vieux pote... on a fait les 400 coups ensemble, que de bons souvenirs les années fac.. je pense que la cafet de la fac de Nantes croule sous les dettes tellement on a bu de bières. Merci d'être toi, de m'avoir toujours aimé comme je suis. Merci d'avoir vu en moi ce que tant d'autres ne voient pas...

Nicks, Gégé, mes vieux copains avec qui j'ai passé mon adolescence. Merci d'avoir été présents et d'être restés à mes côtés malgré le peu de disponibilité que j'ai eu... Merci pour ce que vous êtes et la place que vous m'avez accordée à vos côtés.

Je ne peux m'empêcher de penser à Chris, mon ami depuis toujours, notre passion commune pour la musique nous a permis d'avoir une relation unique. Mon frère de cœur, tu es parti trop tôt, tu as quitté ce monde en me laissant seule mais je me suis bien battue et je continuerai encore. Je me souviendrai toute ma vie des derniers instants passés à tes côtés, tu m'as légué ta force et ton envie de vivre. Repose toi mon frère.

Mélanie Chesneau, autrement appelée Brenda, merci pour ton sourire, ta joie de vivre et ta simplicité.

Fabienne, David, Marin, merci pour m'avoir soutenue comme jamais à des moments plutôt difficiles de ma vie. Merci pour vos conseils, votre patience et pour avoir été là tout simplement. Marin, tu liras ça quand tu seras plus grand, j'espère que tu t'entraîneras sur ma thèse pour apprendre à lire !

Gisèle, merci pour votre patience à me transmettre votre savoir de grande pianiste. Merci aussi pour vos grands sourires qui rendent les gammes plus faciles à vivre !

Merci à mes parents de cœur, Françoise et Jean Claude Le Nair. Vous me connaissez depuis que je suis née et je ne vous remercierai jamais assez du soutien que vous m'avez apporté. Merci de m'avoir fait une place dans votre famille.

Enfin,

Merci à M. Patrice Colombier et Mme Nathalie Colombier, mes chers parents, d'avoir fait de moi ce que je suis. Merci de m'avoir soutenue dans cet ambitieux projet, d'avoir compris ma passion pour mon travail et d'avoir

accepté ce choix. Merci pour votre amour que j'ai ressenti chaque jour. C'est une chance et un honneur de vous avoir comme parents.

Merci à mon frère Geoffrey, ma sœur Mylène, pour leur amour, leur soutien, les centaines de discussions qu'on a eu ensemble. Les épreuves qu'on a traversées ensemble nous ont rendu plus forts et inséparables. Ma sœur Carla, qui je l'espère, sera fière de sa grande-grande sœur. Tu es un vrai bonheur et tu remplis nos cœurs de joie depuis ta naissance.

Merci à Philippe, pour avoir pris soin de moi et pour tes mots réconfortants.

Merci à Monique et Jean-Maurice, mes grands parents, pour leur amour, leur présence et les bons moments qu'on a passé ensemble. Merci de me faire ressentir votre fierté de m'avoir comme petite fille.

Merci à Claudine et Jean Marie, pour leur compréhension, leur patience et leur affection pour moi. Merci pour votre fils.

Merci à Benoît, pour son sourire et pour son humour piquant qu'on adore tous !

Merci enfin à toi Thomas, de m'avoir soutenue comme personne, d'avoir supporté les moments difficiles et d'avoir apprécié les moments de joie ! Merci d'être comme tu es et de m'accepter comme je suis. Merci pour ton amour, ta patience et ta bienveillance.

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications internationales

1. **Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissue engineers. (2014).** P. Colombier, A. Camus, L. Lescaudron, J. Clouet, J. Guicheux. Trends in Biotechnology, 32(9):433-5
2. **The lumbar intervertebral disc: from development to disc degeneration. (2014)** P. Colombier, J. Clouet, O. Hamel, L. Lescaudron, J. Guicheux. Joint Bone Spine: 81(2): 125-9.
3. **Noto transcription factor directs human iPSC mesendoderm progenitors to a notochordal fate.** P. Colombier, C. Chédeville, J. Clouet, C. Chariou, L. Lescaudron, L. David, J. Guicheux, A. Camus. En préparation
4. **GDF5 and TGF- β 1 act synergistically to drive the differentiation human adipose stromal cells towards nucleus pulposus-like cells.** P. Colombier, J. Clouet, C. Boyer, M. Ruel, G. Bonin, J. Lesoeur, A. Moreau, BH. Fellah, L. Lescaudron, A. Camus, J. Guicheux. Stem Cells. In press.
5. **Regenerative medicine of intervertebral disc: from physiopathology to clinical application (2014).** N. Henry, P. Colombier, L. Lescaudron, O. Hamel, J. Le Bideau, J. Guicheux, J. Clouet. Médecine Sciences: 30(12):1091-100.
6. **Slow evolving IVD degeneration induced by laser: comparison with conventional enzyme treatment.** M. Fusellier, P. Colombier, S. Youl, J. Lesoeur, S. Madec, O. Gauthier, O. Hamel, J. Guicheux, J. Clouet. BioMed Research International, En preparation.

Publications nationales

1. **Le disque intervertébral lombal : du développement embryonnaire à la dégénérescence.** P. Colombier, J. Clouet, O. Hamel, L. Lescaudron, J. Guicheux. Revue du Rhumatisme, 2013.
2. **La médecine régénératrice du disque intervertébral : panacée ou illusion?** J. Clouet, O. Hamel, P. Colombier, J. Guicheux, L. Lescaudron. Revue du Rhumatisme, 2013.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications invitées

1. **Generation of Nucleus pulposus cells from adult stem cells.** P. Colombier, A. Camus, J. Guicheux. 1st Aarhus Regenerative Orthopaedics Symposium (AROS). Aarhus, Danemark. 13-15 août 2015.

2. **Generation of Nucleus pulposus cells from stem cells: from embryonic development to regenerative medicine.** P. Colombier, J. Clouet, A. Camus, J. Guicheux.
 - Department of chemical and systems biology (Principal Investigator: Joanna Wysocka), Stanford university, Etats-Unis. 8 septembre 2015.
 - Department of biological chemistry (Principal Investigator: Kathrin Plath), University of California, Los Angeles (UCLA), Etats-Unis. 11 septembre 2015.
 - Department of pathology (Principal Investigator: Brian Dynlacht), New York University (NYU), Etats-Unis. 17 février 2016.
 - Laboratory of Muscle Biology, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. (Principal Investigator: Vittorio Sartorelli), National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Disorders (NIAMS, Bethesda), Etats-Unis. 19 février 2016.
 - Department of biological chemistry and molecular pharmacology. (Principal Investigator: Andrew Lassar), Harvard University, Etats-Unis. 22 février 2016.
 - Department of biochemistry. (Principal Investigator: Brian Black), University of California, San Francisco (UCSF), Etats-Unis. 24 février 2016.

Communications orales et affichées

Ces travaux de thèse ont fait l'objet de 3 communications orales dans les congrès internationaux :

- OARSI : OsteoArthritis Research Society International du 31 mars au 3 avril 2016, Amsterdam, Pays bas.
- TERMIS: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society du 10 au 13 juin, Genève, Italie.
- AOSPINE : World forum for spine research du 10 au 13 juin 2012, Helsinki, Finlande.

Et 4 communications orales dans les congrès nationaux:

- JFBTM : Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (3 présentations : du 25 au 27 juin 2011 à Paris, du 29 au 31 mai 2012 à Bordeaux et du 4 au 6 février 2015 à Clermont-Ferrand, France). Ces trois présentations orales ont été récompensées par un prix de meilleure communication orale.
- GRIMIT : Groupe de recherche sur les cellules souches mésenchymateuses, les matériaux et microenvironnement des tissus de soutien du 26 au 27 octobre 2013, Paris, France.

Ces travaux de thèse ont également fait l'objet de 4 communications affichées dans les congrès internationaux :

- ISSCR : International Society for Stem Cell Research du 24 au 27 juin 2015, Stockholm, Suède.
- eCM Conferences XV: European Cells and Materials, Cartilage and Disc: repair and regeneration. Cette communication a été récompensée par le prix Robert Mathys pour la meilleure présentation étudiante du 14 au 16 juin 2014, Davos, Suisse.
- TERMIS: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, du 10 au 13 juin, Genève, Italie.
- OARSI : OsteoArthritis Research Society International du 24 au 27 avril 2014, Paris, France.

Et d'une communication affichée dans le congrès national :

- JFBTM : Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés du 14 au 16 mai 2014, Limoges, France. Cette communication a été récompensée par un prix de meilleure présentation étudiante.

ACTIVITE D'ENCADREMENT

1. Audrey Smith étudiante en Master 2 à l'université de Paris XII-XIII-Evry (2014-2015).
« Ingénierie tissulaire du DIV : injection intradiscale de cellules stromales adipeuses chez la brebis »
2. Gaëlle Bonin, étudiante en Master 2 à l'université Sciences et Technologie de Nantes (2013-2014).
« Régénérescence du disque intervertébral : utilisation d'un biomatériau et de cellules stromales adipeuses différenciées »
3. Maëva Ruel, étudiante en Master 2 à l'université de biotechnologie Joseph Fournier à Grenoble (2012-2013).
« Différenciation nucléopulpogénique des cellules stromales adipeuses humaines »
4. Pierre-Antoine Hamon, étudiant en Master 2 à l'université Sciences et Technologie de Nantes (2011-2012).
« Pertinence du modèle animal « Brebis » pour l'ingénierie tissulaire du DIV »

LISTE DES ABREVIATIONS

ACAN : Agrécane	HoxB1 : Homeobox B1
ADN : Acide desoxyribonucleique	HPMC-Si : Hydroxylpropylmethylcellulose silanisée
AF : Annulus fibrosus	HtrA1 : HtrA serine peptidase 1
ALK : Activin-like Receptor	IGF1 : Insuline-like growth factor 1
AP1 : Activator protein 1	IL : Interleukine
APC : Adenomatosis polyposis coli	iPSC : Cellules souches pluripotentes induites
ARNm : Acides ribonucleiques messagers	IRM : Imagerie par résonance magnétique
ARX : Aristaless related homeodomain transcription factor	ITGA : Integrines
Bicc1 : BicC Family RNA Binding Protein 1	jpn : Jour post natal
BMP : Bone morphogenic proteins	Klf4 : Kruppel-Like Factor 4
CA12 : Carbonic anhydrase 12	LRP : Lipoprotein related protein
Ca ²⁺ : Calcium	MAPK : Mitogen-activated protein kinase
CCL : Chemokine ligand	MEC : Matrice extracellulaire
CD : Cluster de différenciation	Meox : Mesenchyme Homeobox
CDH1 : E-cadherin	MGO : Mid gastrula organizer
CDH2 : N-cadherin	Mixl1 : Mix Paired-Like Homeobox 1
Cellules ES : Cellules souches embryonnaires	Mlf1 : Myeloid Leukemia Factor 1
Cer1 : Cerberus 1	mm Hg : Millimètre de Mercure
ChIP sequencing : Chromatin Immuno-Precipitation sequencing	MMP : Matrix metalloproteinase
CK : Cytorekatin	MoxD1 : Monooxygenase DBH-Like 1
c-Myc : Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog	MyoD : Myogenic differentiation 1
CNT : Cellules notochordales	NGF : Nerve growth factor
COL1A1 : Collagène de type I	NOCE : Node and Nascent Notochord Enhancer
COL2A1 : Collagène de type II	Noto : Notochord homeobox
CSA : Cellules stromales adipeuses	NP : Nucleus pulposus
CSM : Cellules souches mésenchymateuses	NPCytes : Nucléopulpcytes
CTGF : Connective tissue growth factor	OP1: Osteogenic protein 1
DIV : Disque intervertébral	OVOS2 Ovosatin 2
Dkk1 : Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	PACE4 : subtilisin-like proprotein convertase 4
Dpyd : Dihydropyrimidine dehydrogenase	PAX1 : Paired box 1
Dync2h1 : Dynein, Cytoplasmic 2, Heavy Chain 1	PCP : Planar cell polarity
Dynlrb2 : Dynein, Light Chain, Roadblock-Type 2	PCTC-1 : Patched-1
EGO : Early organizer	PG : Protéoglycanes
Eomes : Eomesodermin	Pi3K : Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
Eph4 : Ephrin type-A receptor 4	Pim1 : Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
FGF : Fibroblast growth factor	Oct4/Pou5f1 : POU Class 5 Homeobox 1
FGFR : Fibroblast growth factor receptor	PRG4 : Lubricin
Fih : Floating head	PthRP : Parathyroid hormone related peptide
FoxA1 : Forkhead box A1	PV : Plateau vertébral
FoxA2 : Forkhead Box A2	Rfx3 : Regulatory Factor X 3
FoxD : Forkhead box D	ROS : Reactive oxygen species
FOXF1 : Forkhead Box F1	RT-qPCR : Real Time quantitative polymerase chain reaction
FoxH1 : Forkhead box H1	SASP : Senescence-associated secretory phenotype
FoxJ1 : Forkhead box J1	Shh : Sonic hedgehog
Fz : Frizzled	Smo : Smoothed
GAG : Glycosaminoglycanes	Smoc1 : SPARC Related Modular Calcium Binding 1
Gal3 : Galecin 3	Sox : Sex Determining Region Y
GD2 : Beta-1,4-N-Acetyl-Galactosaminyl Transferase 1	T : Brachyury
GDF5 : Growth and differentiation factor 5	TCF/LEF : Transcription factor/Lymphoid enhancer-binding factor
GFP : Green fluorescent protein	TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
GLUT1 : Glucose transporter 1	TGF-β : Transforming growth factor bêta
Gsc : Goosoid	TIE2 : TEK Tyrosine Kinase Endothelial
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3	TIMP-1 : Tissue inhibitors of metalloproteinase 1
HIF : Hypoxia inducible factor	VEGF: vascular endothelial growth factor

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique du projet REMEDIV développé par le laboratoire INSERM UMRS791. _____	7
Figure 2 : Régionalisation de la ligne primitive chez la souris (E7.0) modifiée d'après Tam and Loebel, 2007 [28]. _____	12
Figure 3: Evolution de l'organisateur précoce, intermédiaire et du nœud au cours de l'élongation de la ligne primitive modifiée d'après Kinder et al, 2001 [34]. _____	14
Figure 4: Morphologie du nœud d'un embryon de souris (E7.5) observée en microscopie à balayage d'après Vogan et Tabin, 1999 [48]. _____	16
Figure 5 : Formation de la plaque notochordale chez l'embryon de souris modifiée d'après Yamanaka, 2007 [47]. _____	16
Figure 6 : Représentation schématique de la formation de la notochorde à partir de la plaque notochordale chez l'embryon de souris modifiée d'après Jurant, 1974 [51]. _____	18
Figure 7 : Modèle d'interactions génétiques proposé par Tamplin en 2008 [96]. _____	26
Figure 8: Régulation de la voie de signalisation TGF- β /Nodal/Activine d'après Arnold et Robertson, 2009 [109]. _____	32
Figure 9 : Régulation de la voie de signalisation canonique Wnt/ β -Catenin d'après Arnold et Roberston, 2009 [109]. _____	36
Figure 10 : Implication des voies de signalisation Nodal, Wnt et FGF dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) modifiée d'après Lim et Thiery, 2012 [163]. _____	40
Figure 11 : Régulation de la voie canonique de signalisation BMP adaptée de Walsh et al, 2010 [181]. _____	44
Figure 12 : Régulation de la voie de signalisation Sonic hedgehog d'après Philipp et Caron, 2009 [192]. _____	47
Figure 13 : Voies de signalisation et marqueurs exprimés au cours de la formation de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde. _____	49
Figure 14 : Représentation schématique de la différenciation des somites à l'origine de la formation du squelette axial modifiée d'après Parker, 2003 [200]. _____	51
Figure 15 : Resegmentation du sclérotome modifiée d'après Shapiro et Risbud, 2014 [207]. _____	53
Figure 16 : Formation des fibres de l'Annulus fibrosus interne et externe modifiée d'après Hayes, 2011 [220]. _____	58
Figure 17 : Transition notochorde-Nucleus pulposus chez l'embryon de souris. _____	60
Figure 18 : Représentation schématique d'un DIV lombaire durant la croissance modifiée d'après Sakai, 2015 [246]. _____	65
Figure 19 : Organisation lamellaire de l'Annulus fibrosus d'après Marchand, 1990 [252]. _____	67
Figure 20 : Modèle de différenciation des cellules notochordales embryonnaires aux nucléopulpcytes (NPCytes). _____	72
Figure 21 : Représentation schématique de la structure de CTGF, de ses partenaires protéiques et de ses récepteurs membranaires d'après Tran, 2013 [15]. _____	74
Figure 22 : Facteurs sécrétés par les cellules notochordales adultes (CNT matures) et réponse des chondrocytes de la plaque cartilagineuse, des nucléopulpcytes (NPCytes) et des cellules de l'Annulus fibrosus (AF). _____	78
Figure 23 : Implication des voies TGF- β /Nodal/Activin et FGF dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires d'après Pauklin et Vallier, 2015 [455]. _____	80
Figure 26: Stratégie de différenciation des cellules pluripotentes induites humaines (iPSC) en cellules notochordales (CNT). _____	121
Figure 27 : Validation des ARNm NOTO-GFP et GFP-NOTO. _____	159
Figure 28 : Effet de la tension en oxygène sur la différenciation des cellules stromales adipeuses (CSA) humaines en nucléopulpcytes (NPCytes). _____	168
Figure 29 : Modèle de différenciation des cellules stromales adipeuses humaines en nucléopulpcytes. _____	177

<i>Tableau I : Expression des marqueurs connus définissant le lignage nœud/notochorde de E7.5 à E14.5.....</i>	<i>23</i>
<i>Tableau II: Stratégies de thérapie génique du disque intervertébral d'après Priyadarshani et Yao, 2015.</i>	<i>95</i>
<i>Tableau III: Thérapie cellulaire du disque intervertébral d'après Sakai, 2015.</i>	<i>111</i>
<i>Tableau IV: Marqueurs connus exprimés par les cellules notochordales adultes et les nucléopulocytes chez l'homme.....</i>	<i>163</i>

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
PARTIE I.....	9
LE DISQUE INTERVERTEBRAL : DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE A LA MEDECINE REGENERATRICE	9
I- Développement embryonnaire du disque intervertébral.....	10
A- Dynamique cellulaire et moléculaire impliquée dans la formation de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde chez l’embryon	10
1- Morphogenèse de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde.....	13
La ligne primitive	13
Le nœud.....	15
La plaque notochordale	17
Emergence de la notochorde	19
Formation et composition de la gaine péri-notochordale.....	20
Apparition des vacuoles au sein de la notochorde	21
2- Spécification du lignage nœud/notochorde : signature moléculaire et réseau d’interactions génétiques.....	22
Signature moléculaire du lignage nœud/notochorde.....	24
Interactions génétiques au sein du lignage nœud/notochorde.....	27
Analyses de Chromatin Immuno-Precipitation sequencing	27
Régulation de l’expression des marqueurs du lignage nœud/notochorde par des éléments « enhancer »	29
B- Interaction des voies de signalisation TGF- β /Nodal/Activin, Wnt, FGF, BMP et Shh dans la formation du nœud et de la notochorde	31
1- Rôle de la voie de signalisation TGF- β /Nodal/Activin.....	31
Transduction du signal TGF- β /Nodal/Activine et mise en place de la ligne primitive	33
Spécification du lignage nœud/notochorde.....	34
Maintien de l’identité notochordale	35
2- Rôle de la voie de signalisation Wnt.....	37
Transduction du signal Wnt et mise en place de la ligne primitive	37
Spécification du lignage nœud/notochorde	38
Maintien de l’identité notochordale	39
3- Rôle de la voie de signalisation Fibroblast Growth Factor (FGF).....	39
Transduction du signal FGF et mise en place de la ligne primitive.....	41
Rôle de la voie FGF dans la spécification du lignage nœud/notochorde.....	42
4- Rôle de la voie Bone Morphogenic Proteins (BMP)	45

Transduction du signal BMP et mise en place de la ligne primitive.....	45
Spécification du lignage nœud/notochorde.....	46
5- Rôle de la voie Sonic hedgehog.....	48
Transduction du signal Shh.....	48
Spécification du lignage nœud/notochorde.....	48
Rôle de la voie Shh dans le maintien de l'identité notochordale.....	48
C- Formation des disques intervertébraux.....	52
1- Morphogenèse des corps vertébraux.....	52
Phénomène de resegmentation.....	54
Ossification endochondrale vertébrale.....	55
Les plateaux vertébraux.....	56
2- Morphogenèse de l' <i>Annulus fibrosus</i>	57
Formation des fibres de l'AF.....	59
3- Morphogenèse du Nucleus pulposus.....	61
Aspects morphologiques de la transition notochorde-NP.....	61
Aspects génétiques de la transition notochorde-NP.....	61
Activité sécrétoire des cellules notochordales.....	62
II- Le disque intervertébral: maturation, dégénérescence et médecine régénératrice.....	64
A- Maturation des disques intervertébraux.....	66
1- Maturation des plateaux vertébraux.....	66
2- Maturation de l' <i>Annulus fibrosus</i>	68
3- Maturation du <i>Nucleus pulposus</i>	69
Des cellules notochordales matures aux nucléopulpcytes.....	70
Mise en place du dialogue moléculaire entre les cellules notochordales matures et les nucléopulpcytes.....	73
Mise en place de la matrice extracellulaire adulte.....	76
B- La dégénérescence discale lombaire.....	80
1- Rupture du dialogue moléculaire au sein du NP.....	81
Effets protecteurs des facteurs sécrétés par les cellules notochordales adultes.....	81
Implication des facteurs connus CTGF, Shh et TGF- β	82
Implications des facteurs indépendants du dialogue moléculaire.....	84
2- Dégénérescence des plateaux vertébraux et de l' <i>Annulus fibrosus</i>	86
Modifications tissulaires des plateaux vertébraux.....	86
Modifications tissulaires de l' <i>Annulus fibrosus</i>	87
3- Stress cellulaire.....	88
L'apoptose.....	88
La sénescence.....	89

L'autophagie.....	89
C- Médecine régénératrice	92
1- Approches thérapeutiques en médecine régénératrice du DIV.....	92
L'injection de facteurs de croissance	93
La thérapie génique	96
La thérapie cellulaire.....	96
L'ingénierie tissulaire.....	98
2- Potentiel des cellules souches pluripotentes	99
Cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites	101
Maintien de la pluripotence.....	104
Différenciation des cellules pluripotentes	105
3- Potentiel des cellules souches et stromales mésenchymateuses	107
Etudes pré-cliniques et cliniques.....	112
Mécanismes de régénérescence activés par les cellules souches/stromales mésenchymateuses	113
III- Objectifs de la thèse	116
PARTIE II	118
CONTRIBUTION A LA MEDECINE REGENERATRICE DU DIV : DIFFERENCIATION NOTOCHORDALE ET NUCLEOPULPOGENIQUE DE CELLULES SOUCHES HUMAINES.....	118
IV- Différenciation notochordale des cellules souches pluripotentes induites humaines.....	119
A- Rationnel de l'étude	119
B- Article III.....	123
C- Discussion	153
V- Différenciation nucléopulpogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines	162
A- Rationnel de l'étude	162
B- Article IV.....	167
C- Discussion	169
VI- Conclusions/Perspectives	173
VII- Références bibliographiques	181

INTRODUCTION

La colonne vertébrale se compose de 24 vertèbres et 23 disques intervertébraux (DIV) dont 6 cervicaux, 12 thoraciques et 5 lombaires. Le DIV est une structure fibrocartilagineuse conférant élasticité et mobilité à l'ensemble de la colonne. Ce dernier se compose d'une partie périphérique l'*Annulus fibrosus* (AF) entourant une partie centrale appelée *Nucleus pulposus* (NP) et de deux plateaux vertébraux (PV) assurant la connexion avec les corps vertébraux supérieur et inférieur. Les PV sont vascularisés et assurent la diffusion de l'oxygène et des nutriments au NP et à l'AF. La distance entre les PV et le NP crée un gradient de concentration en oxygène atteignant environ 1% au centre du NP [1, 2].

A la naissance, le NP est essentiellement composé de cellules notochordales matures (CNT matures). Au cours de la croissance, les CNT matures disparaissent de façon précoce et un second type cellulaire appelé « chondrocyte-like » apparaît [3]. Ces cellules ont été assimilées à des cellules chondrocytaires pendant de nombreuses années de par leur activité sécrétoire proche de celle des chondrocytes articulaires. Des études plus récentes s'intéressant à l'origine embryonnaire des cellules du NP ont démontré que l'ensemble de ces cellules était issu de la notochorde [4, 5]. Cependant, aucune preuve formelle n'a été apportée quant à la différenciation des CNT matures en chondrocyte-like au cours de la croissance. La caractérisation du phénotype des cellules du NP chez l'homme adulte, a démontré l'expression de marqueurs spécifiques tels que *Paired box1* (*PAX1*), *Ovostatin2* (*OVOS2*), *Carbonic anhydrase* (*CA12*) et *CD24* [6, 7]. Leur activité sécrétoire est définie par un ratio agrécane/collagène de type II supérieur à 20 tandis que ce ratio est de 3 pour les chondrocytes articulaires [8]. Afin d'éviter les confusions entre chondrocyte-like et chondrocytes articulaires, nous avons proposé une nouvelle

nomenclature. Les chondrocyte-like sont ainsi dénommés nucléopulpocytes (NPCytes) [9-11].

La transition cellules notochordales adultes-nucléopulpocytes (CNT matures-NPCytes) fait aujourd'hui l'objet de nombreuses investigations puisqu'elle est associée à des modifications tissulaires importantes au sein du NP. Les CNT sécrètent différents facteurs de croissance dont le Connective tissue growth factor (CTGF) [12-15]. Ce facteur appartient à la famille des Connective tissue growth factor (CTGF), Cystein rich protein (Cyr61), et Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) (CCN) [16]. Il a été identifié comme responsable de la prolifération des NPCytes et de leur capacité à produire les composants de la matrice extracellulaire (MEC) typiquement retrouvés dans le NP. Cette MEC est principalement composée de protéoglycanes (PG) retenant les molécules d'eau, conférant ainsi un niveau d'hydratation d'environ 80% au NP [17]. Ces PG sont enchâssés dans une armature de fibres de collagène de type II formant un réseau élastique et conférant au NP sa capacité à absorber les chocs et répartir les contraintes mécaniques sur l'ensemble du DIV.

La sécrétion du facteur TGF- β (Transforming Growth Factor bêta) par les cellules du NP a également été démontrée [18]. Cependant, la source de cellules (CNT matures ou NPCytes) à l'origine de cette sécrétion n'est pas parfaitement identifiée. Ce TGF- β régule positivement l'expression du gène *CTGF* [14]. De plus, le facteur de transcription Hypoxia Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 α) exprimés également par les CNT matures et/ou les NPCytes régule négativement l'expression de *CTGF* [19]. Ces boucles de contrôle positives et négatives régulent l'expression de *CTGF*. Nous émettons ainsi l'hypothèse d'un dialogue moléculaire entre les CNT matures et les NPCytes assurant le maintien de l'homéostasie du NP en régulant l'expression et

l'activité des facteurs de croissance sécrétés par ces deux types cellulaires. La disparition des CNT matures entrainerait donc la rupture de ce dialogue à l'origine des perturbations de l'expression et de l'activité des facteurs CTGF et TGF- β . Ces perturbations sont à l'origine de la perte des fonctions biologiques et mécaniques du NP et des premiers signes de dégénérescence discale. Cette dégénérescence affecte principalement les étages lombaires et se caractérise au niveau tissulaire par une déshydratation et une fibrose du NP qui s'étend ensuite à l'AF, rendant le DIV incapable d'assurer sa fonction d'amortisseur de contraintes mécaniques [20]. La dégénérescence discale s'objective par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) avec une diminution du signal en séquence T2 [21]. Cet examen ne renseigne pas sur le caractère symptomatique de la dégénérescence, qui est révélé à l'examen clinique. Les douleurs lombaires d'origine discale représentent environ 40% des cas de lombalgies [22]. Ces lombalgies sont un véritable problème de santé publique et affectent environ 600 millions de personnes dans le monde [23]. La prise en charge thérapeutique des patients ainsi que les arrêts de travail fréquents représentent un coût annuel d'environ 90 milliards de Dollars aux Etats Unis [24] et 2 milliards d'Euros en France d'après une étude réalisée par la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés en 2012 (CNAMTS).

La prise en charge conventionnelle des douleurs lombaires consiste en l'administration de traitements pharmacologiques dans un premier temps. Des médicaments antalgiques et anti-inflammatoires sont proposés aux patients. Dans les cas de dégénérescence discale avancée, une prise en charge chirurgicale est finalement proposée basée sur 2 options : l'arthrodèse et l'arthroplastie. L'arthrodèse consiste en la fusion des vertèbres sus et sous-jacentes du DIV dégénéré [25]. L'arthroplastie consiste à remplacer les DIV dégénérés par une prothèse discale [26,

27]. Bien qu'efficaces sur les douleurs d'origines discales, ces traitements invasifs sont uniquement symptomatiques et ne ciblent en aucun cas l'origine de la dégénérescence discale.

Les connaissances acquises sur la physiopathologie discale permettent aujourd'hui de développer des stratégies thérapeutiques basées sur l'étiologie de la dégénérescence discale. Ainsi, des approches de médecine régénératrice du DIV intégrant le développement de thérapies cellulaires et de stratégies d'ingénierie tissulaire semblent prometteuses. Un résumé de ces approches innovantes a fait l'objet d'une lettre dans le journal Trends Biotechnology **Article 1 : Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissue engineers. P. Colombier, A. Camus, L. Lescaudron, J. Clouet, J. Guicheux, Trends Biotechnol, 2014.**

ARTICLE I

Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissues engineers

P. Colombier, A. Camus, L. Lescaudron, J. Clouet, J. Guicheux

Trends in Biotechnology, 2014

Résumé :

Il est aujourd'hui admis que l'étape d'initiation de la dégénérescence discale se produit dans la partie centrale du disque intervertébral (DIV), appelée *Nucleus pulposus* (NP). Cette dégénérescence discale est à l'origine de 40% des lombalgies. Dans cette revue, les nouvelles approches de médecine régénératrice du DIV basée sur la restauration des fonctions du NP sont discutées.

Special Issue: Next Generation Therapeutics**Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissue engineers**

Pauline Colombier^{1,2}, Anne Camus^{1,2}, Laurent Lescaudron^{1,2,3}, Johann Clouet^{1,2,4,5}, and Jerome Guicheux^{1,2,6}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche en Santé (UMRS) 791, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD), Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology (STEP) Group, Nantes, France

² Université de Nantes, Unité de Formation et de Recherche (UFR) Odontologie, Nantes, France

³ Université de Nantes, UFR Sciences et Techniques, Nantes, France

⁴ Université de Nantes, UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Nantes, France

⁵ Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Pôle Hospitalo-Universitaire (PHU) 7, Biologie-Pharmacie, Pharmacie Centrale, Nantes, France

⁶ Centre Hospitalier Universitaire Nantes, PHU 4, Ostéo-articulaire, Tête et Cou, Odontologie, Neurochirurgie, Neurotraumatologie (OTONN), Nantes, France

Intervertebral disc degeneration: the 'diktat' of the nucleus pulposus

The intervertebral disc (IVD) is a fibrocartilaginous tissue composed of a peripheral network of robust collagen fibers, termed the annulus fibrosus, which surrounds a hydrated gel-like central structure known as the nucleus pulposus (NP), and the inferior and superior cartilaginous endplates which provide the connection to the vertebral body. IVD aging inevitably leads to NP degeneration, with a decrease in cellularity and alterations in extracellular matrix (ECM) composition that ultimately affects the load-bearing capacity and mobility of the spine.

The NP contains two different cell types: the notochordal cells (NTCs) and the mature NP cells. The latter, predominantly found in adults, are currently called chondrocyte-like cells because of their rounded shape and secretory activity (type II collagen and proteoglycans), which are also found in articular chondrocytes. However, because of their singular phenotype [1,2] and acknowledged notochordal origin [3], we propose renaming these cells 'nucleopulpocytes' (NPCytes).

Recent experiments have shown that the secretion of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by NTCs promotes the proliferation of NPCytes and induces synthesis of the ECM [4]. The NTCs also protect NPCytes against apoptosis triggered in NP degeneration [5]. These data demonstrate the key role of NTCs in IVD homeostasis, and that NTC loss is the primary cause of IVD degeneration.

Forty percent of patients suffering from low back pain (LBP) are affected by IVD degeneration. This can be assessed clinically using magnetic resonance imaging, which can show dehydration of the NP, often accompanied by fibrosis. Inflammation of the vertebral body and a decrease in discal height are also observed. Currently, LBP is managed mainly with physiotherapy and pharmacological treatments and, if unsuccessful, with invasive surgical procedures (i.e., spine fusion or arthroplasty).

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

0167-7799/

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.006>

To address clinically discogenic LBP earlier in the degenerative cascade, disc repair strategies based on recent breakthroughs in the biology of degeneration could offer etiological alternatives for IVD regeneration. However, these strategies remain a challenge for tissue engineers.

Biologically-inspired strategies to regenerate the nucleus pulposus: a step forward in IVD regenerative medicine

Repair strategies based on the intradiscal injection of therapeutic agents targeting the pathological events of NP degeneration are considered to be promising. Indeed, the use of caspase inhibitors to prevent apoptosis in rabbit NP during degeneration has provided encouraging results. Intradiscal injection of the growth differentiation factor 5 (GDF5) in NP [6] has also been contemplated. Four Phase I/II clinical trials (NCT01182337, NCT01158924, NCT00813813, and NCT01124006) are in progress and the results will be available soon. Finally, the pivotal role of CTGF/CCN2 in IVD homeostasis [7] also makes it a potential candidate for intradiscal injection and deserves further investigation.

However, in addition to intradiscal injections, tissue engineers also aim to develop cell based approaches to 'regenerate' functionally the damaged tissue. In this context, mesenchymal stromal cells (MSCs) from adipose tissue or bone marrow have been described as good candidates. Clinical trials with intradiscal injections of MSC revealed benefits for both pain relief and IVD hydration [8]. Despite these promising results, discal height was not restored. To improve the reparative potential of these cells it has been proposed to utilize MSCs to generate an NPCyte lineage using growth factors (e.g., GDF5 and transforming growth factor- β) [9] before their injection. However, the ability of these committed cells to produce a functional NP matrix *in vivo* is unknown.

Recent advances in IVD development and biology strongly suggest that NTCs would be an instrumental tool for regenerative medicine. Given their early embryonic origin, the generation of NTCs requires the use of pluripotent cells

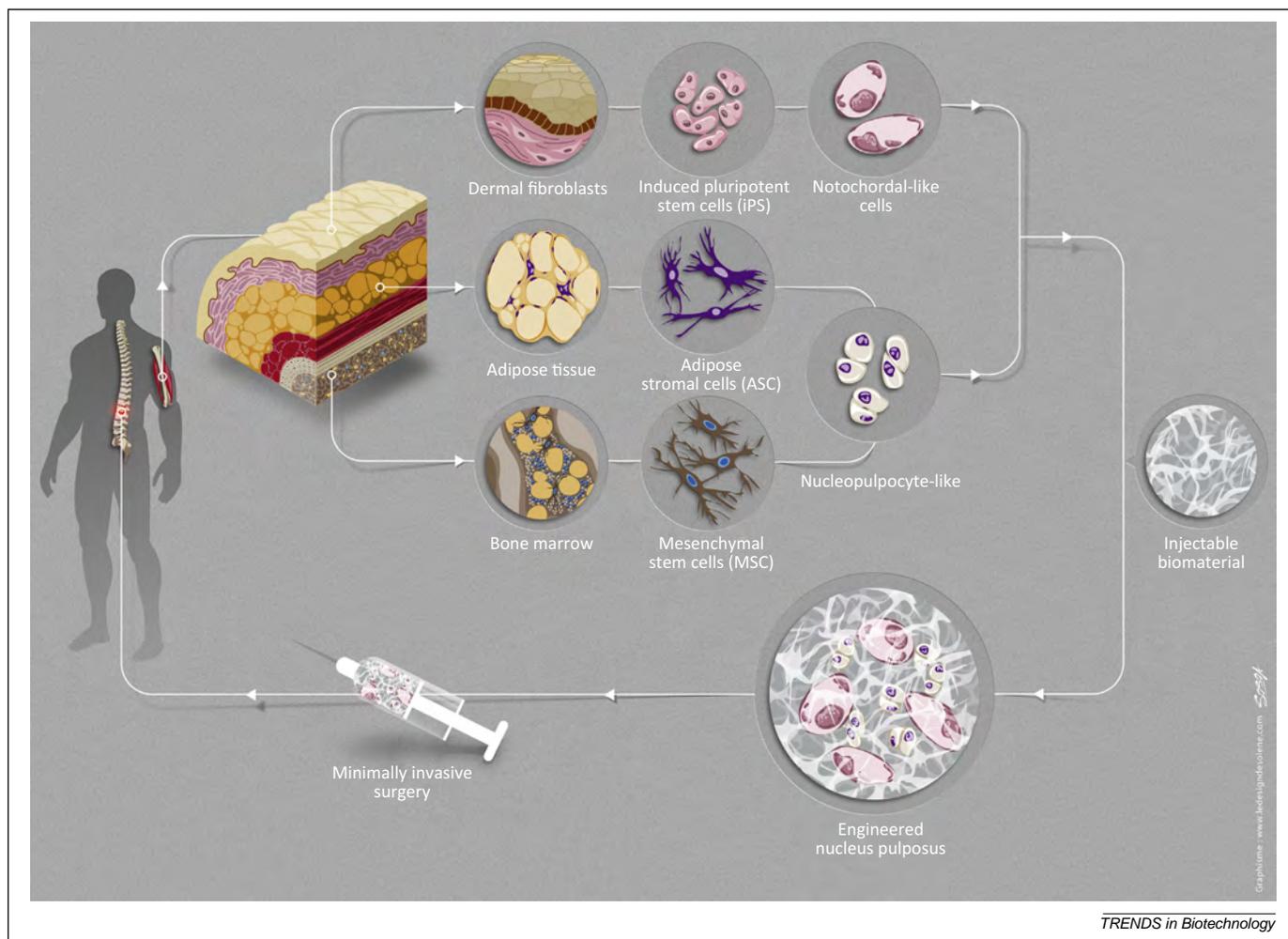


Figure 1. Conceptual diagram showing the future development of biology-inspired strategies for the regenerative medicine of intervertebral disc (IVD). Autologous dermal fibroblasts are harvested from skin and reprogrammed into pluripotent cells (iPS) before their differentiation towards a notochordal lineage. In parallel, mesenchymal stromal cells (MSC) are isolated from adipose tissue or bone marrow before their nucleolpocyte commitment. Finally, injectable biomaterials are used as the carrier for intradiscal injection of the *in vitro* engineered cells based on minimally invasive surgery.

such as induced pluripotent stem cells (iPSCs) or embryonic stem cells (ESCs) [10]. In contrast to ESCs, iPSCs do not have ethical issues regarding their use. Interestingly, a recent paper demonstrated the possibility of generating iPSC-derived murine NTCs *in vitro*, which were able to produce a collagen- and proteoglycan-rich matrix [11].

Tissue engineers have also investigated the use of cytoprotective biomaterials to protect cells from the ensuing death that occurs after injections into degenerated tissue. Biomaterials are indeed largely considered to be supportive scaffolds that improve cell survival and closely mimic the natural environment. Among the large variety of biomaterials, biocompatible and bioinjectable hydrogels are of particular interest because of their high level of hydration, which is comparable to the NP niche [12].

In conclusion, the combination of *in vitro*-generated functional NPCyte-like cells and NTC-like cells associated with hydrogels could provide an improvement to the regenerative medicine for IVD (Figure 1).

Rate-limiting steps and future directions

The transposition of biologically inspired strategies for NP regeneration from the bench to bedside will depend on our

ability to generate fully functional NTCs or NPCytes, manufacture smart biomimetic scaffolding materials, and establish a solid proof of concept (POC) in relevant animal models of disc degeneration.

Understanding the fundamental mechanisms that govern the terminal differentiation of NTCs to NPCytes is probably the first breakthrough that should be provided. Some promising cues have been gained, but new conceptual insights are now required before engineered functional NPCyte-like cells could be clinically available [13].

In parallel, the development of injectable scaffolds able to support IVD cell survival and activities is also required, given their unique properties. These biomaterials should ideally be resistant enough to sustain mechanical overload, permeable enough to ensure the diffusion of growth factors, oxygen, nutrients, and wastes, and also support the biological activity of NPCytes and NTCs. Recent progress in biomimetic advanced hydrogels has been made and they hold some promise [14].

The third obstacle is related to the definition of the most appropriate (closest to human) animal model for studying disc degeneration or regeneration. Porcine and bovine models have been proposed, but they fail to reproduce

temporally the natural human disc degeneration process and notably the loss of NTCs that occurs during childhood. Interestingly, the ovine model exhibits an age-dependant disc-degeneration process and thus appears to be among the most suitable systems in which to model preclinical POC. Sheep IVD also shares some common morphological features with human IVD, and may help in the development of translational surgical approaches [15].

Acknowledgments

We would like to thank INSERM, the Fondation pour la Recherche Médicale, the AO (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen) Foundation, the Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée (ET13-051), and the Region Pays de la Loire. P.C. is the recipient of a doctoral grant from the AXA Research Fund.

References

- 1 Clouet, J. *et al.* (2009) Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes. *Rheumatology* 48, 1447–1450
- 2 Minogue, B.M. *et al.* (2010) Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum.* 62, 3695–3705
- 3 Smith, L.J. *et al.* (2011) Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. *Dis. Model Mech.* 4, 31–41
- 4 Erwin, W.M. *et al.* (2006) Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 54, 3859–3867
- 5 Erwin, W.M. *et al.* (2011) Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res. Ther.* 13, R215
- 6 Le Maitre, C.L. *et al.* (2009) Expression of cartilage-derived morphogenetic protein in human intervertebral discs and its effect on matrix synthesis in degenerate human nucleus pulposus cells. *Arthritis Res. Ther.* 11, R137
- 7 Bedore, J. *et al.* (2013) Loss of notochord-derived CCN2 results in impaired intervertebral disc development and premature disc degeneration. *Arthritis Rheum.* 65, 2634–2644
- 8 Orozco, L. *et al.* (2001) Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation* 92, 822–828
- 9 Stoyanov, J.V. *et al.* (2011) Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *Eur. Cell Mater.* 21, 533–547
- 10 Takahashi, K. *et al.* (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2, 3081–3089
- 11 Chen, J. *et al.* (2013) Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) into nucleus pulposus-like cells. *PLoS ONE* 8, 75548
- 12 Bowles, R.D. *et al.* (2011) Tissue-engineered intervertebral discs produce new matrix, maintain disc height, and restore biomechanical function to the rodent spine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13106–13111
- 13 Choi, K.S. *et al.* (2011) Hedgehog signaling is required for formation of the notochord sheath and patterning of nuclei pulposi within the intervertebral discs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9484–9489
- 14 Huebsch, N. *et al.* (2009) Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* 462, 426–432
- 15 Alini, M. *et al.* (2008) Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur. Spine J.* 17, 2–19

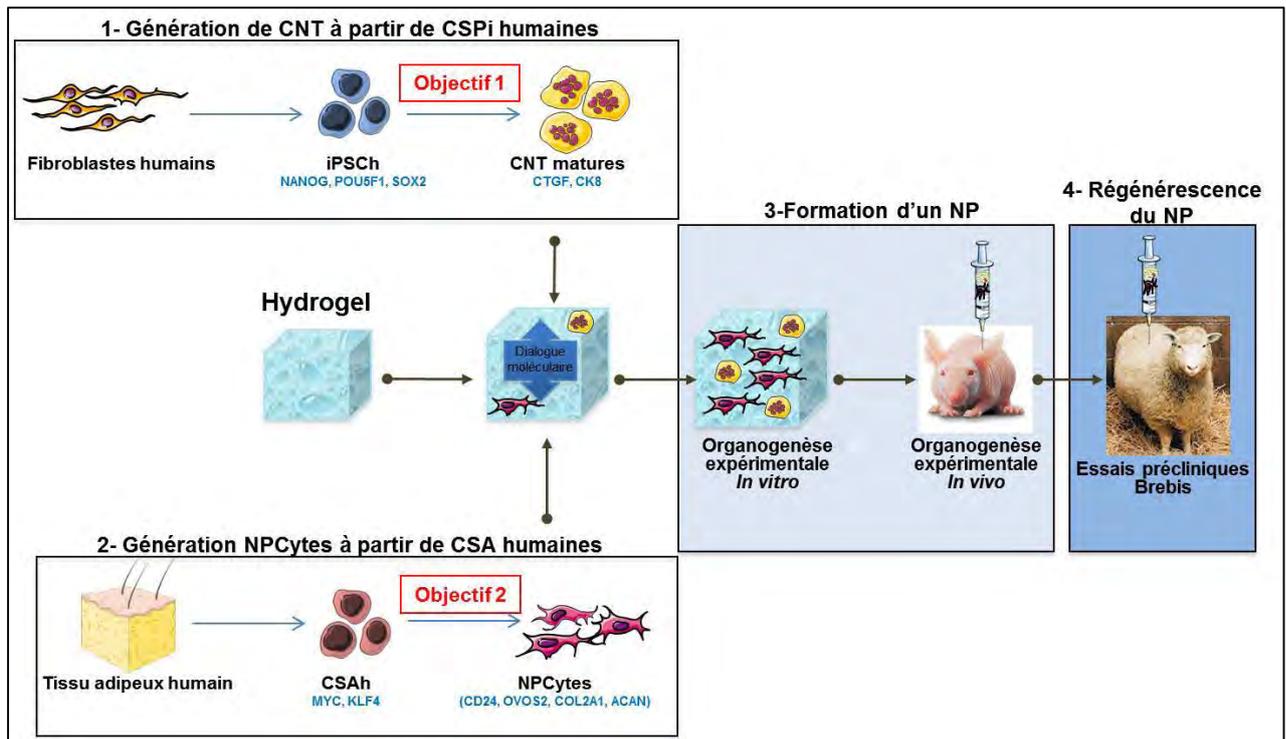


Figure 1 : Représentation schématique du projet REMEDIV développé par le laboratoire INSERM UMRS791. Ce projet comprend 4 grandes étapes dont les deux premières consistent en la production de CNT matures et de NPCytes à partir respectivement de cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSCh) et de cellules souches isolées du tissu adipeux humaines (CSAh). Ces deux étapes représentent les objectifs principaux de ce travail de thèse. L'étape 3 consiste en l'analyse *in vitro* et *in vivo* de la restauration du dialogue moléculaire entre les CNT matures et les NPCytes. Enfin, l'étape 4 consiste à faire la preuve de concept chez l'animal des effets régénérateurs de l'association des CNT matures et des NPCytes au sein du DIV.

La perspective d'une injection intradiscale de cellules régénératrices chez des patients souffrant de lombalgies d'origine discale représente une approche particulièrement prometteuse. Avant d'envisager la transposition de ce concept chez l'homme, l'identification de la source cellulaire adéquate ainsi que le devenir de ces cellules au sein de l'environnement discal sont des points cruciaux à maîtriser.

Le laboratoire INSERM UMRS791 de Nantes développe une stratégie de médecine régénératrice basée sur l'utilisation de cellules souches différenciées et associées à un biomatériau ayant des propriétés similaires à celles de la MEC du NP. Cette stratégie a pour objectif de régénérer le NP ou de retarder l'apparition des premiers signes de dégénérescence discale (Figure 1).

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce projet ambitieux. Le premier objectif a été d'établir un protocole de différenciation notochordale de cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC). Pour mener à bien cet objectif, l'étude du développement embryonnaire du DIV et plus précisément, des premières étapes de la formation de la notochorde est requise. Afin de proposer une source de cellules capables de restaurer la MEC du NP, le deuxième objectif de ce travail a été de générer des NPCytes. Les mécanismes de formation des NPCytes à partir de la notochorde n'étant pas décrits, nous avons étudié le potentiel de différenciation des cellules souches stromales adipeuses (CSA) dans la voie nucléopulpogénique.

La production de ces deux types cellulaires nous permettra d'atteindre notre objectif final qui est de restaurer le dialogue moléculaire au sein du NP et ainsi assurer une régénérescence du tissu à long terme.

PARTIE I

LE DISQUE INTERVERTEBRAL : DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE A LA MEDECINE REGENERATRICE

I- Développement embryonnaire du disque intervertébral

La compréhension des mécanismes fondamentaux à l'origine de la formation du DIV est cruciale pour orienter et préciser les stratégies de médecine régénératrice du DIV.

Le NP est formé à partir du mésoderme axial, également appelé notochorde [4, 5]. Cette structure a une origine embryonnaire particulière puisqu'elle dérive du nœud contrairement au mésoderme paraxial, intermédiaire et latéral qui sont issus de la ligne primitive. L'AF et les PV sont des structures qui dérivent du mésoderme paraxial. Elles résultent de la différenciation de la partie ventro-médiane des somites, appelée sclérotome. L'ensemble des signaux connus comme étant impliqués dans la spécification des cellules embryonnaires en NP, AF et PV est présenté dans ce chapitre.

A- Dynamique cellulaire et moléculaire impliquée dans la formation de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde chez l'embryon

La gastrulation se déroule pendant la troisième semaine de gestation chez l'homme. Cet événement est défini par l'apparition de la ligne primitive et la mise en place des trois feuillets embryonnaires que sont l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la formation de ces feuillets ont fait l'objet de nombreuses investigations. Cependant, l'accessibilité à l'embryon humain, en particulier aux stades précoces de développement post-implantatoire est rare et compliqué. L'article L.1241-5 du code de santé publique publié en 2004 définit le cadre juridique de l'utilisation des tissus embryonnaires et fœtaux : « *Des tissus ou cellules embryonnaires ou fœtaux ne peuvent être prélevés,*

conservés et utilisés à l'issue d'une interruption de grossesse qu'à des fins diagnostiques, thérapeutiques ou scientifiques.

La femme donne son consentement écrit après avoir reçu une information appropriée sur les finalités d'un tel prélèvement. Cette information doit être postérieure à la décision prise par la femme d'interrompre sa grossesse ». La loi prévoit aussi que les prélèvements à des fins de recherche biomédicale doivent être pratiqués dans le cadre de protocoles transmis préalablement à l'agence de la biomédecine. Les tissus embryonnaires entre 3 et 6 semaines sont difficiles à obtenir étant donné que les femmes interrompent leur grossesse à domicile par ingestion de prostaglandine ou d'un antagoniste de la progestérone. L'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les premières étapes du développement embryonnaire humain est difficilement réalisable. Ainsi, nos connaissances résultent principalement d'études réalisées chez l'embryon de xénope, de poulet, de poisson-zèbre et de souris.

Les événements clés de la formation de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde embryonnaire seront principalement décrits dans ce chapitre à partir des données obtenues chez la souris.

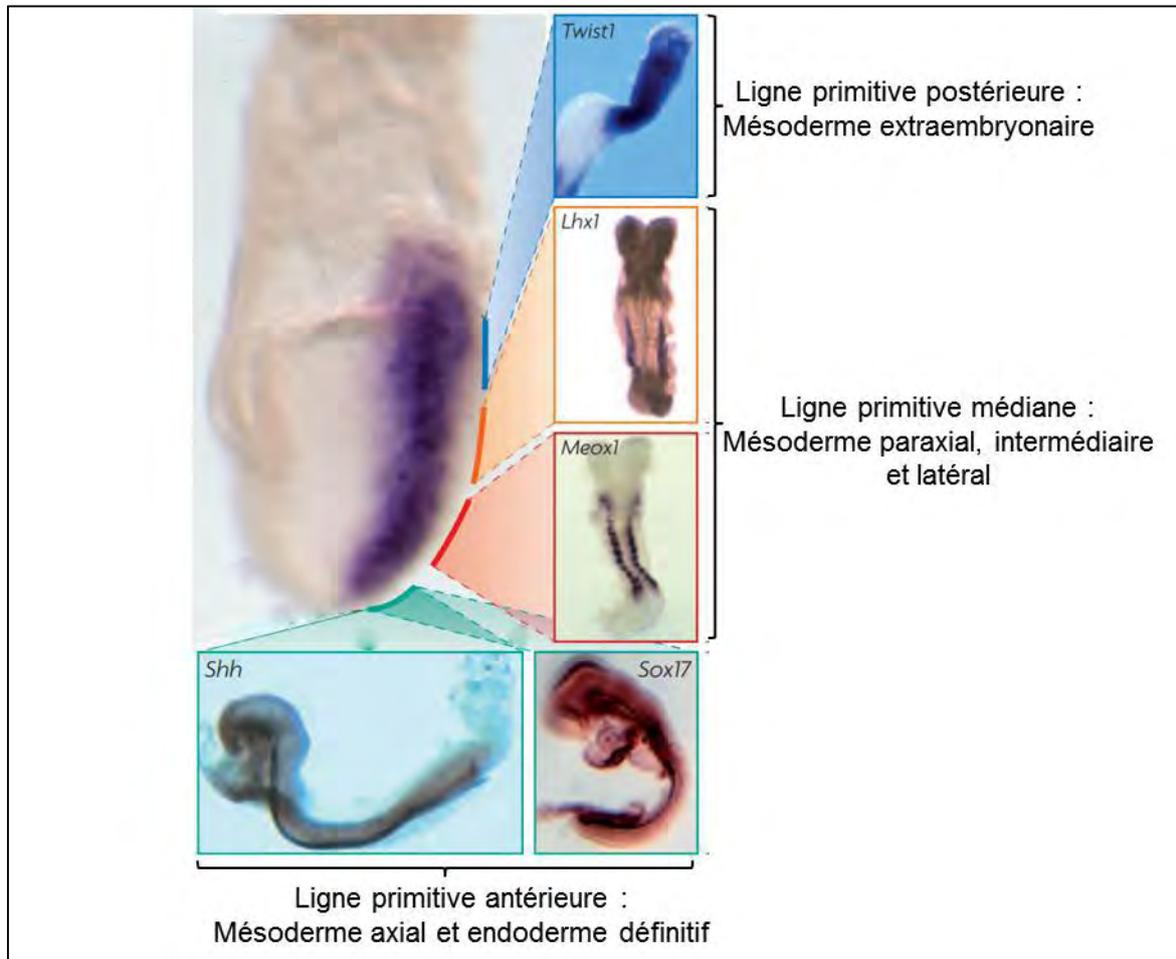


Figure 2 : Régionalisation de la ligne primitive chez la souris (E7.0) modifiée d'après Tam and Loebel, 2007 [28]. Une hybridation *in situ* montrant l'expression de *Mixl1* au sein de la ligne primitive a été réalisée (marquage violet). Les régions de la ligne primitive et leurs dérivés sont annotés sur le schéma. *Twist1* : Twist Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1, facteur de transcription exprimé par le mésoderme extra-embryonnaire. *Lhx1* : LIM homeobox protein 1, facteur de transcription exprimé par le mésoderme latéral. *Meox1* : mesenchyme homeobox 1, facteur de transcription exprimé par le mésoderme paraxial présomitique et les somites, *Sox17* : sex determining region Y box 17 : facteur de transcription exprimé par l'endoderme définitif, *Shh* : Sonic hedgehog, morphogène exprimé par le mésoderme axial, le plancher du tube neural et l'endoderme.

1- Morphogenèse de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde

La ligne primitive

Chez la souris, la ligne primitive apparaît au niveau de la jonction embryonnaire/extra-embryonnaire et définit la région postérieure de l'embryon au jour embryonnaire 6.5 (E6.5). Les cellules de l'épiblaste subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) caractérisée par le détachement des cellules de l'épiblaste (processus de délamination) [29]. Elles sont ensuite recrutées au sein de la ligne primitive. Les facteurs de transcription Brachyury (T), Mix Paired-Like Homeobox 1 (Mixl1) et Eomesodermin (Eomes) sont les marqueurs de la ligne primitive précoce [30-32]. Au cours de la gastrulation jusqu'à E7.5, la ligne primitive s'allonge avec le recrutement des cellules de l'épiblaste. Des expériences de cartographie du destin cellulaire ont démontré l'existence de régions distinctes le long de la ligne primitive. L'extrémité proximale génère le mésoderme extra-embryonnaire. La partie médiane de la ligne primitive donne, quant à elle, naissance au mésoderme paraxial, intermédiaire et latéral. Enfin, la partie distale appelée ligne primitive antérieure donne naissance au mésoderme axial ainsi qu'à l'endoderme définitif [33-37] (Figure 2). Chez le xénope et le poisson zèbre, la formation de l'endoderme et du mésoderme résulte de la différenciation de progéniteurs bipotents au sein de la ligne primitive antérieure. L'existence de ces cellules bipotentes au sein de la ligne primitive antérieure n'a cependant pas été démontrée chez les mammifères [38, 39].

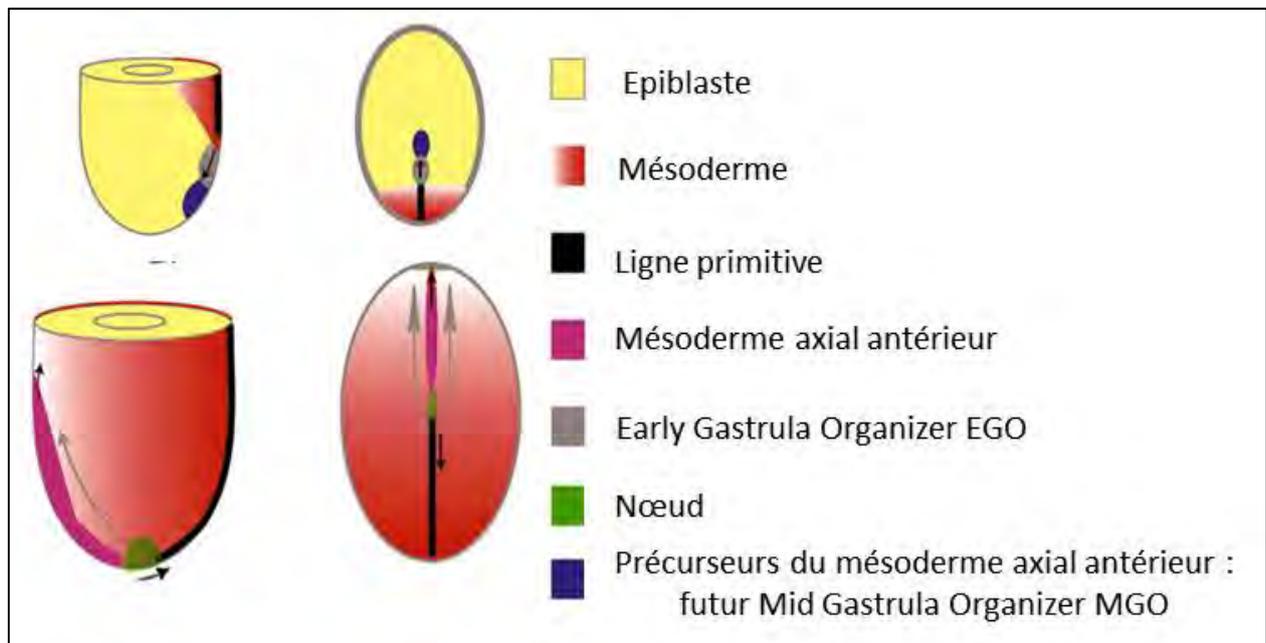


Figure 3: Evolution de l'organisateur précoce, intermédiaire et du nœud au cours de l'élongation de la ligne primitive modifiée d'après Kinder et al, 2001 [34]. La migration des cellules de l'EGO et du MGO pour former le nœud a lieu entre E6.5 et E7.5, en même temps que la ligne primitive s'allonge. La formation du mésoderme axial antérieur est issue de la migration des cellules de l'EGO et du MGO qui ne contribueront pas à la formation du nœud.

Le nœud

Des études de cartographie du destin cellulaire ont montré que le mésoderme axial est formé à partir des cellules de l'organisateur précoce (Early Gastrula Organizer EGO) [34]. L'existence de cet organisateur est conservée chez tous les vertébrés indiquant l'importance de cette structure pour le développement de l'embryon [40, 41]. Au tout début de la gastrulation à E6.5, ce groupe de cellules se situe à environ 50µm de la jonction extra-embryonnaire/embryon postérieure et expriment les marqueurs *Forkhead box A2 (FoxA2)*, *Goosoid (Gsc)* et *Notochord homeobox (Noto)* [42-44]. Au cours de l'élongation de la ligne primitive, certaines cellules de l'EGO sont retrouvées dans la partie la plus antérieure du mésoderme axial. Les autres cellules de l'EGO rejoignent les progéniteurs du mésoderme axial antérieur pour former l'organisateur intermédiaire (Mid Gastrula Organizer MGO). En plus des marqueurs *FoxA2*, *Gsc*, *Noto*, les cellules du MGO expriment alors à E7.0 *Chordin* et *Noggin* [45]. Un groupe de cellules du MGO migrent antérieurement et contribuent à la formation du mésoderme axial antérieur (plaque préchordale). Le mésoderme axial antérieur est caractérisé par l'expression de *Gsc*. Les autres cellules du MGO formeront le nœud à E7.5 (Figure 3). Les cellules du nœud sont caractérisées par l'expression de *FoxA2*, *T*, *Noto*, *Chordin*, *Noggin*, *Sonic hedgehog (Shh)*, *Forkhead box J1 (FoxJ1)* et la perte de l'expression de *Gsc* [46]. Lorsque la ligne primitive est élongée à son maximum, le nœud devient morphologiquement visible par une dépression à l'extrémité distale de l'embryon (E7.5).

Ainsi, une partie des cellules de l'EGO et du MGO donne naissance au mésoderme axial antérieur. L'autre partie des cellules est recrutée dans un premier temps au niveau du MGO puis du nœud et contribueront à la formation de la partie postérieure du mésoderme axial (notochorde) [34, 42, 47].

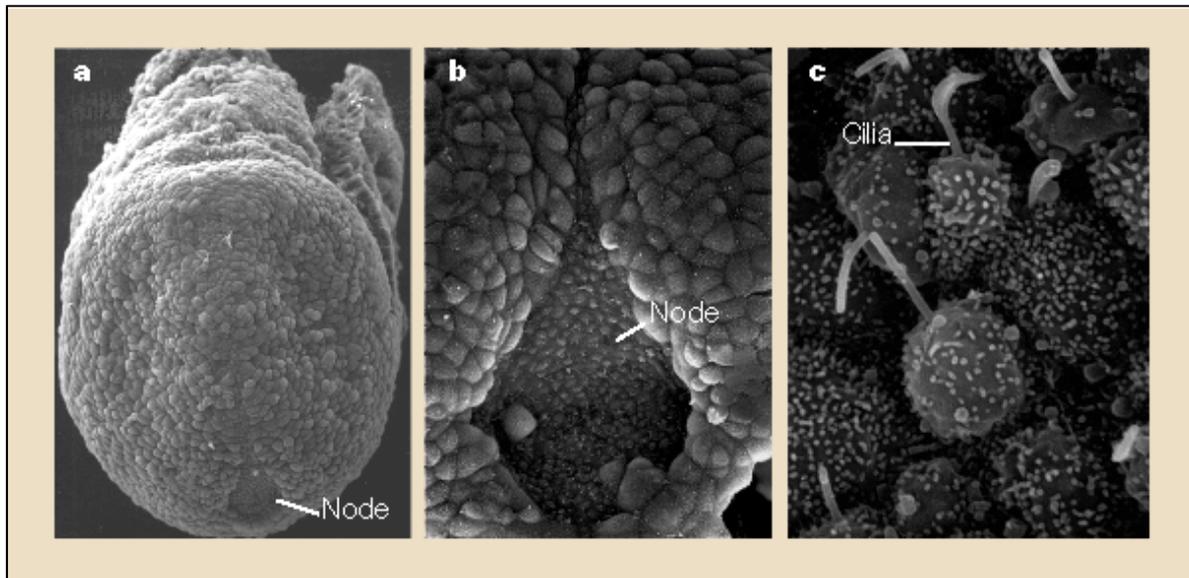


Figure 4 : Morphologie du nœud d'un embryon de souris (E7.5) observée en microscopie à balayage d'après Vogan et Tabin, 1999 [48]. (a) Observation du nœud au niveau de l'apex de l'embryon. La formation du mésoderme axial antérieure est également visible. (b) Observation du nœud en forme de fer à cheval formant une dépression sur la surface ventrale de l'embryon à fort grossissement. (c) Observation des cils primaires (cilia) présents au pôle apicale des cellules du nœud.

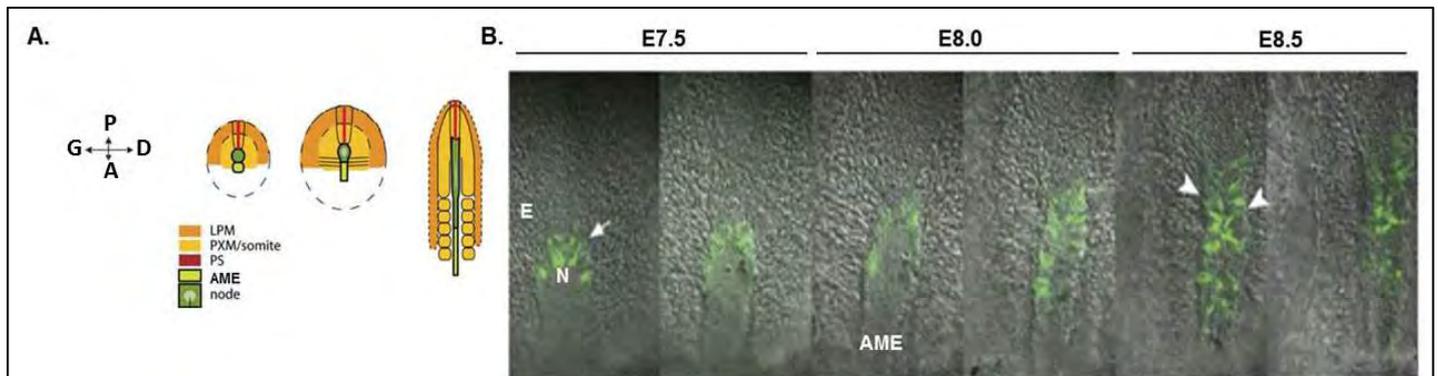


Figure 5 : Formation de la plaque notochordale chez l'embryon de souris modifiée d'après Yamanaka, 2007 [47]. (A) Représentation schématique du nœud à la surface ventrale d'un embryon de souris entre E7.5 et E8.5. LPM : mésoderme latéral, PXM : mésoderme paraxial, AME : mésoderme axial antérieur, Node : nœud. (B) Sections optiques montrant le nœud et formation de la plaque notochordale chez un embryon $Noto^{GFP/4}$ entre E7.5 et E8.5. Les cellules exprimant Noto localisées au sein du nœud (flèche blanche) et de la plaque notochordale (pointes de flèches blanches). A : antérieur, D : droite, E : endoderme, G : gauche, N : nœud, P : postérieur.

De la même manière que la contribution au mésoderme axial change, le profil d'expression des cellules de l'organisateur évolue. Ceci permet de distinguer l'EGO, du MGO et du nœud en parallèle de la formation de la ligne primitive.

Le nœud forme une dépression en forme de fer à cheval sur la surface ventrale de l'embryon (Figure 4). Le nœud est une structure bilaminaire composée d'une partie dorsale participant à la formation du plancher du tube neural et d'une partie ventrale à l'origine de la formation de la notochorde [34, 40, 49]. Les cellules du centre du nœud, appelées cellules du « creux » (« Pit »), sont petites et s'arrangent en colonnes. Elles sont entourées par des cellules plus larges appelées cellules de la couronne. Ces deux types cellulaires ont la particularité de présenter un cil unique au pôle apical impliqué dans la mise en place de l'asymétrie droite-gauche chez l'embryon [46, 49, 50].

La plaque notochordale

La notochorde est issue des cellules du nœud et sa mise en place débute à la fin de la gastrulation (E8.0) [51]. Les cellules de la notochorde naissante expriment les marqueurs *FoxA2*, *T*, *Noto*, *Chordin*, *Noggin* et *Sonic hedgehog (Shh)*. Les cellules du « creux » du nœud se relocalisent dans l'alignement de l'endoderme et s'intercalent dans l'endoderme suite à des mouvements de convergence-extension. Ces cellules forment alors la plaque notochordale [47, 49] (Figure 5).

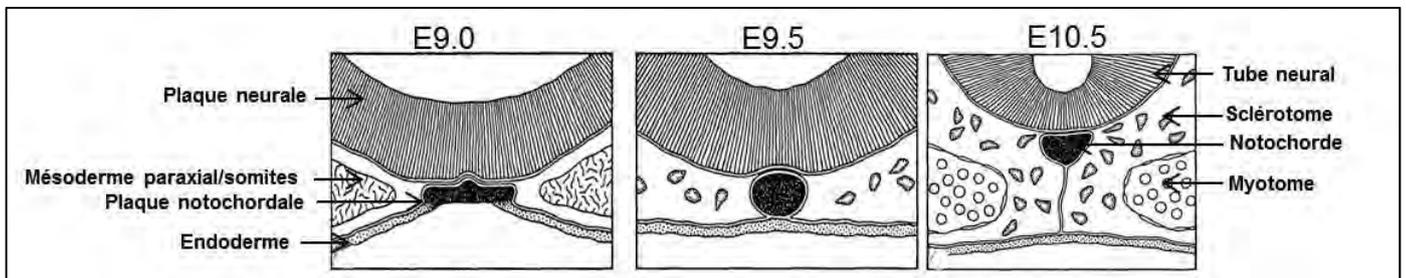


Figure 6 : Représentation schématique de la formation de la notochorde à partir de la plaque notochordale chez l'embryon de souris modifiée d'après Jurant, 1974 [51]. A E9.0, la plaque notochordale se détache de l'endoderme formant le toit du tube digestif. A E9.5, la notochorde est détachée du toit du tube digestif et adopte sa forme en tige. La notochorde reste accolée à la gouttière neurale. La lame basale entourant la notochorde est continue avec l'endoderme. A E10.5, la lame basale entourant la notochorde reste connectée avec le toit du tube digestif. La notochorde reste accolée au plancher du tube neural. La connexion entre notochorde et tube digestif n'est plus présente à E12.5.

A E9.0, le nœud n'est plus visible et la plaque notochordale se détache de l'endoderme par repliement dorsal pour former la notochorde (Figure 6). A ce stade, la notochorde adopte une structure en forme de tige et une position centrale dans l'embryon, en dessous du plancher du tube neural, au-dessus du toit du tube digestif et entourée par les somites.

Emergence de la notochorde

Le modèle classique de formation de la notochorde basé sur des études chez l'embryon de poulet repose sur la régression du nœud vers l'extrémité postérieure de l'embryon [52, 53]. Ce modèle classique ne s'applique cependant pas à la formation de la notochorde chez la souris. En effet, la distance entre le nœud et la base de l'allantoïde, marquant l'extrémité postérieure de l'embryon reste inchangée [47]. L'élongation de la notochorde s'effectue par des mouvements de convergence extension qui assurent l'intercalation des cellules à la surface ventrale de l'embryon. La formation de l'extrémité caudale de la notochorde est assurée par la migration postérieure des cellules de la couronne du nœud [47]. Une mutation spontanée dans la partie du gène *Noto* codant pour son domaine de liaison à l'ADN a été également identifiée chez la souris (mutant *Tc*). Ces mutants présentent un raccourcissement de la partie caudale suggérant que *Noto* joue un rôle dans l'élongation de la notochorde [42]. La précision du rôle de *Noto* dans l'élongation de la notochorde a été réalisée grâce aux mutants homozygotes et hétérozygotes qui expriment la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du promoteur *Noto* (*Noto^{gfp}*). L'expression de *Noto* au sein du nœud assure la restriction de l'expression du gène *Nodal* aux cellules de la couronne qui migrent postérieurement pour former la notochorde caudale. En revanche, les cellules du nœud des mutants *Noto^{gfp/gfp}* ne restent pas

dans l'axe médian de l'embryon mais sont retrouvées au sein du mésoderme paraxial [47, 54]. Le maintien anormal de l'expression de *Nodal* et la perte de l'expression de *FoxA2* et *T* reflète le changement d'identité de ces cellules. Des études antérieures réalisées chez le poisson zèbre avaient déjà montré que l'inactivation du gène *floating head (flh)*, homologue de *Noto* chez la souris, induit l'expression de *Myogenic differentiation (MyoD)* et la différenciation des CNT en cellules musculaires [55, 56].

Ainsi, le facteur de transcription *Noto* joue un rôle majeur dans la formation de la partie caudale de la notochorde et dans le maintien de l'identité des CNT.

Formation et composition de la gaine péri-notochordale

Plus tardivement, une gaine apparaît autour de la notochorde (E10.0) [57]. Cette gaine acellulaire chez la souris (cellulaire chez le poisson-zèbre) apparaît progressivement le long de l'axe rostro-caudal et reste présente à E16.5 [57, 58]. Elle est composée d'une lame basale, de collagènes et de PG (40% de glycosaminoglycanes (GAG) chondroïtin-4-sulphate, 40% de GAG chondroïtine-6-sulfate et 20% de GAG héparane sulfate) [59]. Des études portant sur les mécanismes de la formation de cette gaine ont montré l'expression de *Col2a1* et *Acan* par les CNT suggérant que cette gaine est produite par les CNT et non par les cellules mésenchymateuses environnantes [60-63]. De plus, les CNT des mutants présentant des défauts de formation de gaine (mutants *sox5^{-/-}*; *Sox6^{-/-}*) meurent par apoptose tout le long de la notochorde [63]. Des souris mutantes homozygotes et hétérozygotes *Danforth's short tail* (mutants *Sd*) présentent une notochorde discontinue et une gaine péri-notochordale fine comparée aux embryons sauvages. Bien que la composition de la gaine soit similaire, sa disparition avant E14.0 est à l'origine des défauts de formation des vertèbres et des *Nuclei pulposi* [57, 64]. Ces

observations suggèrent que la gaine péri-notochordale est impliquée dans la survie des CNT et la mise en place des *Nuclei pulposi*.

Apparition des vacuoles au sein de la notochorde

Les CNT ont la particularité de présenter des vacuoles intracellulaires. Ces vacuoles apparaissent au sein des CNT à partir de E12.5. Les mécanismes à l'origine de la formation de ces vacuoles sont très peu décrits chez la souris. Une étude datant de 1974 rapporte la formation de ces vacuoles à partir du réticulum endoplasmique des CNT [51]. Une étude plus récente réalisée chez le poisson-zèbre a montré que ces vacuoles étaient formées à partir du bourgeonnement de l'appareil de Golgi [65]. La membrane de ces vacuoles présente des pompes à protons responsables de l'acidification du milieu intra-vacuolaire au cours de leur biogenèse et de leur retour à un pH neutre une fois formées. Il y a plusieurs années, l'hypothèse d'un transport de GAG par ces vacuoles avait été émise dans le modèle de l'urodèle (salamandre) [66]. Cette hypothèse était en faveur du rôle des CNT dans la production de la gaine péri-notochordale. Cependant, aucune preuve en ce sens n'a été rapportée chez la souris, Le matériel intra-vacuolaire n'est pas caractérisé à l'heure actuelle. Les études réalisées chez le poisson-zèbre suggèrent que ces vacuoles pourraient être impliquées dans l'élongation de la notochorde [65, 67]. Une autre étude réalisée chez le chien après la naissance souligne le rôle des vacuoles des CNT dans le maintien de l'équilibre osmotique *in vitro* [68]. Cependant, aucune donnée n'atteste d'un potentiel rôle de régulation de l'équilibre osmotique au cours de l'embryogenèse chez la souris ou chez l'homme.

2- Spécification du lignage nœud/notochorde : signature moléculaire et réseau d'interactions génétiques

Des études génétiques ont permis de préciser les gènes responsables de la formation du mésoderme axial. Les embryons de souris mutants *FoxA2*^{-/-} présentent un défaut de formation du nœud et de l'ensemble du mésoderme axial [69]. Chez les embryons dont l'expression de *T* est invalidée, le mésoderme axial antérieur est spécifié et comparable aux embryons sauvages. En revanche, des défauts de mise en place du nœud et de l'extrémité caudale de la notochorde sont rapportés [70]. Enfin, les mutants dont le gène *Noto* est inactivé présentent des défauts mineurs dans la formation de la notochorde caudale [42, 54]. Alors que le rôle des facteurs de transcription *FoxA2* et *T* est identique dans les modèles de souris et du poisson-zèbre, les embryons dont le gène *flh* est muté (homologue de *Noto*) sont caractérisés par une absence complète de notochorde. Ces observations montrent le rôle majeur du gène *flh* dans la spécification de la notochorde chez le poisson-zèbre [71].

Tableau I : Evolution de l'expression des marqueurs présents dans le lignage nœud/notochorde de E7.5 à E14.5 *Le stade E7.5 correspond à la fin de la gastrulation. A E8.5, le nœud est formé, allongé et donne naissance à la notochorde. A E9.5, l'embryon de souris se retourne et adopte sa position définitive. La notochorde est détachée de l'endoderme. Le stade E11.5 marque la fin de l'élongation de la notochorde. Le stade E12.5 correspond à l'initiation de la formation des Nuclei pulposi et E14.5 marque la fin de la formation des Nuclei pulposi. ND : Expression non déterminée*

Gènes/Stades	E7.5	E8.5	E9.5	E11.5	E12.5	E14.5	Références
FoxA1	[Barre noire]						[72, 73]
FoxA2	[Barre noire]						[69, 72, 74-78]
Noto	[Barre noire]						[42, 47, 54, 79]
T	[Barre noire]						[70, 80, 81]
Shh	[Barre noire]						[82-86]
FoxJ1	[Barre noire]		ND	ND	ND	ND	[54, 87]
Rfx3	[Barre noire]		ND	ND	ND	ND	[54, 87]
Noggin	[Barre noire]			ND	ND		[45, 83, 88-90]
Chordin	[Barre noire]		ND	ND	[Barre noire]	ND	[45, 90, 91]
Gal3		[Barre noire]					[92]
Sox5		ND	ND	[Barre noire]		ND	[63]
Sox6		ND	ND	[Barre noire]		ND	[63]
Sox9		[Barre noire]					[93]
Col2a1			[Barre noire]				[60, 62, 63]
Acan	ND	ND	ND	[Barre noire]	ND	ND	[63, 93]

Signature moléculaire du lignage nœud/notochorde

Les marqueurs détectés le lignage nœud/notochorde dépend du stade de développement considéré. Le Tableau I résume l'expression des marqueurs principaux du nœud et de la notochorde entre E7.5 et E14.5 chez la souris. Ces stades de développement concernent la formation du nœud à la fin de la gastrulation (E7.5), la formation de la notochorde et sa transformation en Nucleus pulposus (E14.5).

L'expression du marqueur *Galectin 3* est spécifique à la notochorde chez l'embryon de souris entre E8.5 et E11.5 [92]. Son expression a également été démontrée dans la notochorde humaine à partir de 6 à 9 semaines de gestation [94, 95]. L'expression de *Sox9* est détectée dès E8.5 tandis que l'expression des facteurs de transcription *Sox5* et *Sox6* est retrouvée plus tardivement, à partir de E11.5. La formation de la notochorde a lieu chez les doubles mutants *Sox5^{-/-};Sox6^{-/-}*. Cependant, ces mutants présentent des défauts dans la formation de la gaine péri-notochordale, de survie des CNT et de synthèse de MEC. Ces observations montrent que les facteurs *Sox5* et *Sox6* ont un rôle dans la maturation de la notochorde et non dans sa mise en place [63]. Le phénotype des embryons de souris *Sox9^{-/-}* est similaire suggérant que malgré une expression précoce (E8.5), le facteur de transcription *Sox9* a un rôle majeur dans la maturation de la notochorde [93].

En 2008, de nouveaux marqueurs du lignage du nœud/notochorde ont été identifiés. Des analyses transcriptomiques ont été réalisées à partir d'embryons sauvages et d'embryons dont l'expression de *FoxA2* est réduite (E7.75) [96]. Les résultats ont été validés par hybridation *in situ* et montrent l'expression des marqueurs *Forkhead box D4 (FoxD4)*, *SPARC Related Modular Calcium Binding 1 (Smoc1)*, *Myeloid Leukemia Factor 1 (Mlf1)* et *Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase (Pim1)* au sein

du nœud à E7.75. En parallèle, l'analyse de la ciliogenèse chez des embryons de souris mutants homozygotes et hétérozygotes *Noto*^{GFP} a également rapporté l'expression de nouveaux marqueurs du nœud. Il s'agit des gènes *Dynein*, *Light Chain*, *Roadblock-Type 2 (Dynlrb2)* et *Dynein, Cytoplasmic 2, Heavy Chain 1 (Dync2h1)* impliqués dans la formation du cil [54, 79]. Grâce aux mutants *Noto*^{GFP}, de nouveaux marqueurs spécifiquement exprimés dans la notochorde ont également été décrits tels que le *dihydropyrimidine dehydrogenase (Dpyd)*, le *BicC Family RNA Binding Protein 1 (Bicc1)* et la *Monoxygenase DBH-Like 1 (Moxd1)* [97].

Bien que la description de ces nouveaux marqueurs définisse plus précisément le lignage nœud/notochorde, leur fonction n'a pas encore été étudiée. Ces études ont également rapportée l'expression de *Ctgf* dans le nœud et dans le mésoderme axial [97]. Des souris dont ce gène a été invalidé, ont démontré son importance dans la production de la MEC des NP (dès E15.5). En effet, une absence d'agrecane et de collagène de type II est observée dans les NP des embryons mutants [98]. Les NP sont cependant formés mais subissent un processus de vieillissement accéléré après la naissance. Le facteur *Ctgf* aurait donc un rôle majeur dans la mise en place de la MEC du NP durant la croissance et la prévention de sa dégénérescence.

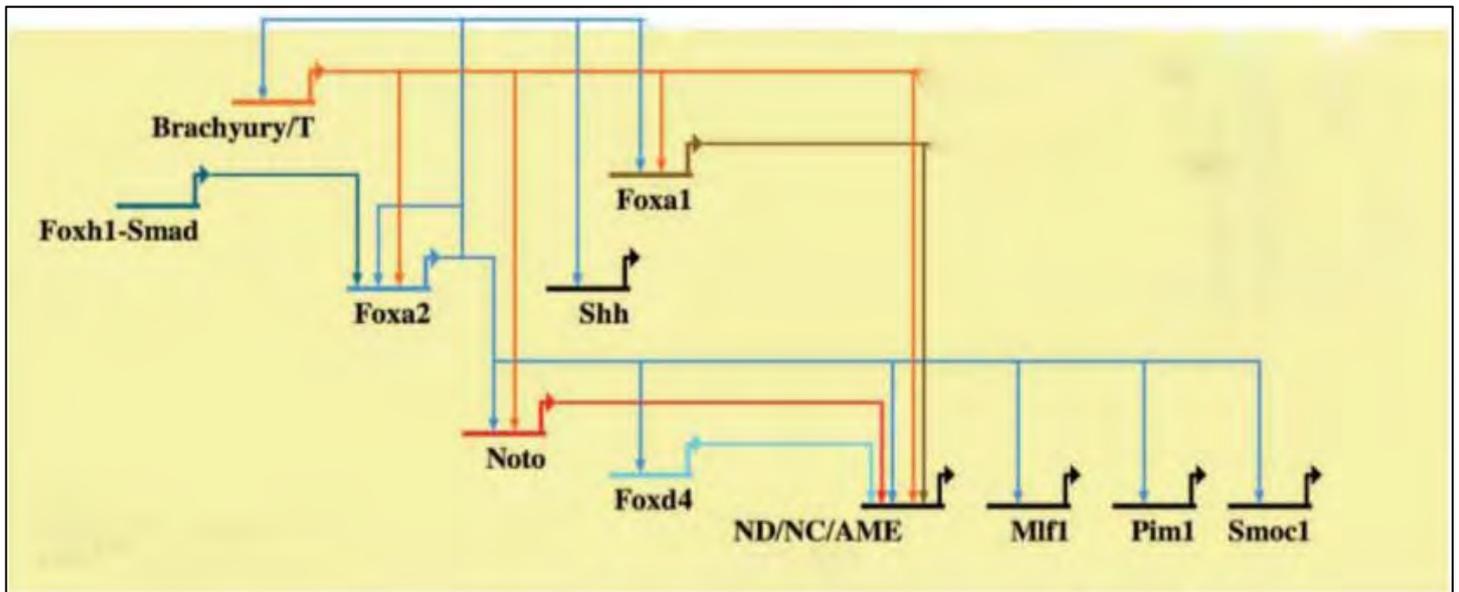


Figure 7 : Modèle d'interactions génétiques proposé par Tamplin en 2008 [96].
 ND/NC/AME correspond à l'ensemble des marqueurs non connus du nœud, de la notochorde et du mésoderme axial. Le réseau défini en bleu correspond aux fixations potentielles de FoxA2 sur les promoteurs de T, FoxA2, Shh, Noto, FoxA1, FoxD4, Mlf1, Pim1 et Smoc1. Le réseau défini en orange correspond aux fixations potentielles de T sur les promoteurs de FoxA2, Noto et FoxA1. Les réseaux définis en rouge, vert et bleu clair correspondent aux fixations potentielles de Noto, FoxA1 et FoxD4 sur les promoteurs de gènes exprimés dans le nœud, la notochorde et le mésoderme axial.

Interactions génétiques au sein du lignage nœud/notochorde

Un modèle de régulations génétiques impliquées dans la formation du nœud et de la notochorde a été proposé par Tamplin en 2008 (Figure 7). Celui-ci repose sur l'analyse des séquences de liaisons prédictives des facteurs de transcription FoxA2 et T aux promoteurs des gènes exprimés dans le lignage nœud/notochorde. La capacité de FoxA2 à lier son propre promoteur et réguler son expression a été confirmée par une étude parallèle [99]. Ces données illustrent la complexité des régulations et des interactions génétiques assurant la formation du lignage nœud/notochorde.

Analyses de Chromatin Immuno-Precipitation sequencing

La précision de ce modèle est aujourd'hui possible grâce à la technologie de séquençage à haut débit des motifs d'ADN liés par les facteurs de transcription FoxA2 et T (Chromatin Immuno-Precipitation sequencing : ChIP sequencing). Cette technique permet de cartographier des régions de la chromatine liées à ces facteurs de transcription. L'analyse des séquences d'ADN fixées par T dans un modèle *in vitro* de ligne primitive formée à partir de corps embryoides de cellules ES murines a démontré que T régulait directement sa propre expression, mais également celles de Gsc et de FoxA2 [100]. Cependant, les mécanismes par lesquels Gsc est exclusivement exprimé dans le mésoderme axial antérieur, alors que T et FoxA2 sont exprimés tout le long du mésoderme axial, sont inconnus. Ces travaux ont également mis en évidence une régulation de l'expression de *Mixl1* par T. L'ensemble de ces résultats *in vitro* a été corrélé à une analyse transcriptomique réalisée sur des embryons de souris dont l'expression de T est réduite (mutants Curtail, [101]). Bien que d'anciennes études montrent une absence d'expression de *Mixl1* dans le nœud

[31, 102], une étude plus récente rapporte l'expression de ce marqueur dans les cellules de la couronne du nœud et dans la partie caudale de la notochorde à E9.0 [103]. Les mutants *Mixl1*^{-/-} n'ont pas de nœud distinguable à E7.5 [104]. Cependant, l'expression de *FoxA2*, *Nodal*, *T*, *Gsc* et *Shh* est détectée dans la partie antérieure de la ligne primitive indiquant que les progéniteurs du mésoderme axial sont formés. Ainsi, les défauts de formation du mésoderme axial suggèrent que *Mixl1* est impliqué dans la migration de ces progéniteurs.

D'autres cibles de T ont été identifiées *in vitro* telles que *FoxJ1* et *Cdh2* suggérant un rôle de T dans la ciliogenèse au niveau du nœud mais également dans la transition épithélio-mésenchymateuse au sein de la ligne primitive [100]. Une autre étude de ChIP sequencing a été réalisée *in vitro* (corps embryoïdes) révélant une fixation de T sur les promoteurs de *Fgf8* et *FoxA2* [105]. Ces données n'ont pas été corrélées à des analyses *in vivo*. Aucune analyse de ChIP sequencing *FoxA2* n'a été réalisée dans un modèle de type ligne primitive/nœud/notochorde.

Ces données illustrent la complexité des régulations génétiques dans les étapes précoces de la formation de l'embryon. En effet, les facteurs de transcription jouent des rôles différents selon leur localisation dans l'embryon et les stades embryonnaires auxquels ils sont analysés. De façon très surprenante, les analyses de ChIP sequencing T ainsi que les analyses transcriptomiques ne rapportent pas le promoteur de *Noto* comme cible. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'absence de détection de *Noto*. Premièrement, ces analyses n'ayant pas été réalisées spécifiquement dans le nœud et la notochorde, le seuil de détection du promoteur de *Noto* peut ne pas avoir été atteint. En effet, ce lignage représente peu de cellules dans l'embryon (entre 150 et 250 cellules) et donc également peu de cellules au cours de la formation de corps embryoïdes. Ceci implique que les motifs

d'ADN spécifiques du promoteur de *Noto* ou que les ARNm *Noto* sont trop peu représentés pour être détectés. Deuxièmement, l'existence d'un facteur de transcription intermédiaire activé par FoxA2 et T régulant l'expression de *Noto* pourrait expliquer ce résultat. En effet, si ce facteur existe et qu'il n'interagit pas physiquement avec FoxA2 ou T, les analyses de CHIP-sequencing FoxA2 et T ne rapporteront pas les motifs d'ADN liés par ce facteur.

Régulation de l'expression des marqueurs du lignage nœud/notochorde par des éléments « enhancer »

En parallèle de ces analyses, la régulation de l'expression de *FoxA2* spécifiquement dans le lignage nœud/notochorde a été étudiée. Un élément de régulation positive (élément enhancer) a été identifié comme responsable de l'expression de *FoxA2* dans ce lignage [76, 106]. Cette séquence possède un domaine de liaison aux protéines Tead. Malgré le rôle peu connu à ce jour de ces facteurs de transcription dans l'embryogenèse, leur fixation à cette séquence est requise pour l'expression de *FoxA2* au sein du lignage nœud/notochorde. Cette étude montre également que l'activation de cette séquence de régulation et donc de l'expression de *FoxA2* dans le nœud est également dépendante de la présence d'un deuxième facteur de transcription non connu à ce jour. L'insertion de mutations dans cette séquence de régulation positive a montré que son activation *in vitro* était dépendante de Wnt3A et de la β -Catenin. L'expression des facteurs Tead n'est pas influencée par la voie Wnt/ β -catenin. De plus, l'élément de régulation positive de *FoxA2* ne présente pas de motif de liaison pour les facteurs TCF/LEF. Ainsi, l'hypothèse de la régulation de l'expression du deuxième facteur par la voie Wnt/ β -catenin a été émise [77, 107]. La présence de ce deuxième facteur n'est pas requise pour l'expression de *FoxA2* dans la notochorde.

L'existence d'une séquence de régulation positive appelée NOCE pour Node and Nascent Notochord Enhancer au locus Noto a été montrée chez la souris. Cet élément possède des domaines de liaisons pour les facteurs de transcription FoxA2, Tead et TCF/LEF. Cependant, seul FoxA2 a été démontré comme étant activateur de l'expression de Noto *via* sa fixation sur NOCE [79]. C'est à ce jour la seule étude décrivant la régulation de l'expression de Noto au sein du nœud et de la notochorde.

La description de nouveaux marqueurs ainsi que des régulations génétiques impliquées dans la spécification de ce lignage définit plus précisément la population du nœud et de la notochorde. Ceci permet d'envisager le développement de modèles *in vitro* de différenciation de cellules souches pluripotentes en CNT, récapitulant les différentes étapes de formation de ce lignage.

Après avoir décrit la signature moléculaire du lignage nœud/notochorde, l'implication des voies de signalisation TGF- β /Nodal/Activin, Wnt, FGF, BMP et Shh dans la spécification de ce lignage ainsi que dans le maintien de l'identité des CNT sont décrites ci-dessous. Le nœud étant formé au niveau de la région antérieure de la ligne primitive, le rôle de ces voies de signalisation dans la mise en place de la ligne primitive est brièvement décrit.

B- Interaction des voies de signalisation TGF- β /Nodal/Activin, Wnt, FGF, BMP et Shh dans la formation du nœud et de la notochorde

1- Rôle de la voie de signalisation TGF- β /Nodal/Activin

La mise en place de l'endoderme viscéral antérieur permet la restriction de l'expression de *Nodal* dans l'épiblaste postérieur et l'initiation de la gastrulation avec la formation de la ligne primitive. L'activité de la voie de signalisation Nodal a été montrée comme essentielle dans la mise en place de la ligne primitive et du nœud [108].

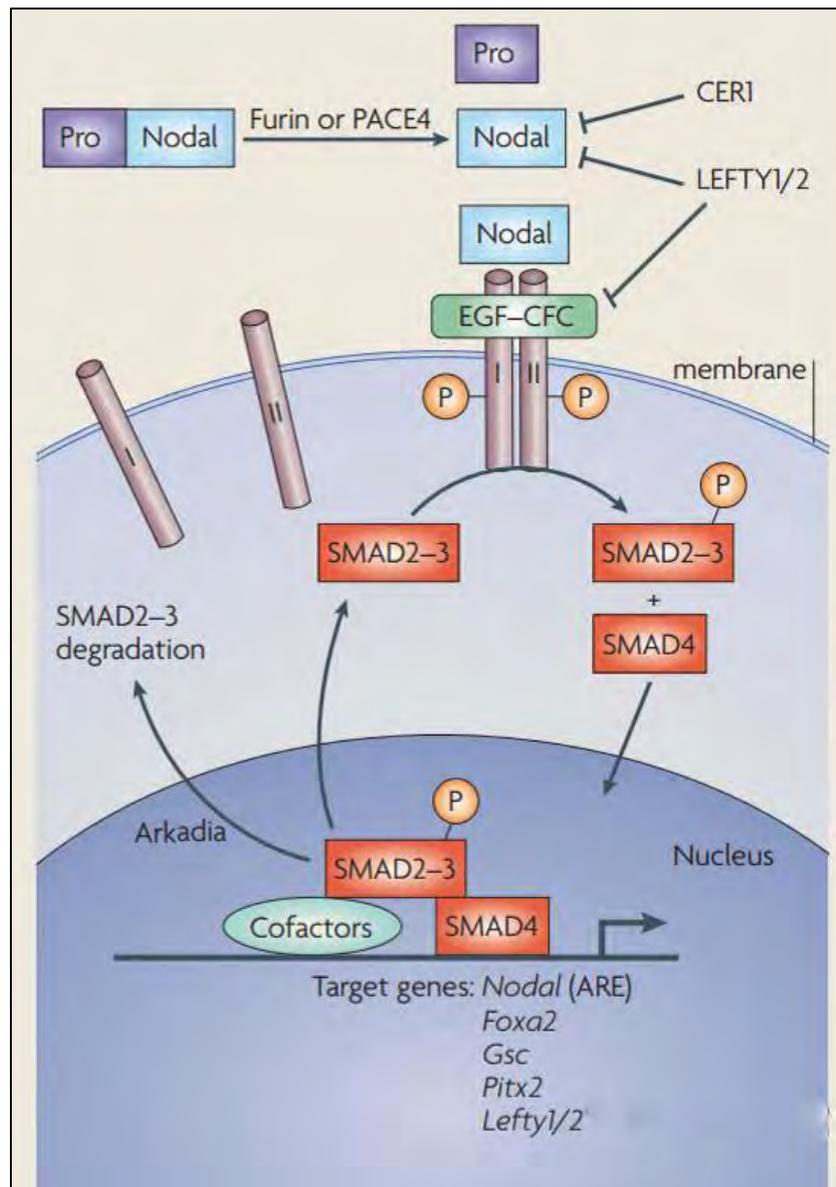


Figure 8: Régulation de la voie de signalisation TGF- β /Nodal/Activine d'après Arnold et Robertson, 2009 [109]. L'activité du facteur Nodal est assurée par le clivage de son pro-domaine par les convertases Furin ou PACE4. La fixation de Nodal à ses récepteurs Alk4/7 entraîne le recrutement des co-récepteurs EGF-CFC. L'activation du complexe transmembranaire est assurée par l'auto-phosphorylation des thréonines et sérines situées dans la partie intra-cellulaire des récepteurs de type I. Le signal Nodal est transduit par les effecteurs intra-cellulaires Smad2/3 dont l'activité est dépendante de leur phosphorylation sur les sérines. Après recrutement du médiateur Smad4, le complexe est transloqué au noyau assurant ainsi la régulation de l'expression de gènes cibles tels que Nodal, FoxA2, Gsc, Pitx2 et Lefty1/2.

Transduction du signal TGF- β /Nodal/Activine et mise en place de la ligne primitive

La liaison de Nodal sur ses récepteurs à activité serine thréonine kinase de type II (ActRIIA, IIB) entraîne la phosphorylation et activation des récepteurs de type I (ActRIB ou Activin-like Receptor 4/7 ALK4/7) puis le recrutement de corécepteurs composés d'un motif Epidermal Growth Factor et d'un domaine riche en cystéines (EGF-CFC) [110, 111] (Figure 8). Ces corécepteurs, appelés Cripto et Cryptic sont essentiels à la transmission du signal aux effecteurs intracellulaires [112-114]. L'activine A possède les mêmes récepteurs que Nodal mais la transduction du signal est indépendante des corécepteurs Cripto et Cryptic [115]. Le signal TGF- β /Nodal/Activine est transduit par la phosphorylation et l'activation des effecteurs intracellulaires Smad2 et Smad3 capables de recruter le médiateur Smad4 [116]. Cette association permet la translocation du complexe au noyau, le recrutement de corégulateurs transcriptionnels et la régulation de l'expression des gènes cibles [117]. Le corégulateur transcriptionnel majoritairement caractérisé pour la voie Nodal chez l'embryon est Forkhead box H1 (FoxH1) [118, 119]. L'activité de signalisation de Nodal peut être inhibée par Cerberus 1 (Cer1), Lefty 1 et 2, des inhibiteurs extracellulaires dont l'expression est régulée par la voie Nodal elle-même. La transduction de cette voie de signalisation induit également l'expression d'activateurs tels que *Nodal* lui-même et le facteur BMP4 [109, 120, 121]. En effet, l'expression de Nodal par les cellules de l'épiblaste postérieur avant la gastrulation (E5.5) active l'expression de *Bmp4* dans l'ectoderme extra-embryonnaire. A son tour, la protéine BMP4 active l'expression de *Wnt3* par les cellules de l'épiblaste postérieur. Le facteur Wnt3 active l'expression de *Nodal* et *Cripto* [122, 123]. Ces boucles de rétrocontrôles positives et négatives participent à la création d'un gradient d'activité de Nodal et déclenche la formation de la ligne primitive. Dans un modèle de souris

hypomorphes pour *Lefty2*, l'expression de *Nodal* est anormalement importante et continue au sein du mésoderme latéral gauche suggérant que la diffusion des inhibiteurs de Nodal régule l'expression spatio-temporelle de Nodal [124]. Le gradient d'activité de Nodal est également assuré par l'activité des convertases Furin et PACE4 secrétées par l'ectoderme extra-embryonnaire et le trophoctoderme respectivement (E7.5). Ces enzymes de conversion assurent le clivage du pro-domaine de Nodal et rendent ainsi ce facteur actif [125]. L'expression des convertases étant régulée par Nodal lui-même, cette boucle de rétrocontrôle positive renforce l'activité de Nodal au niveau de la jonction extra-embryonnaire/embryonnaire postérieure et participe à la mise en place de la ligne primitive [120].

De plus, l'expression de Nodal maintient l'expression de *Wnt3*, *T*, *Fgf8* et *Eomes* au sein de l'épiblaste postérieur assurant la mise en place de la ligne primitive [121, 126, 127]. L'activation des voies Nodal, BMP, Wnt et FGF permet l'expression des marqueurs clés dans la formation de la ligne primitive *Brachyury*, *Eomes* et *Mixl1* [30, 120, 128, 129].

Spécification du lignage nœud/notochorde

Le gradient d'activité de Nodal assure la formation de la région antérieure de la ligne primitive qui contient les progéniteurs du mésoderme axial et de l'endoderme définitif. En effet, chez les embryons de souris mutants dont les niveaux de Nodal sont réduits présentes des défauts dans la formation du nœud, de la notochorde et de l'endoderme définitif et [119]. Les mutants *FoxH1*^{-/-} sont caractérisés par une absence d'expression de *Gsc*, *FoxA2* et *T* dans la région antérieure de la ligne primitive naissante entraînant des défauts dans la formation du nœud, du

mésoderme axial et de l'endoderme définitif [78, 117, 130]. La voie Nodal est donc cruciale dans la mise en place du nœud et de la notochorde.

L'implication des effecteurs intracellulaires, Smad2 et Smad3, dans la formation de l'endoderme et du mésoderme axial a été étudiée. La réalisation d'embryons de souris chimères par injection de cellules souches embryonnaires *Smad2*^{-/-} dans des blastocystes sauvages a permis de montrer que les cellules mutantes participent largement à la formation du mésoderme axial alors qu'elles contribuent anormalement peu à l'endoderme définitif [131]. En parallèle, l'introduction d'une mutation sur un des allèles *Smad3* chez des mutants présentant déjà un allèle *Smad2* délété spécifiquement dans l'épiblaste a été réalisée. Ces mutants présentent des défauts dans la formation du mésoderme axial antérieur [132]. L'ensemble de ces données montre que la transduction du signal Nodal par Smad2 est requise pour la spécification de l'endoderme et suggère que la mise en place du mésoderme axial serait liée à la transduction du signal Nodal par Smad3.

Maintien de l'identité notochordale

A la fin de la gastrulation (E7.5), l'expression de Nodal est restreinte aux cellules de la couronne du nœud et par la suite, activée dans le mésoderme latéral gauche [133]. Lors des mouvements de convergence extension et de migration des cellules du nœud pendant la mise en place de la notochorde, l'expression de Nodal est perdue [47]. Dès E9.5, la voie Nodal est inactive dans l'ensemble de l'embryon [134]. Ainsi, l'activation de la voie Nodal est clé dans les étapes précoces de mise en place de l'EGO, du MGO et du nœud mais n'est pas maintenue lors de la formation de la notochorde.

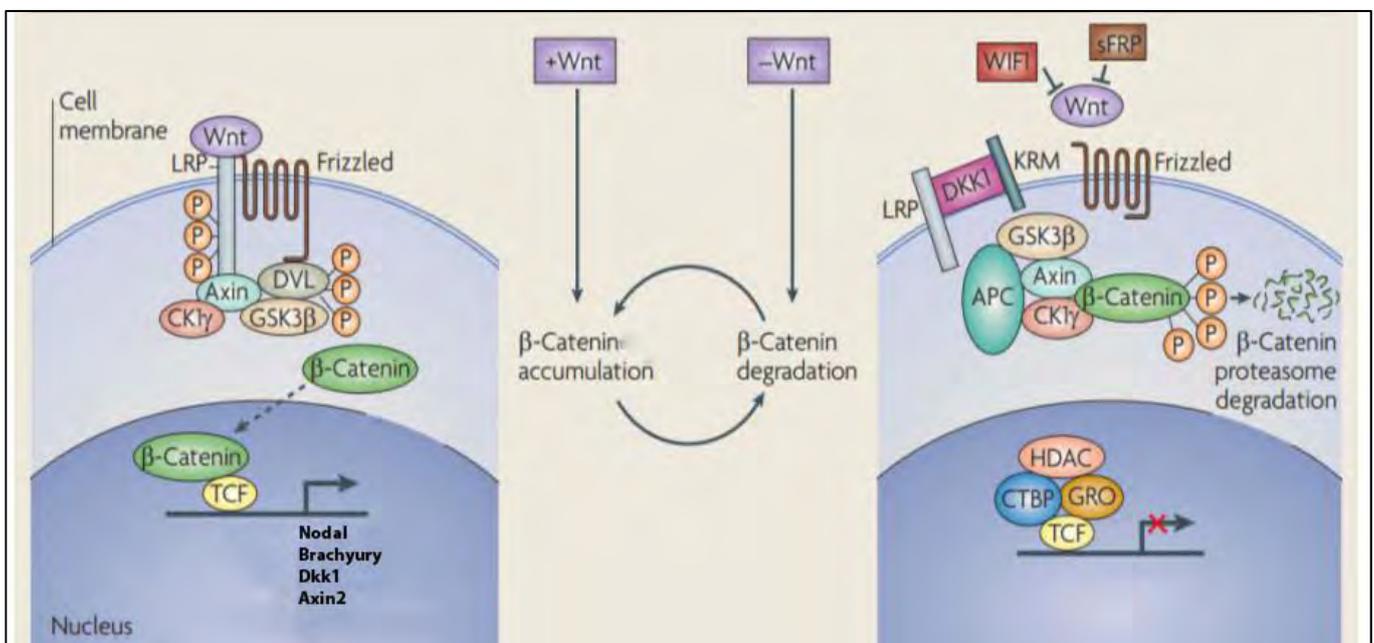


Figure 9 : Régulation de la voie de signalisation canonique Wnt/ β -Catenin d'après Arnold et Roberston, 2009 [109]. La liaison de Wnt sur les récepteurs Frizzled et les corécepteurs LRP induit l'activation de la Casein Kinase 1 (CK1 γ). Cette kinase phosphoryle LRP5/6 et GSK3 induisant la translocation de la protéine Axin de la membrane plasmique à l'extrémité intracellulaire de LRP5/6. La translocation de la protéine Axine lève son effet inhibiteur de la voie et induit l'activation de la protéine Dishevelled (Dvl). L'activité de CK1 γ ou GSK3 est double puisque ces kinases activent LRP5/6 et inhibent l'activité de la β -Catenin. La phosphorylation de GSK3 par Dvl inhibe son activité kinase. Dans ce dernier cas, la β -Catenin n'est pas phosphorylée ni ubiquitinilée et est ainsi protégée de sa dégradation par le protéasome. La β -Catenin est ainsi transloquée au noyau.

2- Rôle de la voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt est également requise pour la mise en place de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde [135].

Transduction du signal Wnt et mise en place de la ligne primitive

Chez les mammifères, 19 ligands Wnt ont été identifiés. Le ligand Wnt3 a été montré comme jouant un rôle dans la formation de la ligne primitive et du nœud [32, 135-137]. Sa liaison sur l'extrémité N-terminal extracellulaire des récepteurs Frizzled (Fz) et ses co-récepteurs lipoprotein related protein 5/6 (LRP5/6) entraîne la dislocation du complexe adenomatosis polyposis coli (APC)/Axine/ glycogen synthase kinase 3 (GSK3) [138, 139]. Cette dislocation du complexe permet l'inhibition de la dégradation de la β -Catenin et sa stabilisation [140, 141]. Cette dernière, l'effecteur majeur de la voie canonique Wnt, assure la transduction du signal par sa translocation au noyau (Figure 9). Il existe de nombreux partenaires protéiques de la β -Catenin capable d'activer la transcription de gènes cibles mais les plus décrits aujourd'hui sont les membres de la famille des facteurs de transcription TCF/LEF. L'activité de la voie Wnt/ β -Catenin est régulée par des boucles de rétrocontrôles positives (Nodal, Wnt3) et négatives assurées par les protéines extracellulaires Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 (Dkk1) et Cer1 mais également la protéine intracellulaire Axin2 [142-145].

Il existe également 2 voies non canoniques de Wnt qui sont indépendantes de la translocation nucléaire de la β -Catenin. Il s'agit de la voie de polarité planaire des cellules (voie PCP) et la voie dépendante du Calcium (Wnt/ Ca^{2+}) activées par Wnt5A, Wnt5B et Wnt11 [146].

La mise en place de la ligne primitive est principalement assurée par la voie canonique Wnt/ β -Catenin. En effet, les embryons de souris mutantes *Wnt3*^{-/-}

présentent des défauts de formation de la ligne primitive et une absence d'expression de *T*, *Nodal* et *Fgf8* [136, 147, 148]. L'activité de la voie de Wnt/ β -Catenin est également impliquée dans la TEM au sein de la ligne primitive grâce notamment à l'activation de l'expression de *T*, *Fgf4* et *Fgf8* [122, 149].

Spécification du lignage nœud/notochorde

La délétion conditionnelle du gène β -Catenin sous contrôle du promoteur de la cytokératine 19 (CK19, exprimé par l'endoderme extra-embryonnaire et la région antérieure de la ligne primitive) a été réalisée chez des embryons de souris. L'expression de *T*, *Noggin* et *Shh* au niveau de la région antérieure de la ligne primitive n'est pas retrouvée chez ces mutants entraînant des défauts dans la mise en place du nœud et du mésoderme axial (E8.5) [150].

Des mutants hypomorphes pour la protéine APC, inhibiteur de l'activité de la β -Catenin, ont également été générés [151]. L'extinction d'environ 80% de la protéine APC entraîne une augmentation de l'activation de la voie Wnt/ β -Catenin comparée aux souris sauvages. Cette augmentation d'activité entraîne une expression de *Nodal* et *FoxA2* non plus seulement restreinte au niveau distal mais étendue et diffuse dans tout l'embryon (E8.5). Chez ces mutants, le nœud est anormalement étendu et désorganisé. Une duplication partielle du mésoderme axial et du plancher du tube neural est observée à l'extrémité antérieure de l'embryon. Alors que l'inactivation de l'expression de *Tcf6*, *Tcf1* et *Lef1* n'affecte pas la formation de la ligne primitive et du nœud [136, 147, 152, 153], l'inactivation de *Tcf3* entraîne la duplication de la ligne primitive, du nœud et du mésoderme axial [154].

Les voies de signalisation non canoniques PCP et dépendante du Ca^{2+} sont impliquées dans les mouvements de convergence extension lors de l'élongation de l'axe antéro-postérieur de l'embryon ou encore dans la mise en place du mésoderme

axial [155-158]. L'implication de ces voies de signalisation dans la formation de ces structures ne sera pas détaillée dans ce chapitre [159]. En effet, ces mécanismes cellulaires étant difficiles à transposer *in vitro*, nous avons focalisé notre attention sur la signalisation canonique et les effets attendus de son activation dans la différenciation des cellules souches pluripotentes *in vitro*.

Maintien de l'identité notochordale

L'utilisation d'un rapporteur de l'activité de la voie Wnt/ β -Catenin chez l'embryon de souris a montré que cette voie était active dans l'extrémité caudale de la notochorde jusqu'à E12.5 [160]. Après ce stade de développement, l'activité de la voie Wnt/ β -Catenin y est diminuée. L'inactivation conditionnelle inductible du gène β -Catenin spécifiquement dans la notochorde (mutants *Noto*^{CreERT2}/ *β -Catenin*^{flox/flox}) entraîne une diminution de l'expression de *T* et *Shh* à E9.5 et une absence de mise en place de la notochorde chez ces embryons mutants à partir de E10.5. Ces données confirment que l'élongation de la notochorde est dépendante de l'activité de la voie Wnt/ β -Catenin.

3- Rôle de la voie de signalisation Fibroblast Growth Factor (FGF)

La voie FGF est décrite depuis de nombreuses années comme étant indispensable à la mise en place de la ligne primitive et aux mouvements morphogénétiques responsables de la formation du mésoderme et de l'endoderme [161]. Son rôle dans la spécification du neurectoderme ne sera pas détaillé dans ce manuscrit.

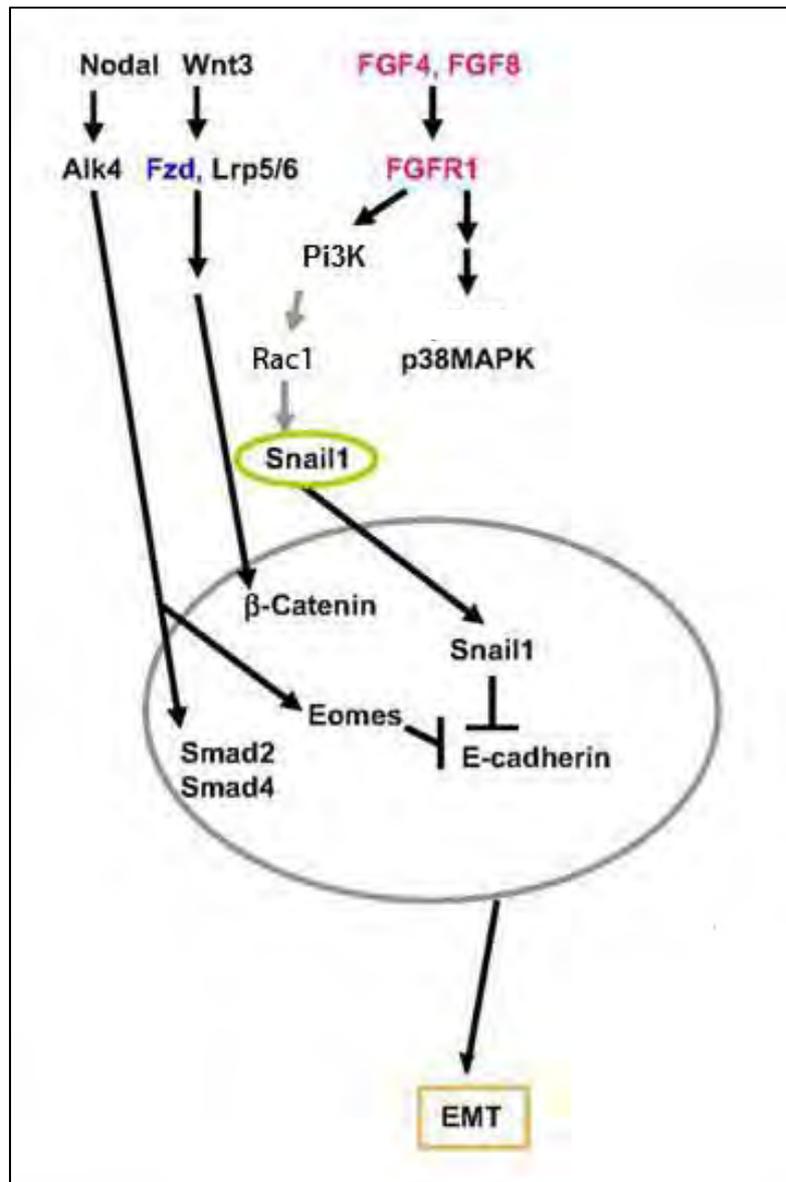


Figure 10 : Implication des voies de signalisation Nodal, Wnt et FGF dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) modifiée d'après Lim et Thiery, 2012 [162]. La fixation de Nodal et Wnt3 sur leurs récepteurs entraîne l'expression de Eomes, de Fgf4 et Fgf8 [122, 149, 163] et participe ainsi à la TEM. La fixation de FGF4 ou FGF8 sur le récepteur FGFR1 entraîne l'activation des voies Rac1 et p38MAPK conduisant à la diminution de l'expression de la E-cadherin [164, 165].

Transduction du signal FGF et mise en place de la ligne primitive

Il existe chez les vertébrés 22 ligands FGF qui présentent une affinité pour des récepteurs membranaires à activité Tyrosine Kinase. Il existe 4 types de récepteurs au FGF (FGFR) capables de lier spécifiquement ces ligands [166]. La formation du complexe FGF-FGFR active 3 voies majeures de signalisation intracellulaires : la voie mitogen-activated protein kinase (MAPK), la voie de la Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase (Pi3K) ou la voie Phospholipase C (PLC). L'activation de ces médiateurs intracellulaires est dépendante du recrutement de protéoglycanes de type Héparane sulfate au sein du complexe ligand-récepteur.

Les premiers indices du rôle de cette voie dans la mise en place de la ligne primitive chez la souris datent de 1994. L'initiation de la gastrulation a lieu chez les embryons dont le gène codant pour le récepteur au FGF de type I (*Fgfr1*) est inactivé [167, 168]. Cependant, à E8.5, les cellules de l'épiblaste et du mésoderme s'accumulent dans la ligne primitive entraînant des défauts dans la formation du mésoderme et de l'endoderme [30, 169].

Le signal FGF au sein de la ligne primitive est principalement relayé par les voies p38MAPK et Rac1 (Figure 10). L'activation de cette voie entraîne l'expression de *Snail1* qui est un facteur de transcription principal inducteur de la TEM [169-172]. Ce mécanisme cellulaire est actif tout le long de la ligne primitive, est caractérisée par une diminution de l'expression de la protéine extracellulaire E-cadherin (*Cdh1*) et d'un profond remaniement du cytosquelette. La diminution de l'expression de *Cdh1* est accompagnée d'une augmentation des marqueurs de type mésenchymateux tels que *Vimentin*, *Fibronectin 1* ou encore *Cdh2* (N-cadherin) [173].

Rôle de la voie FGF dans la spécification du lignage nœud/notochorde

Chez les mutants *Fgfr1^{-/-}*, les marqueurs *FoxA2* et *Shh* sont exprimés dans la partie antérieure de la ligne primitive et dans le mésoderme axial. Cependant, le mésoderme axial de ces mutants est anormalement fin et étendu par rapport à l'axe médian [168]. Afin de préciser le rôle de la voie FGF dans la mise en place du mésoderme axial, la détection de l'activité β -Galactosidase dont l'expression est sous contrôle du promoteur de T chez des souris *Fgfr1^{+/-}* a été analysée. Ces expériences ont démontré que l'expression de T au sein de la ligne primitive antérieure, du nœud et du mésoderme axial était indépendante de l'activité du récepteur FGFR1 [169].

L'expression de *Fgf8* n'est pas détectée au-delà de l'extrémité antérieure de la ligne primitive. Le facteur *Fgf8* n'est donc pas exprimé dans la population cellulaire constituant le nœud [174]. Cependant, des embryons de souris *Fgf8^{-/-}* présentent des défauts dans la formation du nœud et du mésoderme axial [175]. L'expression de *Gsc*, *FoxA2* et *Shh* est détectée dans la région antérieure de la ligne primitive mais est absente à l'extrémité antérieure du mésoderme axial (E7.5-E8.0) [175]. La voie FGF serait donc impliquée dans la migration des cellules pour la formation du nœud et du mésoderme axial.

Il est important de souligner que les cellules du nœud expriment le marqueur épithélial *Cdh1* et n'ont pas subi la TEM au sein de la ligne primitive.

Un raccourcissement du squelette axial est observé chez les souris hypomorphes pour *Fgfr1* [57, 176-178] et chez les mutants dont les gènes *Fgf4* et *Fgf8* sont inactivés sous contrôle du promoteur T [179].

Cependant, les embryons de souris dont *Fgf4* et *Fgf8* sont inactivés sous contrôle du promoteur Homeobox B1 (exprimé dès E7.0 dans la partie postérieure de la ligne

primitive puis dans les somites et dans le bourgeon caudal [180]) présentent une expression continue de *T* et *Shh* dans la notochorde. Ces données montrent que l'élongation de la notochorde n'est pas majoritairement affectée par l'absence de signalisation FGF. L'absence de sacrum et de queue chez ces mutants à la naissance indique que la voie FGF est impliquée dans la formation du mésoderme paraxial postérieur [181].

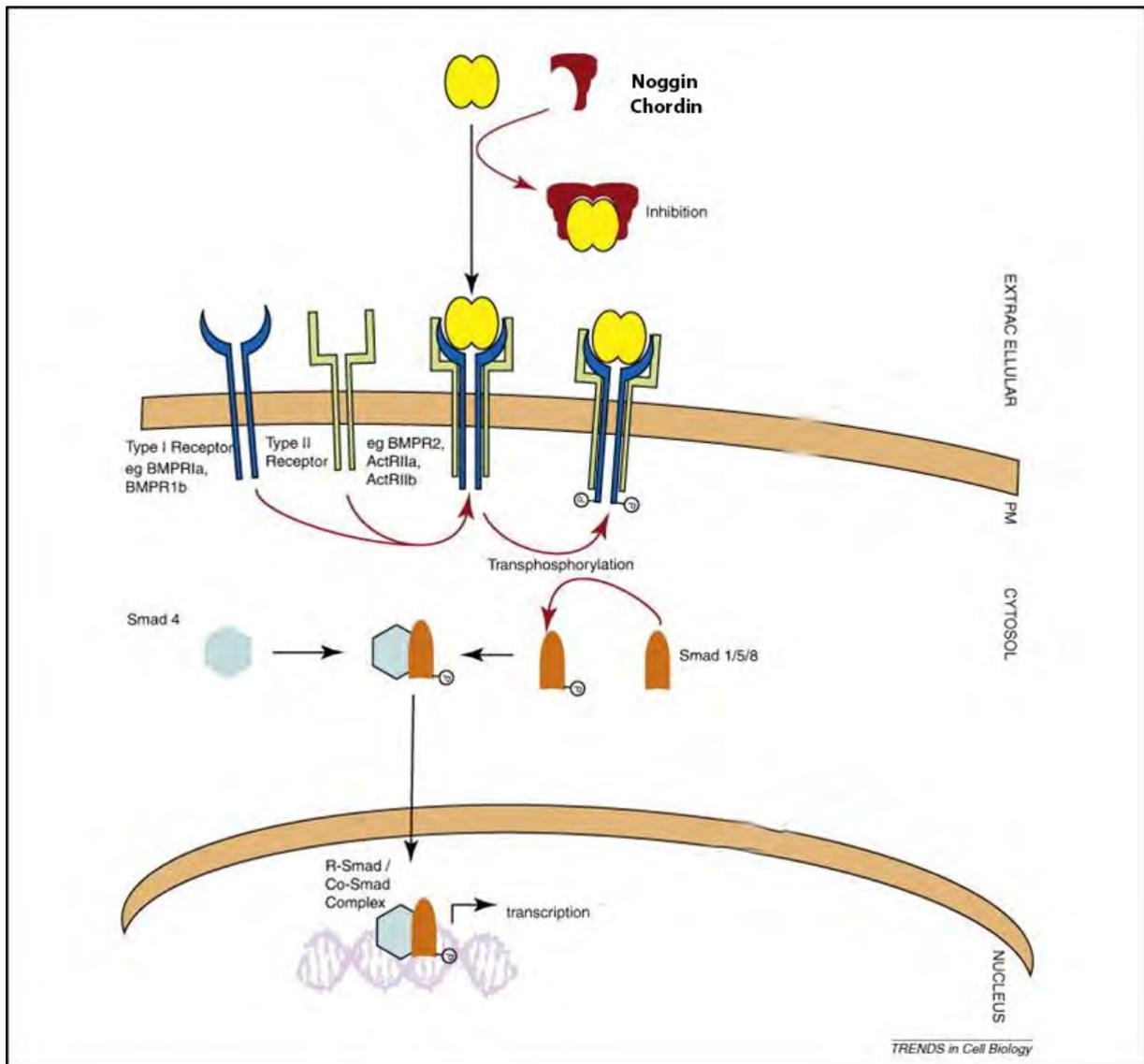


Figure 11 : Régulation de la voie canonique de signalisation BMP adaptée de Walsh et al, 2010 [182]. La fixation des dimères BMP aux récepteurs de type I et II entraîne l'auto-phosphorylation des thréonines et sérines situées dans la partie intra-cellulaire des récepteurs. Le signal BMP est transduit par les effecteurs intra-cellulaires Smad1/5/8 dont l'activité est dépendante de leur phosphorylation sur les sérines par le récepteur de type I. Après recrutement du médiateur Smad4, le complexe est transloqué au noyau assurant ainsi la régulation de l'expression de gènes cibles.

4- Rôle de la voie Bone Morphogenic Proteins (BMP)

La voie BMP est connue pour son rôle inducteur de la ligne primitive et dans la formation du mésoderme embryonnaire et extra-embryonnaire [183, 184].

Transduction du signal BMP et mise en place de la ligne primitive

Les protéines BMP appartiennent à la superfamille du TGF- β . Parmi plus de 20 ligands, la BMP4 est le ligand principalement décrit dans la formation de la ligne primitive et des feuillets embryonnaires chez l'embryon de souris. Ce ligand se fixe sur les récepteurs membranaires de type I et II (BMPRI et BMPRII). Il existe trois types de récepteurs de type I (Alk2, Alk3 et Alk6) interagissant avec le BMPRII après fixation du ligand pour former un complexe actif. Le signal est transduit par la phosphorylation et l'activation des protéines Smad1/5/8 (voie canonique). Une fois activées, ces protéines recrutent Smad4 pour leur translocation au noyau et la régulation de l'expression de gènes cibles [185, 186] (Figure 11). Le gradient de BMP4 induit à partir de l'ectoderme extra-embryonnaire entraîne la formation de la ligne primitive et la spécification des cellules de l'épiblaste en mésoderme extra-embryonnaire [120, 187]. L'activité de la voie BMP est inhibée par les facteurs antagonistes Chordin et Noggin sécrétés par le MGO et le nœud. Cette inhibition induite dans la région antérieure de la ligne primitive contribue également à établir le gradient d'activité de la voie BMP le long de l'axe proximo-distal de l'embryon.

L'introduction d'une mutation dans le gène codant *Bmp4* (mutants *bmp4*^{tm1/tm1}) conduit à une mortalité de la majorité des embryons avant la fin de la gastrulation (E6.5). Selon le fond génétique des lignées de souris, les embryons survivent jusqu'au début de la somitogenèse et présentent un défaut de formation de la ligne primitive postérieure et de spécification du mésoderme embryonnaire et extra-embryonnaire [187-189].

Spécification du lignage nœud/notochorde

L'expression de *Fgf4* et *Fgf8* est réduite au sein de la ligne primitive chez les mutants *bmp4*^{tm1/tm1} affectant les capacités de migration des cellules et la morphologie du nœud [190]. Une réduction de l'expression de *Nodal* dans les cellules de la couronne du nœud a également été observée. L'expression de *Shh* dans le nœud et dans le mésoderme axial antérieur est similaire aux embryons sauvages. Afin de préciser le rôle de la production de BMP4 par l'ectoderme extra-embryonnaire, des chimères tétraploïdes ont été générées afin de restaurer l'expression de *bmp4* uniquement dans l'ectoderme extra-embryonnaire [190]. L'expression de *Fgf8* au sein de la ligne primitive est restaurée chez ces mutants. La morphologie du nœud est comparable aux embryons sauvages. Ces embryons chimériques survivent jusqu'au stade E9.0. La formation de la notochorde a été retrouvée inchangée par rapport aux embryons sauvages.

Ces données montrent que la sécrétion de BMP4 par l'ectoderme extra-embryonnaire est impliquée dans la morphogenèse du nœud probablement par l'intermédiaire de FGF8 [191, 192]. La formation de la notochorde et son maintien est indépendante de l'activité de signalisation BMP.

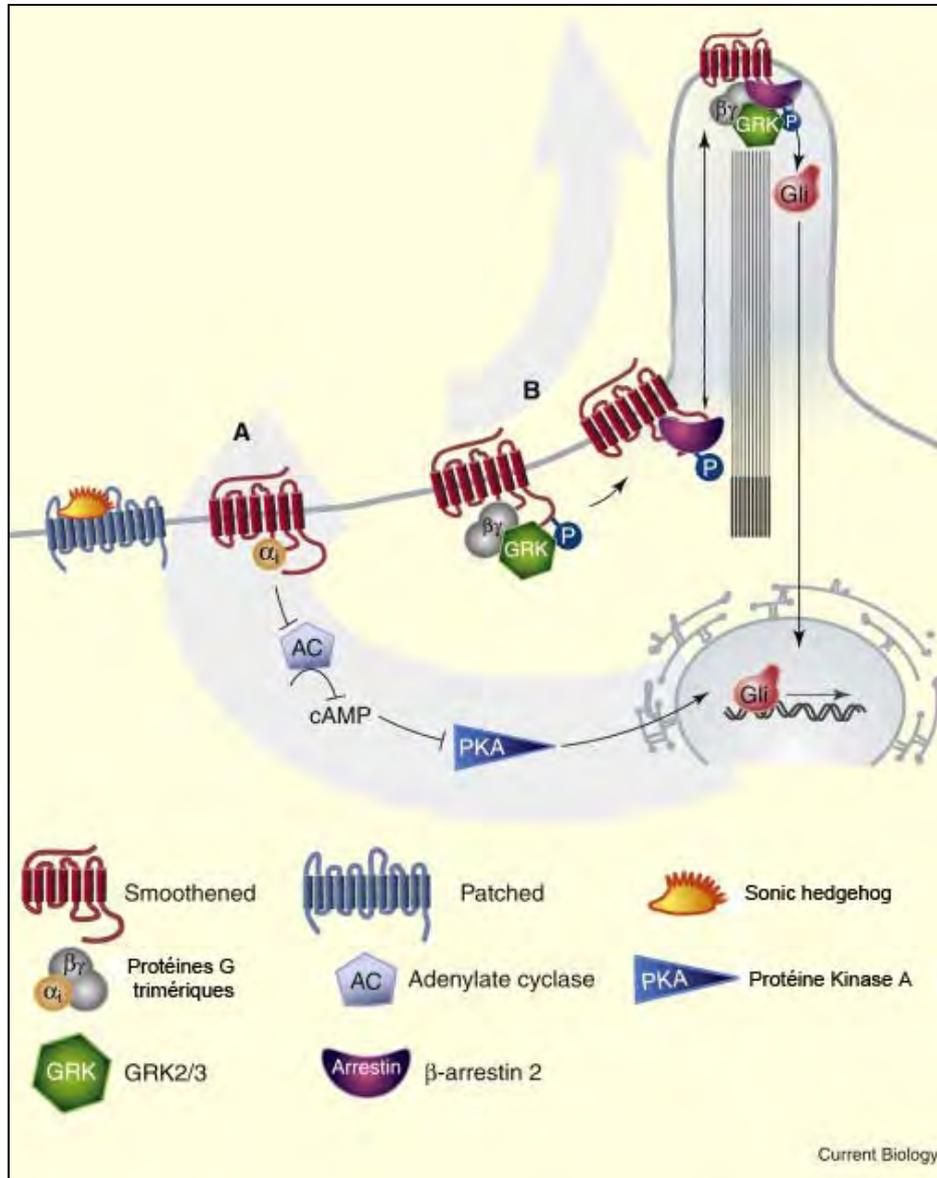


Figure 12 : Régulation de la voie de signalisation Sonic hedgehog d'après Philipp et Caron, 2009 [193]. La liaison de Shh sur son récepteur Patched active le récepteur Smoothened (Smo). (A) Les niveaux d'Adénosine monophosphate cyclique (cAMP) sont diminués suite à l'inhibition de l'Adenylate cyclase (AC) par les sous-unités inhibitrices alpha (α_i) des protéines G. L'inhibition de la Protéine kinase A (PKA) assure la translocation des facteurs de transcription Gli au noyau. (B) L'interaction physique entre les protéines G et les kinases associées aux récepteurs couplés aux protéines G (GRK2/3) entraîne la phosphorylation de Smo et le recrutement de la protéine β -arrestin 2. Ce complexe protéique se relocalise au niveau des cils primaires.

5- Rôle de la voie Sonic hedgehog

La voie de signalisation Shh n'est pas activée dans la ligne primitive. L'expression de Shh est détectée dans le nœud et dans le mésoderme axial.

Transduction du signal Shh

La fixation Shh sur son récepteur membranaire patched-1 (PTC1) active le récepteur couplé aux protéines G Smoothed (smo). Cette activation entraîne à son tour l'activation et la translocation nucléaire des facteurs de transcription Gli [194] (Figure 12).

Spécification du lignage nœud/notochorde

Les embryons mutants *Shh*^{-/-} ne présentent pas de défauts dans la formation du nœud. La présence d'une notochorde naissante à E8.5 est observée. Ainsi, la spécification de ce lignage est indépendante de l'activité de la voie Shh.

Rôle de la voie Shh dans le maintien de l'identité notochordale

Chez les mutants *Shh*^{-/-}, l'expression de *T* et *FoxA2* dans la notochorde chute à partir de E9.5 montrant la perte de l'identité notochordale à ce stade [195]. L'utilisation d'un modèle inductible d'inactivation conditionnelle de *Smo* dans la notochorde et dans le plancher du tube neural a permis de mettre en évidence que le taux de prolifération des cellules de l'extrémité caudale de la notochorde est réduit (mutants *Shh*^{CreERT2}/*Smo*^{floxp/floxp}) [58]. De plus, la composition de la gaine entourant la partie caudale de la notochorde chez les mutants est différente de celle des embryons sauvages.

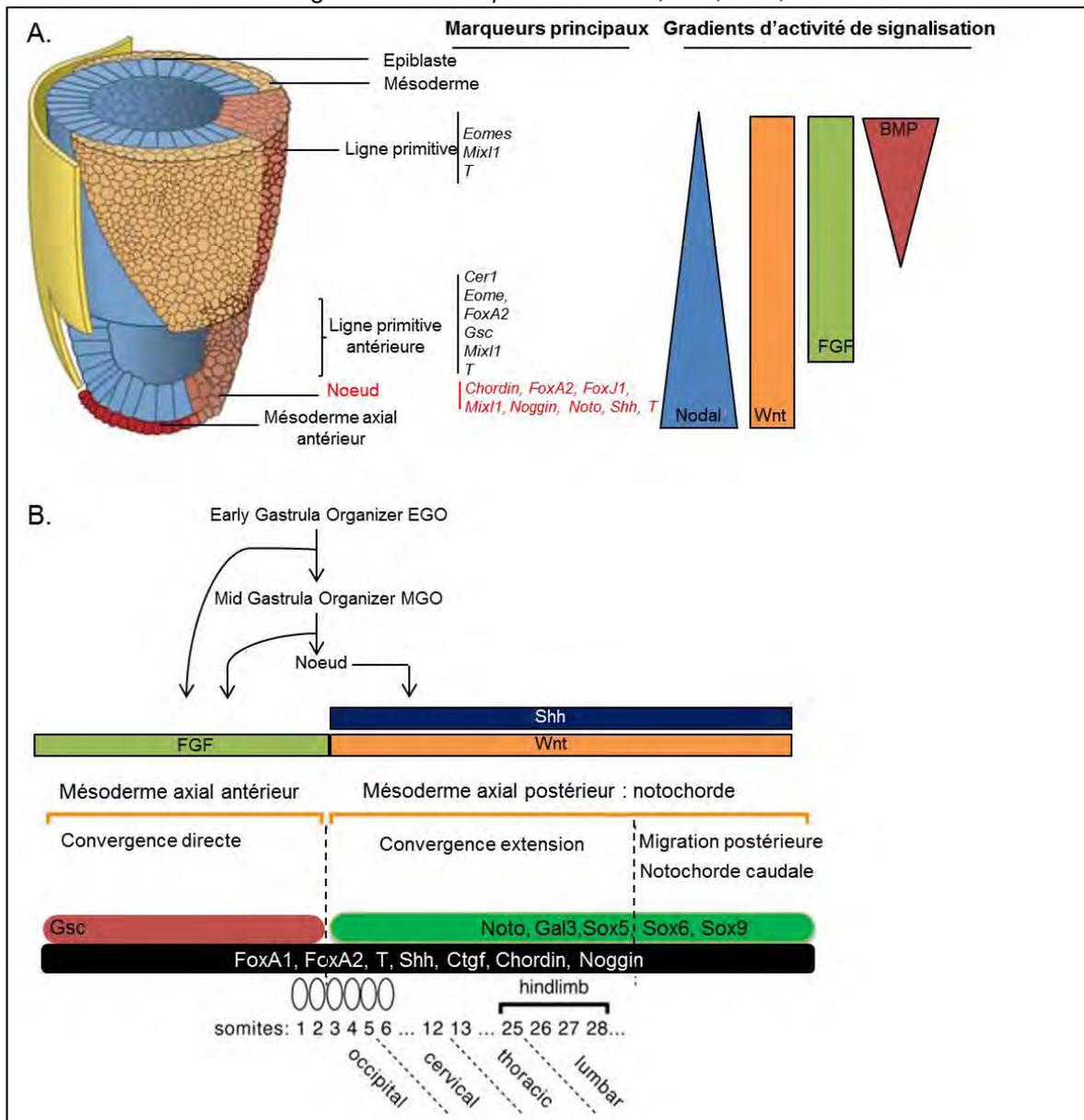


Figure 13 : Voies de signalisation et marqueurs exprimés au cours de la formation de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde. (A.) Représentation schématique d'un embryon de souris à E7.5. La ligne primitive est caractérisée par l'expression des marqueurs *T*, *Eomes* et *Mixl1*. La partie antérieure de la ligne primitive est caractérisée par l'expression de *FoxA2*, *Cer1* et *Gsc*. Les marqueurs du nœud sont *T*, *FoxA2*, *Mixl1*, *Noto*, *Shh*, *Chordin*, *Noggin* et *FoxJ1*. Un gradient d'activité de *Nodal* assure la formation du lignage EGO-MGO-nœud, du mésoderme axial et de l'endoderme définitif. La voie *Wnt* est active tout le long de la ligne primitive et au sein du nœud. La voie *FGF* est active au sein de la ligne primitive mais inactive dans le nœud. Enfin, un gradient d'activité *BMP* assure la mise en place de la partie postérieure de la ligne primitive ainsi que ses dérivés. La formation de la partie antérieure de la ligne primitive n'est pas directement influencée par la voie des *BMP*. **(B.)** La formation du mésoderme axial antérieur est assurée par un mécanisme de convergence directe des cellules de l'EGO et du MGO. Les cellules du nœud ne participent pas à la formation du mésoderme axial antérieur. Les mouvements de convergence extension et de migration postérieure à partir du nœud ainsi que l'activité des voies *Shh* et *Wnt* assure la formation et la maintenance de la notochorde [47]. Le mésoderme axial antérieur est caractérisé par l'expression de *Gsc*. Les cellules de la notochorde expriment spécifiquement *Noto*, *Gal3*, *Sox5*, *Sox6* et *Sox9*. Les marqueurs *FoxA1*, *FoxA2*, *T*, *Shh*, *Ctgf*, *Chordin* et *Noggin* sont exprimés le long du mésoderme axial. La notochorde commence à partir du deuxième somite [196]. La notochorde est à l'origine de la formation de l'ensemble des DIV de la colonne vertébrale. Les somites 25 à 28 participent à la formation des membres inférieurs (hindlimb).

En effet, l'absence de GAG et de fibres de collagène est observée. Tout au long de l'axe rostro-caudal, les cellules notochordales sont retrouvées dispersées au sein des futurs corps vertébraux et futurs DIV entraînant des défauts de formation des vertèbres et des NP [58].

Pour conclure, l'ensemble des études portant sur la formation du nœud et de la notochorde chez l'embryon de souris a permis d'établir une signature moléculaire précise de la notochorde en fonction des stades embryonnaires. De plus, l'importance des interactions entre les voies Nodal, Wnt et FGF dans la mise en place de ces structures a été rapportée. Les voies Wnt et Shh sont cruciales pour le maintien et l'élongation de la notochorde (Figure 13).

La transposition des connaissances relatives à la spécification et à la mise en place de ce lignage permet de préciser et adapter les stratégies de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines.

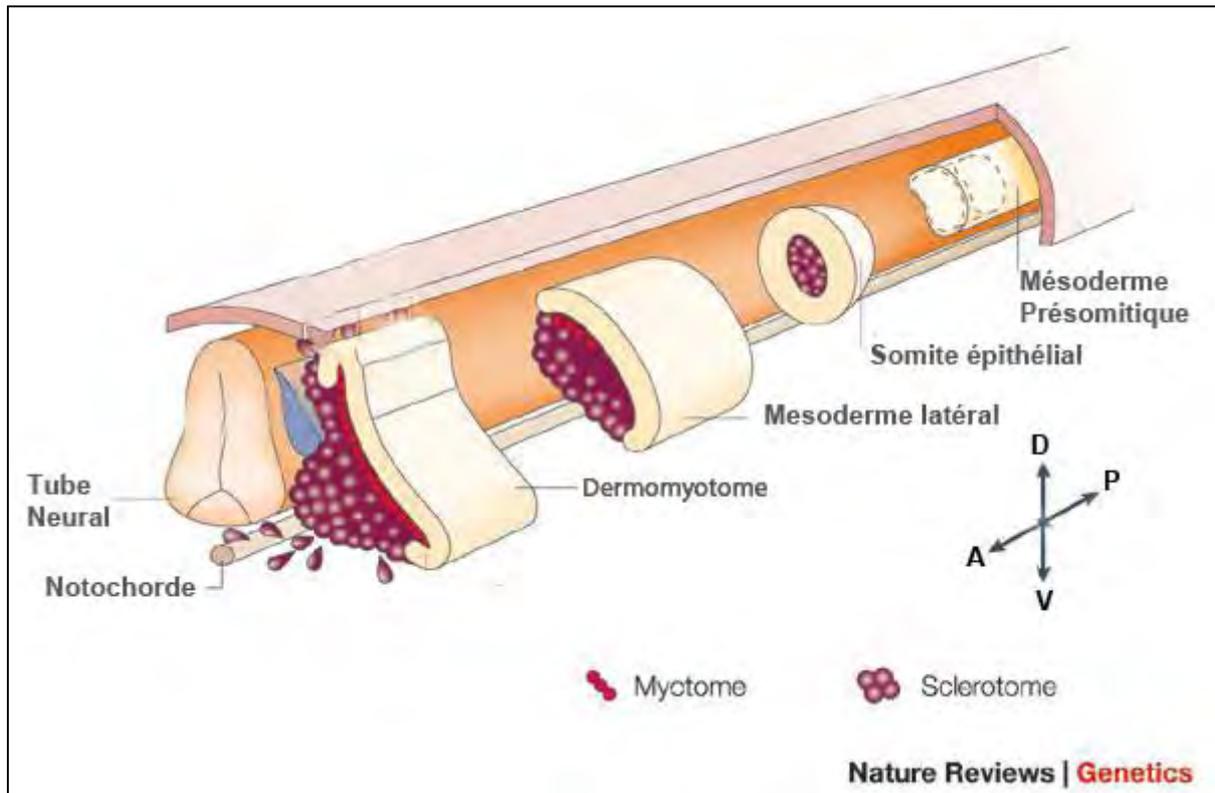


Figure 14 : Représentation schématique de la différenciation des somites à l'origine de la formation du squelette axial modifiée d'après Parker, 2003 [197].

Le mésoderme pré-somitique se situe de part et d'autre de la notochorde et du tube neural. La segmentation du mésoderme paraxial en somites a lieu le long de l'axe rostro-caudal. En réponse à des signaux provenant de la notochorde et du tube neural (*Shh*), les somites se différencient et donnent naissance au dermomyotome dorsalement et au sclérotome ventralement. La migration du sclérotome autour de la notochorde et du tube neural a lieu dès E8.5. A : antérieur, D : dorsal, P : postérieur, V : ventral

C- Formation des disques intervertébraux

La notochorde a un rôle central dans la formation du squelette axial. Celle-ci sécrète des facteurs tels que Shh et Noggin induisant la différenciation ventro-médiane des somites en sclérotome. En plus de leur différenciation, les cellules du sclérotome migrent et forment des segments mésenchymateux entourant la notochorde et le tube neural (Figure 14). À partir de E12.5, des événements morphologiques majeurs surviennent au sein de la notochorde et du mésenchyme adjacent. Les DIV, les corps et arcs vertébraux se mettent ainsi en place. Les connaissances relatives à ces mécanismes sont abordées ci-dessous.

1- Morphogenèse des corps vertébraux

La différenciation des somites est la première étape de la formation des corps vertébraux. L'inactivation de l'expression des facteurs *Gli2* et *Gli3* induit des défauts de différenciation des somites accompagnée par une absence d'expression de *Pax1*, *Pax9* et *Sox9* [198]. Des études réalisées *in vitro* ont également rapporté que l'expression des facteurs *Pax1*, *Pax9* et *Sox9* était régulée par l'activation de la voie Shh [199-201]. L'expression de *Pax1* est assurée par l'action synergique des facteurs Shh et Noggin *in vitro* [89, 90].

Les facteurs de transcription mésenchyme homeobox 1/2 (*Meox1* et *Meox2*) jouent également un rôle important dans la formation du sclérotome. Ces facteurs sont exprimés par les somites [202]. Les doubles mutants *Meox1^{-/-};Meox2^{-/-}* sont caractérisés par une absence de sclérotome mésenchymateux ventral et de dermomyotome épithélial dorsal. Le mésenchyme entourant la notochorde et le tube neural n'est pas segmenté affectant directement la formation des corps vertébraux et des DIV [203].

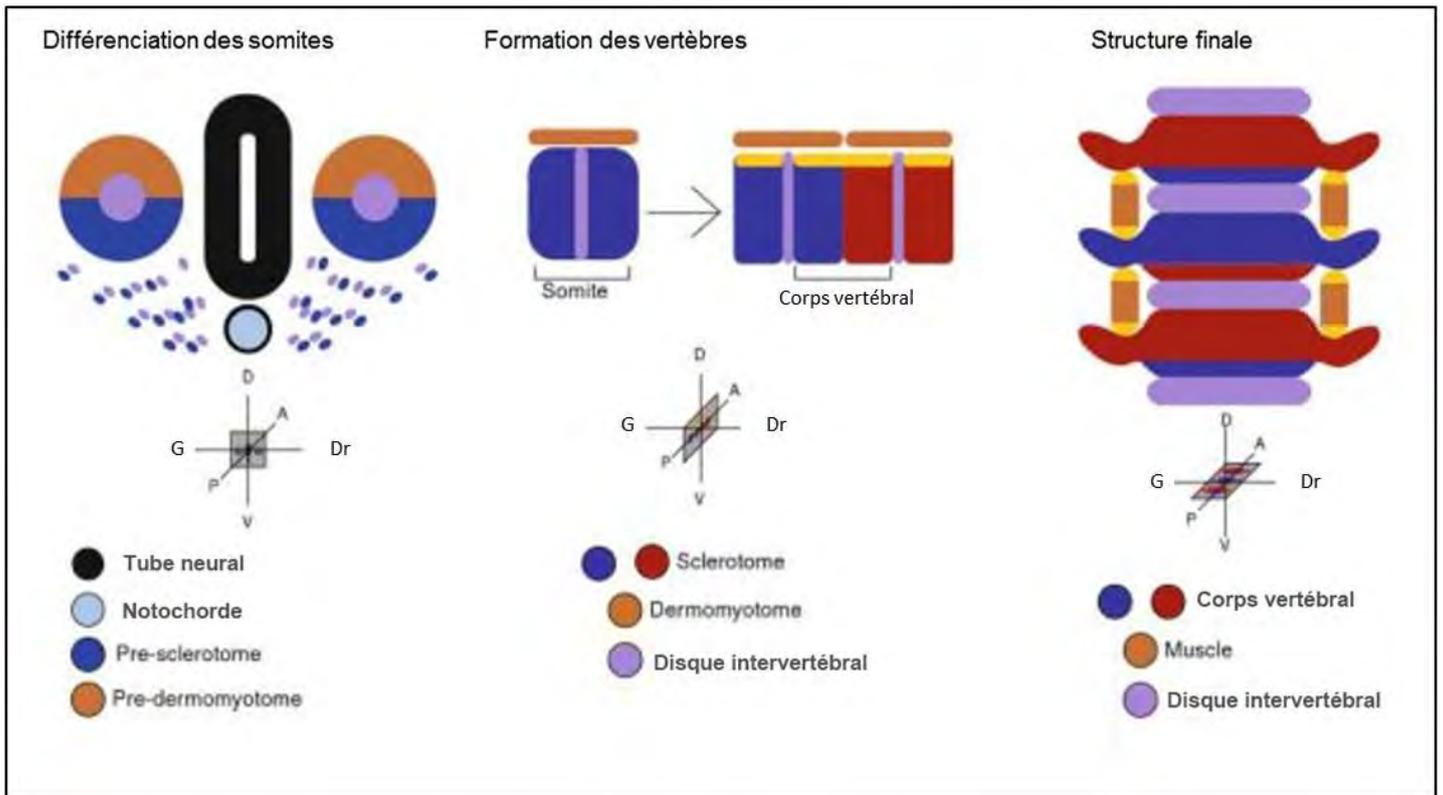


Figure 15 : Resegmentation du sclérotome modifiée d'après Shapiro et Risbud, 2014 [204]. La différenciation des somites induit la migration et la condensation du sclérotome autour de la notochorde et du tube neural. Les corps vertébraux sont issus de la fusion de la partie caudale du segment antérieur (bleu) avec la partie caudale du segment suivant (rouge). A : antérieur, D : dorsal, Dr : droite G : gauche, P : postérieur, V : ventral

L'expression des facteurs *Pax1*, *Pax9*, *Sox9*, *Meox1* et *Meox2* assure ainsi la différenciation des somites pour former le sclérotome. Ces facteurs sont également impliqués dans la différenciation du sclérotome en cellules chondrogéniques.

Phénomène de resegmentation

Ces cellules de sclérotome se condensent autour de la notochorde et du tube neural en formant des métamères avec différents niveaux de condensation. Au cours de la condensation du sclérotome autour de la notochorde et du tube neural, un réarrangement spatial a lieu (resegmentation). Ce réarrangement résulte de la fusion de la partie caudale du segment antérieur avec la partie rostrale du segment suivant [205-207] (Figure 15). Ainsi, les segments peu condensés formeront les corps vertébraux tandis que les segments très condensés donneront naissance à l'*Annulus fibrosus* (AF).

La prolifération et la différenciation des cellules du sclérotome s'accompagne d'une disparition de la notochorde au niveau des futurs corps vertébraux visible à E13.5. Ce phénomène reste encore inexpliqué à ce jour mais fait l'objet de nombreuses investigations. Il a été montré que les évènements d'apoptose ne peuvent pas, à eux seuls, expliquer la disparition des CNT au sein des futurs corps vertébraux [58]. A ce jour deux hypothèses ont été émises quant à cette disparition de la notochorde au sein des futurs corps vertébraux. La première hypothèse est que les CNT seraient repoussées vers les futurs DIV par les forces mécaniques qu'exercent les cellules mésenchymateuses en cours de différenciation chondrogénique. La seconde hypothèse repose sur la présence de molécules attirant les CNT au sein des futurs DIV et/ou de molécules répulsives au sein des futurs corps vertébraux. En faveur de la deuxième hypothèse, la voie Eph/Ephrin serait impliquée dans le regroupement des CNT au niveau du futur NP. Les CNT expriment les récepteurs membranaires

Eph4A capables de lier les protéines Ephrin présentes à la membrane des cellules mésenchymateuses entourant la notochorde [208]. Ainsi, l'isolement des CNT au sein des futurs DIV pourrait être dû à ces liaisons entre CNT et cellules mésenchymateuses. La voie Robo/Slit pourrait également être impliquée dans la formation des NP à partir de la notochorde. Cette voie est impliquée dans le positionnement correct des organes au cours de l'embryogenèse. Les CNT exprimant les ligands Slit pourraient ainsi repousser les cellules mésenchymateuses exprimant les récepteurs Robo [209, 210]. Ce mécanisme permettrait aux CNT de migrer vers les futurs NP. L'ensemble de ces informations suggère que les CNT expriment des protéines membranaires différentes selon leur position le long de l'axe rostro-caudal. Elles exprimeraient des protéines induisant la répulsion des cellules mésenchymateuses au sein des futurs corps vertébraux et des protéines assurant leur maintien au sein des futurs NP. La compréhension de ces mécanismes est incomplète et nécessite la réalisation d'études complémentaires afin de déchiffrer le comportement des CNT au cours de la formation du squelette axial.

Ossification endochondrale vertébrale

Les cellules mésenchymateuses des segments faiblement condensés vont subir un processus d'ossification endochondrale vertébrale menant à la formation d'un tissu osseux (à partir de E11.5). Ce processus consiste en la différenciation de cellules mésenchymateuses en chondroblastes, qui sont les progéniteurs des chondrocytes. Les chondrocytes vont finalement engager un processus de différenciation terminale et devenir des chondrocytes hypertrophiques. Ces chondrocytes hypertrophiques sont responsables de la sécrétion d'une MEC calcifiée et du recrutement des vaisseaux sanguins. Cette transformation survient également dans la mise en place des os longs [211]. La gaine péri-notochordale a un rôle majeur dans la

différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules chondrogéniques. En effet, la co-culture de somites et de notochordes de souris entourées de leur gaine intacte induit la production de GAG par les cellules des somites, reflétant leur différenciation chondrogéniques. En revanche, les cellules des somites cultivées en présence des notochordes dont la gaine est absente (digestion à la trypsine) ne sécrètent pas de GAG [59]. Ces données illustrent donc le rôle de la gaine dans la différenciation chondrogéniques des cellules mésenchymateuses entourant la notochorde. Les premiers chondrocytes hypertrophiques apparaissent à partir de E14.5. Au sein des futurs corps vertébraux, les facteurs de transcription Pax1 et Meox1 se fixent au promoteur du gène *Bapx1* induisant son expression et la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes [212, 213]. L'inactivation du gène *Bapx1* dans des embryons de souris induit un défaut dans la différenciation du mésenchyme en chondrocytes hypertrophiques, à l'origine de l'absence de minéralisation et de vascularisation du corps vertébral chez ces mutants [214].

L'inactivation des gènes *Col2a1*, *Pax1*, *Pax9* et *Shh* entraîne une ossification endochondrale vertébrale incomplète. Le NP de ces mutants n'est pas plus étendu que celui des embryons sauvages. L'hypothèse des CNT repoussées dans les futurs DIV par les contraintes exercées sur la notochorde au sein des corps vertébraux semble ainsi inexacte [63, 215, 216].

Les plateaux vertébraux

Le processus d'ossification endochondrale assure aussi la mise en place des plateaux vertébraux (PV). Ceux-ci sont composés d'une plaque sous-chondrale et d'une plaque cartilagineuse composée de chondrocytes synthétisant majoritairement du collagène de type II. Ces PV sont le site des derniers vaisseaux sanguins

vertébraux et assurent la diffusion de l'oxygène et des nutriments au sein du DIV. Ils sont également le site d'ancrage des fibres de l'AF.

2- Morphogenèse de l'*Annulus fibrosus*

Les segments mésenchymateux les plus condensés autour de la notochorde ne subissent pas le processus d'ossification endochondrale décrit précédemment mais donneront naissance à l'*Annulus fibrosus* (AF). La formation de cette structure débute à E15.0 chez le rat [217]. L'absence d'AF chez des souris mutantes *Pax1*^{-/-} et *Pax9*^{-/-} suggère que ces gènes sont impliqués dans la formation de l'AF en plus de leur rôle dans l'ossification endochondrale vertébrale [218]. L'expression de ces marqueurs étant notamment induite par la voie Shh, ces mutants attestent de l'importance de la sécrétion de Shh par la notochorde pour la formation de l'AF. L'inactivation conditionnelle du gène codant pour le récepteur de type II au TGF- β (TGF β RII) sous contrôle du promoteur *Col2a1* entraîne une minéralisation autour du DIV. En l'absence de signalisation TGF- β , le sclérotome formant normalement le futur AF subit un processus d'ossification endochondrale [219, 220]. Ces données ont été complétées par une étude transcriptomique réalisée sur les cellules de l'AF de souris sauvages et des souris *Tgfb2*^{-/-}. Les résultats ont confirmé le rôle du TGF- β dans la prévention de la différenciation chondrogénique du sclérotome dans la région du futur DIV et dans la promotion de sa différenciation en AF [221]. L'ensemble de ces observations montre que les voies de signalisation du TGF- β et Shh sont impliquées dans la formation de l'AF.

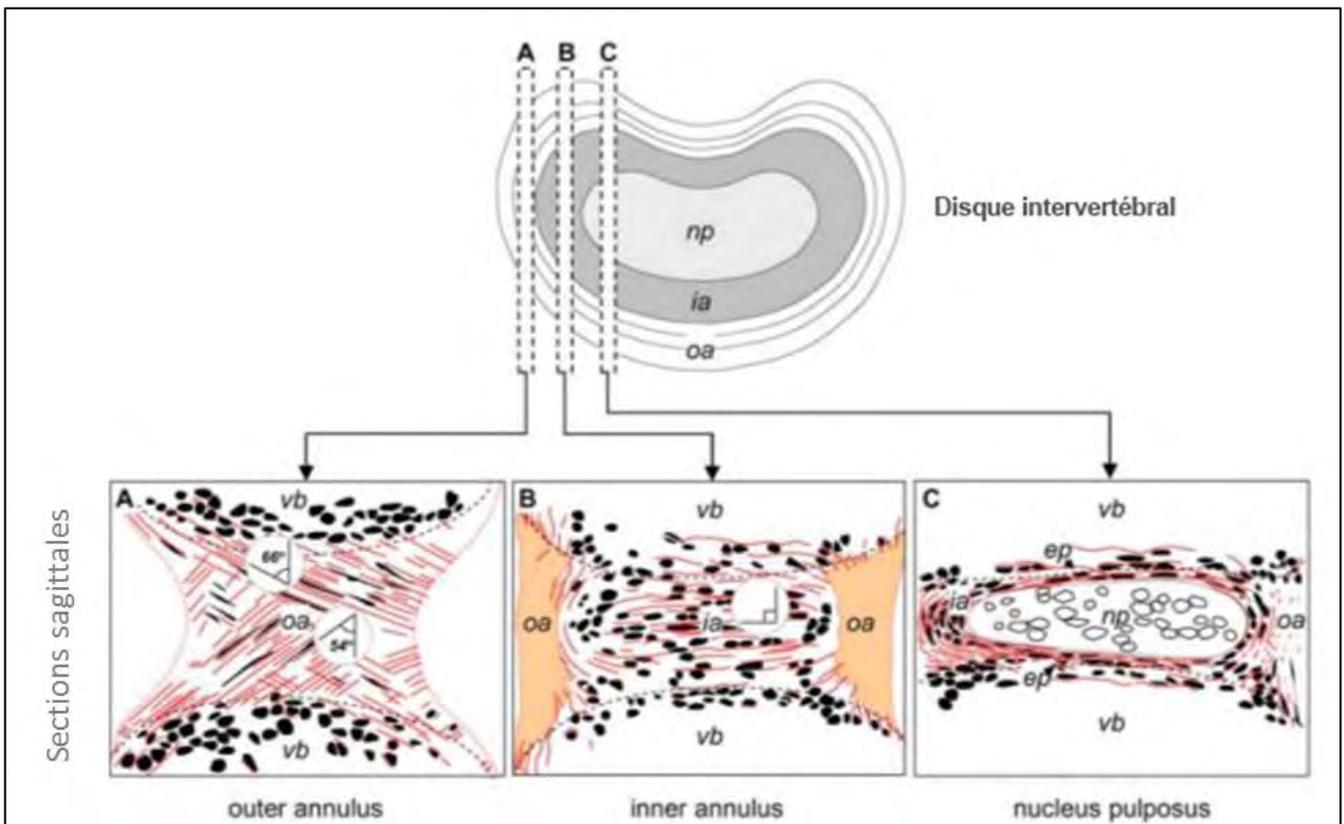


Figure 16 : Formation des fibres de l'Annulus fibrosus interne et externe modifiée d'après Hayes, 2011 [217]. Une coupe transversale d'un DIV est schématisée montrant le NP (nucleus pulposus) central, l'AF interne (inner annulus, ia) et l'AF externe (outer annulus, oa). Les sections sagittales A, B et C sont schématisées en dessous du DIV.

Formation des fibres de l'AF

L'AF est caractérisé par une partie interne dite « chondrogénique » et d'une partie externe dite « fibreuse ». Cette distinction est faite de par la différence de composition de la MEC secrétée. L'allongement des cellules de sclérotome de part et d'autre de la notochorde et leur différenciation entraîne la synthèse de fibres de collagènes de type II perpendiculairement à l'axe de la colonne [217]. Ces cellules synthétisent également de la fibronectine et des protéoglycanes tels que la fibromoduline, l'agrécan et le versican [222]. La fibronectine est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellule-MEC ainsi que dans les processus de migration et de différenciation cellulaire [223]. Les cellules qui formeront l'AF externe s'orientent et s'organisent en feuillets parallèles grâce à la formation d'un réseau intra-cellulaire de fibres d'actine et de jonctions adhérentes [224] (Figure 16). Ces feuillets cellulaires sont responsables du dépôt de fibronectine et de fibres de collagènes de type I et III avec une orientation de 55° par rapport à l'axe de la colonne [217]. Aucun PG n'est détecté dans cette partie externe de l'AF [222].

Notre compréhension des mécanismes moléculaires précis de la différenciation du sclérotome en AF interne et externe reste encore incomplète. Cependant, une des hypothèses à considérer est le rôle de la fibromoduline [225]. L'inactivation de l'expression de la fibromoduline chez la souris entraîne une diminution de la synthèse de la MEC et une désorganisation des fibres au sein des tendons [226]. De plus, cette protéine est capable de lier les facteurs de croissance comme le TGF- β [227]. Au regard de l'importance du TGF- β dans la différenciation des cellules de l'AF et dans la synthèse de la MEC, il est probable que cette liaison entre la fibromoduline et le facteur TGF- β soit impliquée dans la mise en place des fibres de l'AF.

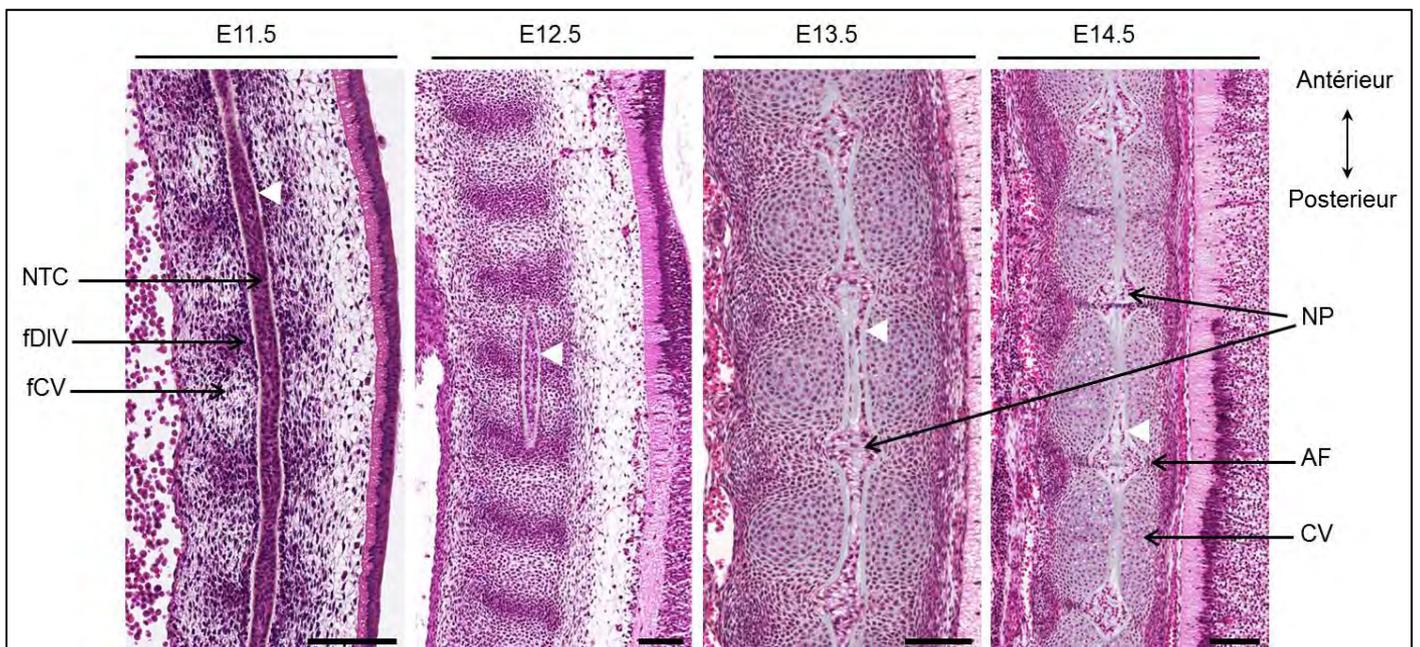


Figure 17 : Transition notochorde-Nucleus pulposus chez l'embryon de souris.

Des coupes histologiques d'embryons à E11.5, 12.5, 13.5 et 14.5 ont été réalisées au niveau thoracique et colorées à l'hématoxyline-éosine-safran. AF : Annulus fibrosus, CV : Corps vertébral, fCV : futur corps vertébral, fDIV : futur disque intervertébral, NP : Nucleus pulposus, NTC : Notochorde. Les pointes de flèches blanches montrent la gaine péri-notochordale.

3- Morphogenèse du Nucleus pulposus

La formation des NP débute dès E12.5 et s'achève à E15.5. Les stades E12.5 et E15.5 définissent donc la transition notochorde-NP.

Aspects morphologiques de la transition notochorde-NP

Durant cette transition, une accumulation de CNT est observée au niveau des futurs DIV tandis qu'une constriction de la notochorde a lieu au niveau des futurs corps vertébraux (Figure 17). La notochorde devient ainsi moniliforme, caractérisée par l'alternance de segments élargis et rétrécis [51]. Cette forme particulière peut être assimilée à un « collier de perle ». La gaine péri-notochordale est formée dès E10.5 et est toujours présente à E16.5, après la formation des NP. Les vacuoles apparaissent dès E12.5 et une augmentation de leur taille est visible à partir de E14.5 [51]. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la transition notochorde-NP sont peu compris à l'heure actuelle.

Aspects génétiques de la transition notochorde-NP

L'expression de *FoxA2* et *Noto* s'éteint à partir de E12.5, laissant supposer un rôle important de l'extinction de ces marqueurs dans la transition notochorde-NP [42, 228, 229]. Nous pouvons postuler que l'expression des marqueurs *FoxA2* et *Noto* définit l'identité embryonnaire de la notochorde. Une fois cette identité embryonnaire perdue, la maturation de la notochorde se traduirait par la mise en place des NP. Le rôle des facteurs de transcription *Sox5*, *Sox6* et *Sox9* devient majeur lors de cette transition. En effet, une disparition anormale et indépendante de l'activation de l'apoptose des CNT a été observée dans l'espace intervertébral chez des embryons *Sox5^{-/-};Sox6^{-/-}* [63]. Ces défauts conduisent à la formation de NP fragmentés

composés de CNT dont le volume des vacuoles est nettement diminué (E16.5). Les souris mutantes Sox9^{-/-} présentent un phénotype très similaire [93].

Activité sécrétoire des cellules notochordales

La synthèse des composants de la MEC par les CNT est observable à partir de E15 (données obtenues chez le rat). Les composants majoritairement synthétisés sont l'agrécan, la laminine et la fibronectine [222]. La synthèse d'agrécan chez la souris est influencée par le facteur de croissance Ctgf [98]. La présence de collagène de type II dans le NP au cours de la croissance fœtale est controversée bien que le transcrit soit détecté [60, 98, 222, 230]. Il est également possible que la synthèse de la MEC au sein du NP soit sous l'influence des facteurs Sox étant donné leur rôle majeur connu dans la production de la MEC au cours de la formation du cartilage [231, 232].

Pour conclure sur ce chapitre, les DIV à la naissance sont composés de deux PV, d'un AF interne, d'un AF externe et d'un NP. Les PV sont composés de chondrocytes synthétisant une MEC riche en collagène de type II, d'un AF dont la partie externe est composée de fibroblastes synthétisant des fibres de collagène de type I et la partie interne peuplée de cellules chondrogéniques synthétisant du collagène de type II. Le NP est quant à lui peuplé de CNT matures ayant une faible activité de sécrétion en comparaison avec les autres types cellulaires du DIV. Cette composition cellulaire et matricielle va évoluer après la naissance afin de mettre en place un tissu capable de gérer les contraintes mécaniques de l'ensemble de la colonne vertébrale adulte.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la maturation de cette structure au cours de la croissance sont présentés dans la partie II. Les

évènements à l'origine de la dégénérescence du tissu discal y seront également présentés. Enfin, les thérapies innovantes basées sur la restauration des fonctions des DIV seront également décrites.

II- Le disque intervertébral: maturation, dégénérescence et médecine régénératrice

A maturité squelettique, les DIV lombaires sont les structures hypoxiques les plus larges du corps humain [233]. De par la localisation des derniers vaisseaux sanguins au niveau des PV et de l'AF externe, la tension en oxygène au centre du NP est d'environ 3 mmHg [1, 234] (20-80mmHg dans le cartilage articulaire [235, 236], et 103 mmHg dans les poumons[237]). La réponse des cellules à un environnement hypoxique est principalement régulée par les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 [238-240]. Le DIV présente également la particularité d'être très peu innervé. Seules les lamelles les plus externes de l'AF contiennent des terminaisons nerveuses sécrétant la substance P [241, 242] connue pour son rôle dans la transduction du message douloureux. Tandis que la vascularisation et l'innervation des DIV sont peu affectées durant la croissance des DIV, d'autres changements cellulaires et tissulaires ont lieu.

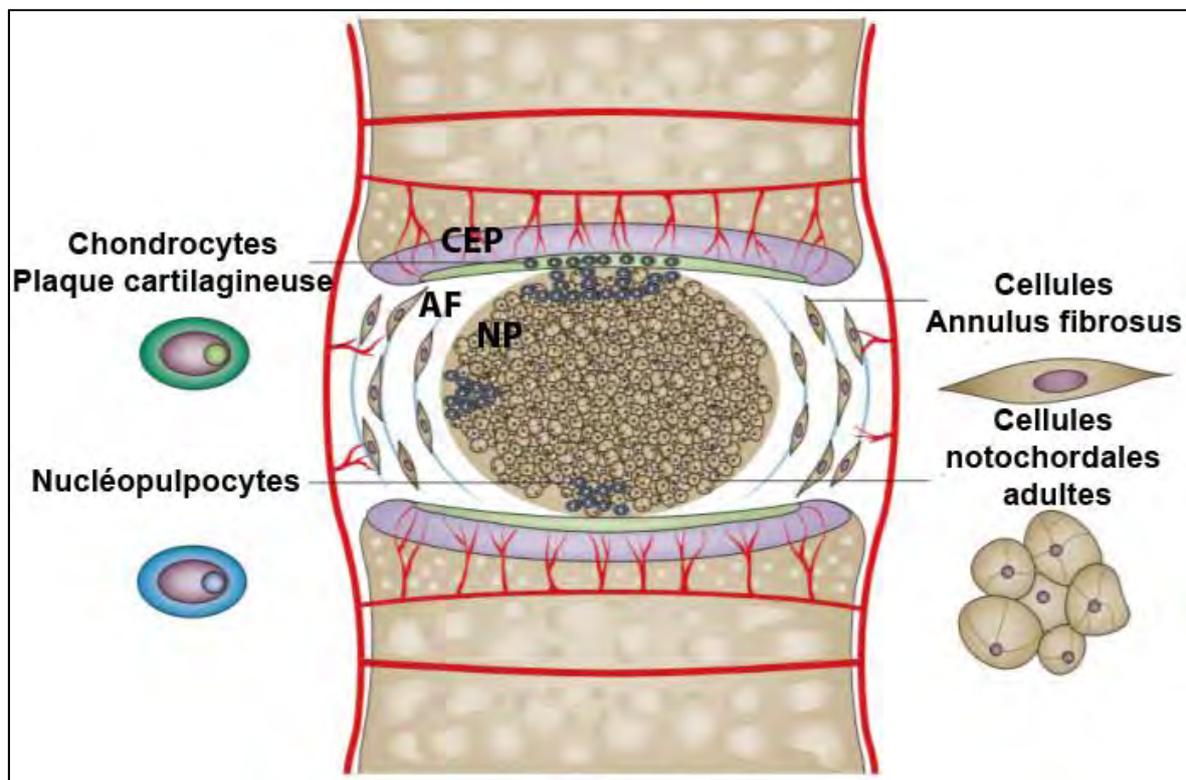


Figure 18 : Représentation schématique d'un DIV lombaire durant la croissance modifiée d'après Sakai, 2015 [243]. Les plateaux cartilagineux (CEP) composés de chondrocytes, sont le siège des derniers vaisseaux sanguins vertébraux. L'Annulus fibrosus (AF) arrangé en lamelles concentriques, est peuplé de cellules fibroblastiques. Les lamelles externes de ce dernier sont vascularisées. Le Nucleus pulposus (NP) est peuplé des cellules notochordales et nucléopulpecytes.

A- Maturation des disques intervertébraux

Chez l'homme, le DIV atteint sa maturité autour de 16 ans, l'âge de la maturité squelettique. Au cours de cette phase de croissance, les PV et l'AF sont peu modifiés tandis que le NP subit une deuxième transition. En effet, après la transition notochorde-NP durant la phase embryonnaire, une transition cellules notochordales matures-nucléopulpcytes (CNT matures-NPCytes) a lieu. La Figure 18 représente un DIV humain durant la phase de croissance.

1- Maturation des plateaux vertébraux

Le réseau vasculaire des PV forme des boucles terminales très proches de la plaque cartilagineuse [244]. La présence de pores au niveau de cette plaque cartilagineuse assure la diffusion des nutriments et métabolites du DIV. La diffusion de ceux-ci n'est pas un mécanisme passif. Seuls les ions positifs et les molécules neutres (oxygène, glucose) peuvent diffuser [245-247]. Toute modification de la MEC des plaques cartilagineuses et sous-chondrales affecte donc cette diffusion. Une diminution du taux de PG et de collagène de type II est observée dès l'âge de 15 ans chez l'homme. De plus, la dénaturation du collagène de type II atteint son niveau maximum chez des enfants âgés de 2 à 5 ans [248]. La dégradation des composants de la MEC, en particulier des PG conduit à une diminution de la teneur en eau au sein des PV. Celle-ci est de 80% à la naissance et atteint son niveau le plus bas de 65%, dès l'âge de 15 ans. Ces modifications, bien qu'elles soient mineures lors de la croissance du DIV ont des conséquences sur la diffusion des nutriments et métabolites au sein du NP et de l'AF.

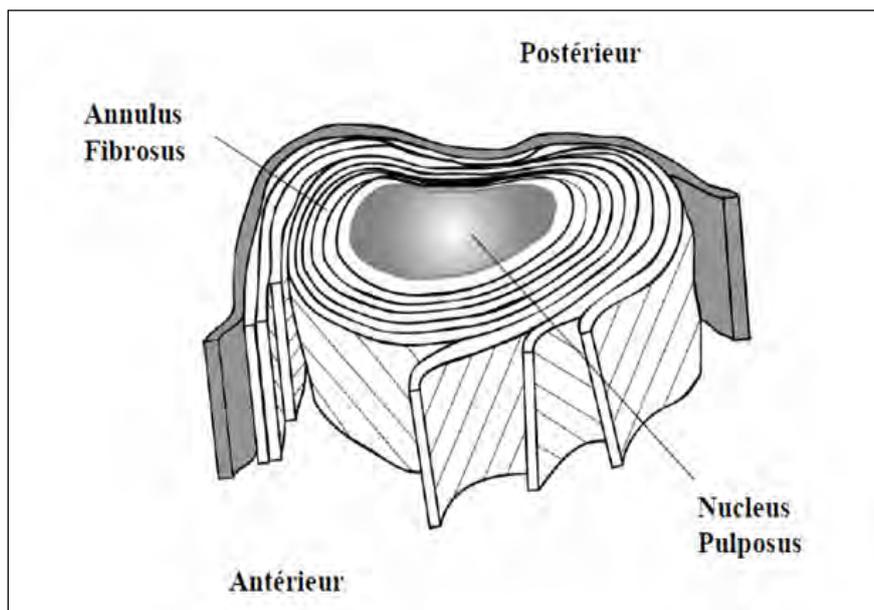


Figure 19 : Organisation lamellaire de l'Annulus fibrosus d'après Marchand, 1990 [249]. L'AF humain est formé de 25 lamelles concentriques. Celles-ci sont composées de fibres de collagène orientées de 65° par rapport à l'axe de la colonne. Au sein d'une même couche, les fibres de collagène sont obliques et orientées d'environ 30 degrés par rapport au plan transverse. 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).

Au niveau moléculaire, l'inactivation inductible du gène *Shh* a été réalisée chez la souris 4 jours après la naissance (4jpn). Une diminution de l'expression de *Sox9* et de synthèse de collagène de type II par les chondrocytes de la plaque cartilagineuse est observée chez ces mutants [250]. Ces données suggèrent que le facteur *Shh* a un rôle dans le maintien du phénotype et de l'activité sécrétoire de ces chondrocytes. De plus, l'hormone parathyroid hormone related peptide (PTHrP) est synthétisée par ces chondrocytes à partir de 2 semaines post-natal et jusqu'à 48 semaines chez la souris. La maturité squelettique étant atteinte à l'âge de 6 mois chez la souris [251], l'expression de cette hormone est maintenue après la phase de croissance. Ces données suggèrent un rôle de PTHrP dans la prévention de la calcification des PV au cours et au-delà de la maturité squelettique [252].

2- Maturation de l'Annulus fibrosus

A la naissance, la structure finale de l'AF est déjà établie. La croissance du DIV entraîne l'allongement des fibres et l'augmentation du dépôt de MEC en réponse au TGF- β 1 principalement [253]. Le changement majeur durant cette phase de croissance est l'orientation des fibres de l'AF. Les lamelles de l'AF sont orientées à 65° par rapport à l'axe de la colonne tandis qu'elles n'étaient que de 55° lors de leur formation embryonnaire [254, 255]. Ce changement d'orientation peut être dû à l'acquisition d'une forme elliptique du DIV [249]. L'orientation et la composition de ces fibres assurent la résistance du DIV aux forces de tension et de compression mais également de maintien du NP au centre de DIV [217, 256] (Figure 19).

Durant cette période de croissance, la présence de *Shh* assure la synthèse de collagène de type I et II ainsi que celle des PG au sein de l'AF interne [250]. L'inhibition de la transduction du signal *Shh in vitro* (ajout de cyclopaamine) et l'inactivation inductible de l'expression de *Shh in vivo* (4jpn) entraîne la diminution de

l'activité de la voie TGF- β au sein de l'AF et l'expression de Sox9. La voie du TGF- β assure la production et le dépôt des fibres de collagènes au sein de l'AF. L'expression de Sox9 étant régulée à la fois par la voie Shh et la voie TGF- β , il est impossible de discriminer le rôle spécifique de chacune des voies sur la synthèse de la MEC par les cellules de l'AF [257, 258]. Ainsi, le maintien de la voie Shh au sein du NP pourrait contribuer à la maturation de la MEC de l'AF après la naissance [252, 253].

De plus, l'absence de signalisation Shh entraîne l'augmentation de l'activité des voies BMP et Wnt au sein de l'AF. La culture de DIV entiers de lapin en présence de BMP2 a montré la formation de zones d'ossification au sein de l'AF suggérant que les cellules de l'AF se différencient en chondrocytes hypertrophiques [259]. L'activation conditionnelle inductible de la voie Wnt/ β -Catenin deux semaines après la naissance chez la souris entraîne une désorganisation des lamelles et une prolifération aberrante des cellules de l'AF qui ne sont plus fibroblastiques mais chondrogéniques [260]. Ces observations suggèrent un rôle positif de la voie Shh sur les cellules de l'AF, en maintenant l'activation de la voie TGF- β et en inhibant les voies BMP et Wnt.

3- Maturation du *Nucleus pulposus*

Le NP est la partie du DIV qui subit le plus de modifications au cours de sa croissance. Comme décrit précédemment, le NP est composé essentiellement de CNT à la naissance. L'évolution de cette population est différente selon les espèces. Chez la souris, le rat, le lapin et le cochon, les CNT matures persistent au sein des DIV au-delà de l'âge de la maturité squelettique [3]. Le modèle du chien non-chondrodystrophique présente des CNT matures tout au long de la vie tandis que ces cellules sont perdues après la maturité squelettique chez le chien

chondrodystrophique [261]. Chez le mouton, le bovin et l'homme, les CNT matures disparaissent durant les premières années de la vie [3](hunter 2004). Ainsi, la considération de l'ensemble des données concernant les mécanismes de maturation du NP chez ces espèces permet de mieux comprendre ceux du NP humain.

Des cellules notochordales matures aux nucléopulpoctes

Parallèlement à la disparition des CNT matures au cours de la croissance, les NPCytes apparaissent. Une des hypothèses quant à l'origine de ce type cellulaire était qu'il provenait de la migration des chondrocytes depuis les PV [262]. Plus récemment, il a été démontré par des expériences de suivi de lignage réalisées chez la souris (marquage génétique), que les cellules du NP étaient issues de la notochorde embryonnaire [4, 5]. Cependant, le lien génétique entre CNT matures et NPCytes n'est pas encore rapporté. En effet, aucune étude n'a formellement démontré que les CNT matures donnaient naissance aux NPCytes par un processus de différenciation. Certaines hypothèses peuvent cependant être émises quant à la potentielle différenciation des CNT matures en NPCytes au cours de la croissance.

L'identification d'une population de cellules aux propriétés progénitrices au sein du NP a été récemment rapportée chez l'homme [263]. En effet, des cellules issues du NP de patients âgés de 18 à 26 ans, expriment les marqueurs de surface CD24, la Beta-1,4-N-Acetyl-Galactosaminyl Transferase 1 (GD2) et TEK Tyrosine Kinase Endothelial (TIE2). Le marqueur de surface CD24 étant un marqueur des cellules du NP, GD2 et TIE2 étant exprimés par les cellules souches mésenchymateuses [264-266]. Ces cellules, qui disparaissent en fonction de l'âge, sont capables de former des colonies et de se différencier dans les voies ostéo-, adipo- et chondrogéniques. Ce résultat démontre le caractère multipotent de ces progéniteurs, c'est à dire leur capacité à se différencier en un nombre limité de types cellulaires. Ces données

confirment et approfondissent les premières observations du potentiel chondrogénique des CNT humaines [267]. La transplantation des cellules CD24, GD2 et TIE2 au sein de DIV dégénérés de souris immunodéficientes montre leur capacité à s'intégrer au tissu et à synthétiser du collagène de type II. Leur transplantation sous-cutanée associées à des fragments de NP humains irradiés démontre leur capacité à survivre, à produire des PG et du collagène de type II dans un environnement proche de celui d'un NP humain. Cependant, l'influence des contraintes mécaniques que subissent les DIV humains sur la survie et l'activité de ces cellules progénitrices ne peut être évaluée dans ce modèle.

L'ensemble de ces observations laisse penser que ces progéniteurs seraient des CNT matures. Aucune donnée en ce sens n'est rapportée dans cette étude. L'analyse d'un marqueur identifié comme étant exprimé par les CNT matures, la cytokératin 8 (CK8) permettrait de préciser le caractère notochordal des cellules [268].

Afin d'apporter des éléments de réponse quant à la possibilité que cette population progénitrice soit des CNT matures, le caractère multipotent des CNT matures de chiens non-chondrodystrophiques âgés de 8 mois (âge de la maturité squelettique) a été étudié [269]. Cette étude rapporte que seulement 1% des CNT matures sont capable de se différencier en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes. De façon très intéressante, cette population exprime les marqueurs de cellules souches mésenchymateuses *Nestin*, *CD133* et *neural cell adhesion molecule (NCAM)* mais n'exprime pas le marqueur typique des CNT embryonnaires *T*. Ces données indiquent donc que les cellules multipotentes au sein du NP dériveraient de CNT ayant perdu l'expression de *T*.

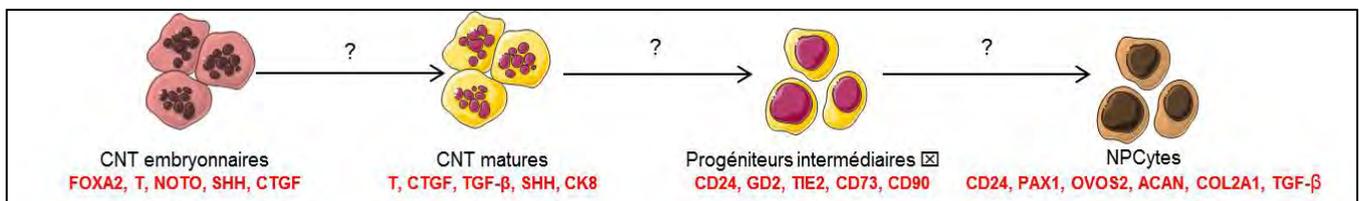


Figure 20 : Modèle de différenciation des cellules notochordales embryonnaires aux nucléopulpcytes (NPCytes). L'ensemble des cellules du NP est issu de la notochorde embryonnaire. La présence d'une population progénitrice multipotente n'exprimant plus T suggère une première étape de différenciation des CNT. L'apparition de cellules similaires aux NPCytes à partir de CNT sous l'influence des contraintes mécaniques a été mise en évidence. Aucune donnée sur les mécanismes moléculaires contrôlant ces potentielles étapes de différenciation n'est actuellement rapportée. CD73 et CD90 sont deux des marqueurs de surface définissant les cellules souches mésenchymateuses. ☒: Aucune information n'est disponible sur l'existence de ces progéniteurs in vivo. L'expression de des marqueurs correspondants a été démontrée in vitro seulement.. ? : Mécanisme inconnu et non caractérisé in vivo.

Enfin, la possibilité que les NPCytes soient issus d'une différenciation des CNT a été rapportée chez le cochon. L'application de contraintes mécaniques quotidiennes sur des NP, composés de CNT matures, isolés de l'AF et des PV a permis de mettre en évidence l'apparition d'un second type cellulaire dont la morphologie est semblable aux NPCytes. Bien que la caractérisation moléculaire de ces cellules n'ait pas été réalisée, l'hypothèse de l'apparition de ce second type cellulaire à partir des CNT matures au sein du NP est émise. Ainsi, les CNT matures seraient capables de se différencier en cellules de type « NPCytes » produisant de la MEC riche en PG et en collagènes sous l'effet des contraintes mécaniques [270].

Grâce à l'ensemble de ces données et aux connaissances relatives à la transition notochorde-*Nucleus pulposus* pendant le développement embryonnaire, un modèle de différenciation notochordale hypothétique depuis le stade embryonnaire jusqu'au NP mature peut être proposé (Figure 20).

Mise en place du dialogue moléculaire entre les cellules notochordales matures et les nucléopulocytes

La présence de TGF- β au sein du NP a été démontrée chez l'homme [18]. Son expression est détectée dès la naissance et est augmentée à partir de 13 ans suggérant que le TGF- β peut être sécrété par les NPCytes, bien que cette étude ne rapporte pas précisément la source de cellules sécrétant du TGF- β . De plus, il est connu que la transduction du signal TGF- β augmente l'expression de *CTGF* tandis que HIF-1 l'inhibe [14, 15, 19, 271]. L'ensemble de ces données converge vers la mise en place de boucles de régulations de l'expression et l'activité des facteurs sécrétés par les cellules du NP au cours de la croissance des DIV.

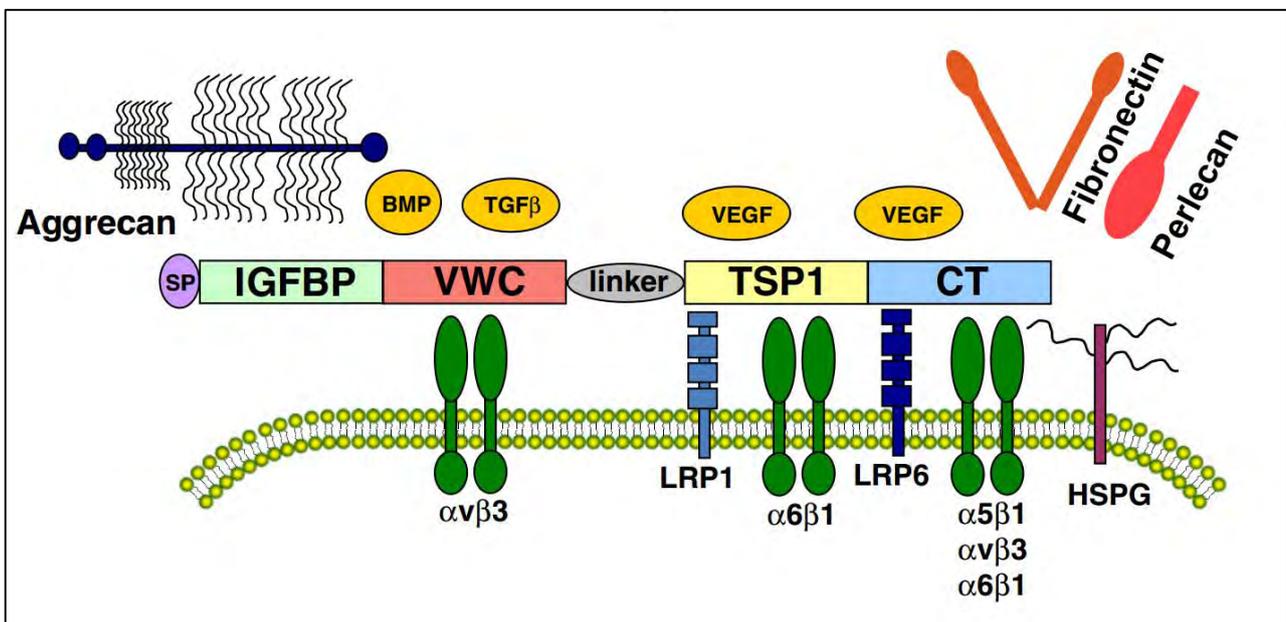


Figure 21 : Représentation schématique de la structure de CTGF, de ses partenaires protéiques et de ses récepteurs membranaires d'après Tran, 2013 [15]. La protéine CTGF est composée de quatre domaines interagissant avec des partenaires protéiques différents. Le domaine IGFBP (insulin-like growth factor binding domain) interagit physiquement avec l'agrécane. Le domaine VWC (Von Willebrand type C) interagit physiquement avec les facteurs TGF-β et BMP. Il interagit également avec les intégrines de type αvβ3. Le domaine TSP-1 (thrombospondin-1) interagit avec le facteur angiogénique VEGF (vascular endothelial growth factor), le récepteur LRP1 (lipoprotein related protein 1) et les intégrines de type α6β1. Enfin, le domaine CT (C-terminal) interagit avec le VEGF, la fibronectine, les protéoglycanes perlecan et héparane sulfate. Il interagit également avec le récepteur LRP6, les intégrines de types α5β1, αvβ3 et α6β1.

Nous définissons ainsi le « dialogue moléculaire entre CNT matures et NPCytes » comme la capacité des CNT à produire des facteurs tel que CTGF, entraînant une réponse cellulaire des NPCytes. Les réponses connues aujourd'hui des NPCytes sont l'activation de la prolifération, l'échappement à l'apoptose et la production de composants de la MEC. Les NPCytes sécrètent du TGF- β qui agit à son tour sur les CNT matures afin de réguler l'expression de *CTGF*. Aucune étude ne décrit précisément ce mécanisme. Notre hypothèse est donc que ce dialogue moléculaire maintiendrait l'homéostasie du NP et régulerait l'activité des CNT matures et NPCytes. Les études étayant cette hypothèse sont décrites ci-dessous.

L'expression de *CTGF* par les CNT n'est pas restreinte à la phase embryonnaire mais est aussi détectée après la naissance [12, 13]. Ce facteur a été également retrouvé dans le sécrétome des CNT matures de chiens non-chondrodystrophiques âgés de 8 mois [12]. Ce facteur est impliqué dans la régulation de la synthèse de la MEC mais aussi de l'angiogenèse, de la migration et différenciation cellulaire de par sa structure unique et ses capacités à interagir physiquement avec de nombreux partenaires [272-276] (Figure 21). Le rôle de ce facteur dans la synthèse de la MEC par les NPCytes a été démontré pour la première fois en 2006. Le traitement de NPCytes de chiens chondrodystrophiques par le facteur CTGF recombinant a montré une augmentation de l'expression de l'agrécan [12]. Une fois sécrété, le facteur CTGF agit par plusieurs mécanismes décrits ci-dessous.

Des interactions physiques entre le CTGF et le TGF- β 1 potentialisent la transduction intracellulaire du signal TGF- β 1. En revanche, des interactions physiques entre CTGF et BMP4 inhibent la transduction intracellulaire de ce signal. Ces données suggèrent que l'interaction avec le TGF- β 1 augmente l'affinité de la liaison de ce

dernier sur son récepteur tandis qu'elle inhibe la fixation de BMP4 à son récepteur [277]. Une régulation similaire a été rapportée dans des chondrocytes articulaires pour BMP2 [278, 279].

Les effets de CTGF peuvent être également transmis par ses propres récepteurs membranaires. La fixation de CTGF sur le récepteur LRP1 permet son endocytose dans les chondrocytes [272, 280, 281]. De plus, la localisation nucléaire de CTGF rapportée dans des cellules de NP indique un rôle potentiel de cofacteur de transcription [15]. Ces données suggèrent que l'endocytose du CTGF puis sa translocation au noyau assurerait la régulation de l'expression de gènes cibles, tels que *COL2A1* ou *ACAN*, au sein du NP. La fixation de CTGF aux intégrines $\alpha6\beta1$, $\alphaV\beta3$ et $\alpha5\beta1$ a également été rapportée dans des chondrocytes [276]. Cependant, les effets de cette liaison ne sont pas décrits ni dans les chondrocytes ni dans les NPCytes. L'augmentation de la synthèse de PG et de collagènes a été néanmoins décrite dans les modèles de cellules souches hépatiques et pancréatiques suggérant que cette liaison aux intégrines pourrait jouer un rôle dans la synthèse de MEC [272-274].

La sécrétion de Shh est également nécessaire à la synthèse de MEC par les NPCytes [250, 282]. Ce facteur est donc également impliqué dans le dialogue moléculaire entre les CNT matures et les NPCytes.

Mise en place de la matrice extracellulaire adulte

A maturité squelettique, les PG représentent 20-45% du poids sec du NP. Ces macromolécules sont de 2 classes : les protéoglycanes agrégeant et les non agrégeant, selon leur capacité de liaison à l'acide hyaluronique. Les protéoglycanes agrégeant comme l'agrécan et le versican sont les protéoglycanes majoritairement synthétisés durant la maturation du NP [283, 284]. Ces macromolécules sont

composées d'un corps protéique sur lequel est greffée des polysaccharides appelés glycosaminoglycanes (GAG) [285]. Il existe 4 types de GAG : la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate et l'héparane sulfate. La chondroïtine sulfate et le kératane sulfate sont les GAG majoritairement représentés au sein du NP à maturité. Ces GAG subissent un processus de sulfatation leur conférant de nombreuses charges négatives responsables de la rétention des molécules d'eau au sein de la MEC. Le taux d'hydratation unique du NP à maturité (70 à 90% du poids sec du NP), s'explique par la présence de kératane sulfate à des niveaux supérieurs comparé aux autres tissus. Ce GAG possède les plus longues chaînes polysaccharidiques et donc le plus grand nombre de charges négatives [285]. Le PG non-agrégeant principalement synthétisé est la fibromoduline dont le rôle majeur est la séquestration des facteurs de croissance et la formation du réseau de fibres de collagène [286].

Des fibres de collagène de type II sont également présentes au sein de la MEC du NP mature [287]. Leur structure en triple hélice confère au NP ses propriétés de résistance aux contraintes mécaniques. Les fibres de collagène de type II et les PG forment un réseau élastique résistant assurant la répartition des contraintes mécaniques à l'ensemble du DIV [288].

La synthèse de ces composants de la MEC par les NPCytes est principalement influencée par les facteurs de transcription HIF et les facteurs de croissances tels que le TGF- β 1, TGF- β 3, BMP2, BMP7, BMP14 (autrement appelé GDF5) et CTGF [12, 252, 289-292]. Des interactions physiques et/ou génétiques entre les facteurs TGF- β , BMP et CTGF assurent la régulation de la synthèse de MEC.

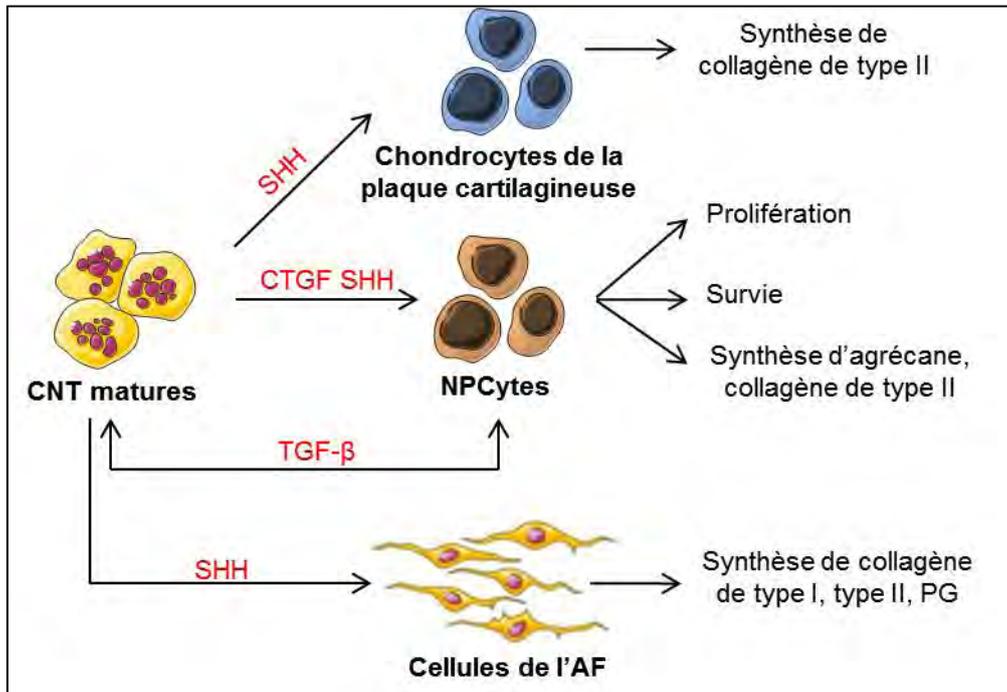


Figure 22 : Facteurs sécrétés par les cellules notochordales adultes (CNT matures) et réponse des chondrocytes de la plaque cartilagineuse, des nucléopulposytes (NPCytes) et des cellules de l'Annulus fibrosus (AF). Les CNT assurent la synthèse de composants matriciels par les chondrocytes de la plaque cartilagineuse et les cellules de l'AF interne et externe via la sécrétion de SHH. La sécrétion de CTGF et SHH assure la prolifération, la survie et la synthèse des composants matriciels par les NPCytes. L'expression de CTGF au sein du NP est régulée par le TGF-β, probablement sécrété par les NPCytes. CTGF : Connective Tissue Growth Factor, PG : Protéoglycanes, SHH : Sonic hedgehog, TGF-β: Transforming Growth Factor-beta.

Bien que la régulation de l'activité de signalisation du GDF5 n'ait pas été étudiée au sein du NP, le rôle de ce facteur dans la synthèse de MEC par les NPCytes a été démontré. Des souris mutantes *GDF5*^{-/-} présentent une déshydratation anormale du NP accompagnée d'une diminution de la présence de collagène de type II et d'agrécane. Une étude récente montre que ces mutants présentent les NP correctement formés à la naissance. Ces données démontrent l'implication du GDF5 au cours de la maturation du NP et non pendant l'embryogenèse [293].

Ainsi, la maturation du NP consiste en la mise en place d'une MEC spécialisée capable d'absorber les contraintes mécaniques engendrées par les mouvements du corps humain adulte. Ceci passe par une transition CNT matures-NPCytes et l'instauration d'un dialogue moléculaire complexe entre ces 2 types cellulaires. Les facteurs sécrétés par les CNT matures maintiennent également l'activité sécrétoire des chondrocytes de la plaque cartilagineuse et des cellules de l'AF (Figure 22). Toute dérégulation de ce dialogue moléculaire conduit à la rupture de l'homéostasie au sein du NP. C'est pourquoi la disparition complète des CNT matures après la maturité squelettique est considérée comme l'élément déclencheur de la cascade d'évènements qui mèneront à la dégénérescence du NP puis de l'ensemble du DIV.

B- La dégénérescence discale lombaire

La dégénérescence discale est souvent assimilée à un vieillissement du DIV. Bien que l'âge soit un facteur de risque important dans le développement de cette dégénérescence, la définition proposée par les Professeurs Adams et Roughley en 2006 distingue dégénérescence et vieillissement : *“The process of disc degeneration is an aberrant cell-mediated response to progressive structural failure. A degenerate disc is one with structural failure combined with accelerated or advanced signs of aging. Early degeneration changes should refer to accelerated age related changes in a structurally intact disc”* [294].

La dégénérescence discale est une maladie multifactorielle. Depuis de nombreuses années des polymorphismes génétiques associés à l'apparition de la dégénérescence ont été décrits [295]. En plus de son origine génétique, des facteurs environnementaux tels que le tabagisme, la catégorie socio-professionnelle et la sédentarisation des populations modernes augmentent la prévalence de cette maladie. Les maladies métaboliques telles que l'obésité, l'athérosclérose et les troubles hormonaux sont des facteurs de risques augmentant le développement de la dégénérescence discale [296, 297]. Enfin, il a été rapporté que des infections bactériennes seraient impliquées dans la dégénérescence discale et associées au caractère symptomatique des DIV dégénérés [298, 299].

La dégénérescence discale est aujourd'hui bien caractérisée. La rupture de l'équilibre entre anabolisme et catabolisme entraînant la dégradation de la MEC et la production de cytokines pro-inflammatoires sont des mécanismes largement décrits dans la littérature [300-307]. Le rôle de la diffusion des nutriments et de l'élimination des métabolites par les PV a également fait l'objet d'une revue récemment publiée [308]. L'intégration des données issues des études sur l'impact de la disparition des

CNT matures dans la rupture de l'équilibre homéostasique du NP, des PV de l'AF est présentée ci-dessous.

1- Rupture du dialogue moléculaire au sein du NP

Une étude récente a montré le lien direct entre la disparition précoce des CNT matures durant la croissance des DIV, induite par l'inactivation conditionnelle de *HIF1* dans la notochorde, et l'apparition d'une dégénérescence du NP chez la souris [309]. Les changements majeurs de la composition de MEC sont la diminution de la synthèse de collagène de type II et de protéoglycanes au profit de la synthèse de collagène de type I. Ceci se traduit par une fibrose, une déshydratation progressive du tissu et l'incapacité du NP à gérer les contraintes mécaniques de l'ensemble de la colonne vertébrale [310-312].

Effets protecteurs des facteurs sécrétés par les cellules notochordales adultes

Afin d'étudier le rôle des facteurs sécrétés par les CNT, des surnageants de culture *in vitro* de CNT matures ont été utilisés. Ce modèle présente certaines limites liées au choix de la source de CNT matures qui varie du chien non-chondrodystrophique au porc, mais également en fonction de leurs conditions de culture (tension en oxygène, concentration de glucose...). Cependant, il s'agit actuellement de la seule technologie disponible pour caractériser les effets protecteurs des facteurs sécrétés par les CNT matures sur les NPCytes. Ce modèle permet également de préciser l'impact de la disparition des CNT matures dans la dérégulation du dialogue moléculaire et l'apparition de la dégénérescence discale.

Des facteurs sécrétés par les CNT matures protègent les NPCytes de la mort cellulaire induite par apoptose [13]. Ces facteurs inhibent l'expression d'enzymes de dégradation de la MEC telle que la matrix metalloproteinase 3 (MMP3) et assurent le maintien de l'expression de facteurs empêchant l'activité des MMP tels que les

Tissue Inhibitors of MetalloProteineases TIMP [13]. La MMP3 dégrade de façon irréversible les fibres de collagènes [313] tandis que TIMP-1 se fixe sur les MMP pour inhiber leur activité catabolique [314]. Le rôle de ces enzymes de dégradation dans la dégénérescence est aujourd'hui largement décrit [305].

De plus, la diminution de l'expression du vascular endothelial growth factor (VEGF), de la MMP7 et des interleukines 6 et 8 (IL-6, IL-8) induite par les facteurs sécrétés par les CNT a été démontrée [315, 316]. L'ensemble de ces molécules est connu pour leur implication dans l'invasion vasculaire et neurale au sein des DIV, associés à la douleur d'origine discale [317-320]. De plus, les facteurs sécrétés par les CNT matures de porc ont un effet inhibiteur sur la formation et la croissance des neurites à partir de cellules humaines de neuroblastome [316]. Ainsi, les facteurs sécrétés par les CNT matures ont également un rôle inhibiteur de la néo-vascularisation et de la néo-innervation des DIV.

Les facteurs sécrétés par les CNT matures ont également un effet sur les cellules de l'AF. La production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de l'AF est réduite en réponse à leur stimulation avec un surnageant de culture de CNT. Cet effet modulateur de la réaction inflammatoire pourrait contribuer au maintien l'intégrité du NP mais également de l'AF [321].

Implication des facteurs connus CTGF, Shh et TGF- β

Des analyses protéomiques à grande échelle sont actuellement en cours afin d'identifier l'ensemble des facteurs sécrétés par les CNT matures. Néanmoins certains facteurs ont d'ores et déjà été identifiés. Il s'agit des facteurs CTGF, Sh h et TGF- β .

Le facteur CTGF joue un rôle majeur dans la maturation du NP et est également impliqué dans la mise en place de la dégénérescence discale.

Une accumulation de CTGF a été démontrée pour les stades les plus avancées de dégénérescence discale chez l'homme, tandis que les CNT matures ont quasiment disparues [14]. Trois hypothèses peuvent expliquer ce résultat inattendu. La première hypothèse repose sur l'accumulation de ce facteur au sein de la MEC tout au long de la phase de croissance du NP résultant de sa liaison aux protéoglycanes. La deuxième hypothèse est l'activation d'un mécanisme de réparation spontanée par les cellules du NP en réponse à la présence de cytokines proinflammatoires et d'enzymes de dégradation de la MEC. Cette hypothèse repose sur le rôle de CTGF dans l'arthrose [322]. En faveur de cette hypothèse, une étude a été réalisée sur les cellules du NP de patients présentant soit une dégénérescence modérée, soit plus sévère. La stimulation de ces cellules *in vitro* par du CTGF montre une augmentation de l'expression de l'agrécan, du collagène de type II et une diminution de l'expression du collagène de type I par les cellules des stades modérés de dégénérescence. Pour les stades les plus sévères, la stimulation par le CTGF entraîne une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires [323]. La troisième hypothèse est que l'accumulation de TGF- β décrit durant la dégénérescence discale serait à l'origine de l'augmentation du CTGF [14, 324].

Le facteur CTGF est retrouvé dans les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires au sein des DIV dégénérés douloureux suggérant son rôle dans l'invasion des vaisseaux au sein des DIV dégénérés [325]. Ce facteur CTGF est impliqué dans les processus de fibrose de la peau, des reins et des poumons [326, 327]. Il pourrait donc être responsable de la fibrose du NP au cours de la dégénérescence.

Le TGF- β est également un facteur impliqué dans le dialogue moléculaire entre les CNT matures et les NPCytes. L'augmentation de l'expression du TGF- β au cours de

la dégénérescence entraîne la diminution de l'expression du transcrit *galectin3* à travers l'activation de la voie Smad3 [328]. La galectine 3 promeut la réponse inflammatoire des cellules du NP se traduisant par une augmentation de l'expression des gènes codant pour les interleukines 1 β et 6 (*IL-1 β* et *IL-6*), du *Chemokine ligand 2* (*CCL2*) et de la protéine MMP3 [328, 329]. Ces données sont un argument de poids quant à l'activation de mécanismes protecteurs impliquant le TGF- β dans les stades précoces de dégénérescence.

Le facteur Shh sécrété par les CNT matures est le troisième facteur connu dans ce dialogue moléculaire. L'analyse de son expression et celle de son récepteur Patched1 chez la souris indique que la voie Shh est active durant la croissance du DIV. A partir de l'âge de la maturité squelettique, une diminution de l'expression de Shh est observée accompagnée d'une perte de l'activité de cette voie de signalisation. Cependant, la ré-expression de Shh un an après la naissance chez la souris montre une réactivation tardive de la voie de signalisation. Cette réactivation tardive est induite par la voie Wnt/ β -Catenin et entraîne une augmentation de la synthèse du collagène de type I au sein du NP, suggérant un rôle de cette voie dans la fibrose du NP [252, 282]. L'implication de la voie Wnt/ β -Catenin dans la dégénérescence étant actuellement très discutée [140, 330-333], il est difficile de conclure quant à l'existence d'une boucle de régulation β -Catenin/Shh responsable de la fibrose du NP.

Implications des facteurs indépendants du dialogue moléculaire

Bien qu'aucune preuve n'ait été rapportée, nous pensons que certains facteurs présents au sein des DIV échappent aux boucles de contrôles assurées par le dialogue moléculaire. C'est le cas des facteurs BMP2, BMP7 et GDF5. L'expression des facteurs de croissance BMP2 et BMP7 est principalement localisée au sein des

PV des DIV sains [334]. Cependant, leur expression est augmentée dans le NP au cours de la dégénérescence [291, 335]. Des effets controversés sur la MEC du NP ont été rapportés rendant complexe l'interprétation de leur rôle dans le développement de la dégénérescence discale [259, 336-340]. L'expression du facteur GDF5 ne varie pas au cours de la dégénérescence discale chez l'homme [341]. Cette observation suggère fortement que les régulations de l'expression et de l'action du GDF5 au sein du NP échappent aux boucles de rétrocontrôle assurées par le dialogue moléculaire. L'implication du GDF5 dans la physiopathologie discale a fait l'objet d'une revue récemment publiée [342]. Ce facteur promeut la synthèse de composants de la MEC par les cellules du NP et inhibe l'expression de certaines MMP [343]. L'expression de GDF5 au sein du NP et de l'AF est inhibée par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) et IL-1 β [344]. L'ensemble de ces données suggère un rôle de ce facteur dans les processus de réparation activés par les cellules du DIV au cours de la dégénérescence. Le potentiel thérapeutique de ce facteur sur la dégénérescence discale fait actuellement l'objet d'études cliniques.

L'ensemble des études présentées ci-dessus montre que le dialogue moléculaire responsable de la formation du NP adulte, est également impliqué dans l'homéostasie de ce tissu et dans sa dégénérescence. La disparition des CNT matures entraîne vraisemblablement une dérégulation de ce dialogue à l'origine de la rupture de l'homéostasie du NP. Ainsi, les données présentées dans ce chapitre suggèrent fortement que la dérégulation du dialogue moléculaire est à l'origine de la cascade d'évènements dégénératifs.

2- Dégénérescence des plateaux vertébraux et de l'Annulus fibrosus

A partir de l'âge de la maturité squelettique, des changements au niveau cellulaire et tissulaire ont lieu également dans les PV et l'AF.

Modifications tissulaires des plateaux vertébraux

Les chondrocytes de la plaque cartilagineuse subissent un processus de différenciation terminale en chondrocytes hypertrophiques. Cette différenciation induit la synthèse d'une MEC calcifiée et riche en collagène de type X [345-347]. Le réseau capillaire diminue au niveau de la plaque sous-chondrale. En parallèle, les pores présents dans la plaque cartilagineuse diminuent en nombre et se bouchent [348, 349]. La diffusion des nutriments, de l'oxygène mais également l'évacuation des métabolites ne sont donc plus assurées. Des phénomènes compensatoires se mettent en place dès les phases précoces de dégénérescence. En effet, une néovascularisation a été observée dans un modèle de dégénérescence discale chez le mouton [2]. Une étude complémentaire chez l'homme a rapporté une augmentation de la perméabilité des PV dans des DIV de grade de Pfirrmann II, correspondant au stade précoce de dégénérescence discale [350]. Malgré la mise en place de ces mécanismes compensatoires, la diffusion des nutriments reste restreinte au sein des DIV dégénérés suggérant que les néo-vaisseaux sont peu fonctionnels.

Tandis que le rôle des PV dans la diffusion des nutriments au NP est connu, son rôle dans la production de molécules impliquées dans la dégénérescence n'a été rapporté que très récemment. Les cytokines pro-inflammatoires (Macrophage migration inhibitory factor MIF, Interferon IFN γ , IL-8, IL-6 et IL-23) secrétées par les PV humains dégénérés induisent la production d'enzymes de dégradation de la MEC

(MMP3 et MMP13) et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) par les cellules du NP [351].

Modifications tissulaires de l'Annulus fibrosus

Au cours de la dégénérescence, la distinction entre AF interne et AF externe est rapidement perdue pour laisser place à un tissu entièrement fibreux et calcifié pour les stades les plus avancés. A ces stades avancés, l'AF présente des fissures et craquelures.

La modification de la composition de la MEC de l'AF entraîne une modification de la répartition des contraintes mécaniques. La présence de mécanorécepteurs à la membrane des cellules de l'AF les rend sensibles à cette modification. En effet, ces contraintes mécaniques entraînent l'apoptose des cellules de l'AF [352, 353].

L'AF est le site d'une néo-innervation massive en particulier au niveau des disques très dégénérés et symptomatiques. En effet, chez ces patients, les fibres nerveuses ont atteint la partie interne de l'AF. La présence de substance P démontre que ces fibres sont nociceptives [354, 355]. Ces observations s'expliquent par l'expression du facteur neurotrophique nerve growth factor (NGF) par les cellules de l'AF [356]. Des études récentes ont confirmé ces observations et révèlent les profils transcriptomiques des cellules de l'AF de DIV humains dégénérés [357, 358]. L'expression de marqueurs impliqués dans l'innervation et dans la douleur a été observée. De manière intéressante, il est montré que l'augmentation de l'expression de ces marqueurs est corrélée à la sévérité de la dégénérescence.

Les cellules de l'AF humaines seraient également impliquées dans la minéralisation et la fibrose du DIV. Les capacités de différenciation des cellules de l'AF en ostéoblastes et de production du collagène de type X ont été rapportées *in vitro* [359, 360]. Cependant, aucune preuve de leur différenciation *in vivo* suggérant leur rôle

dans la mise en place de la calcification du DIV n'a été rapportée. De plus, l'expression du marqueur catabolique *HtrA serine peptidase 1 (HtrA1)* est également augmenté dans l'AF au cours de la dégénérescence [8, 312]. Cette enzyme séquestre et inactive les facteurs de croissance de la superfamille du TGF- β et jouent un rôle dans la dégradation de l'agrecane et du collagène [361].

3- Stress cellulaire

Au cours de la dégénérescence discale, la diminution de l'apport nutritif, l'accumulation des métabolites, l'inflammation et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînent des réponses cellulaires telles que l'apoptose, la sénescence et l'autophagie.

L'apoptose

Au cours de la dégénérescence, une mortalité cellulaire massive par apoptose est activée dans l'ensemble du DIV. L'origine de cette mort massive est liée à la disparition des CNT mais également, à la diminution de l'accessibilité aux nutriments et à l'augmentation des contraintes mécaniques.

L'apoptose est un programme de mort activé par une voie extrinsèque et une voie intrinsèque. La voie extrinsèque consiste en la formation de complexes membranaires de type Fas-FasLigand. La voie intrinsèque est activée par le relargage de calcium mitochondrial ou du réticulum endoplasmique [362, 363]. L'activation de ces différentes voies entraîne l'activation de la caspase 3, effecteur final de l'apoptose. De nombreuses études ont rapporté la contribution de ces différentes voies apoptotiques dans le développement de la dégénérescence discale [13, 353, 364-372].

La sénescence

Il existe 2 types de sénescence : la senescence répllicative liée au raccourcissement des télomères et à mesure des divisions cellulaires et la sénescence induite par le stress (également appelée sénescence prématurée) [373]. La sénescence protège les cellules de l'apoptose au cours de la dégénérescence discale. En effet, une fois la sortie du cycle cellulaire effectuée (phase G0), les cellules ne sont plus sensibles aux facteurs de croissances environnant et aux cytokines pro-inflammatoires. Deux voies de signalisation assurent la transduction du signal au noyau. Il s'agit de la voie p53-p21 et la voie p16 [374]. Tandis que l'activation de la senescence par la voie p53-p21 est réversible, la voie p16 conduit à une senescence irréversible [375]. Ces 2 mécanismes sont activés lors de la dégénérescence discale [376-380]. Il est aujourd'hui bien connu que les cellules sénescents ont une activité de sécrétion unique appelée senescence-associated secretory phenotype (SASP) [381]. Cette activité de sécrétion est caractérisée principalement par la production de cytokines pro-inflammatoires et d'enzymes de dégradation de la MEC. L'activation de la sénescence des cellules ainsi que l'implication du SASP est décrite dans de nombreuses maladies dégénératives [382, 383]. Aucune donnée n'est encore rapportée concernant la dégénérescence discale, il est cependant concevable que la sécrétion de ces facteurs ait lieu et contribue à l'état inflammatoire et à la dégradation de la MEC du DIV au cours de la dégénérescence.

L'autophagie

L'étude de ce mécanisme cellulaire dans la dégénérescence fait aujourd'hui l'objet de nombreuses investigations. L'activation de ce mécanisme est dans un premier temps protecteur. En effet, dû à la diminution de l'accès aux nutriments, les cellules du NP et de l'AF produisent l'énergie et les acides aminés nécessaires à leur survie

et à la production de MEC en recyclant leurs propres protéines. Brièvement, ce processus se caractérise par la formation de vésicules à doubles membranes au sein du cytoplasme comprenant des composants cellulaires défectueux (protéines mal conformées par exemple). Ces vésicules fusionnent ensuite avec des lysosomes induisant la dégradation des composants permettant leur recyclage [384]. Le rôle de l'autophagie est double puisqu'il peut également agir en tant que partenaire de l'apoptose et induire la mort des cellules. Jusqu'à lors, un rôle protecteur de l'autophagie est rapportée au sein du DIV [385-395].

L'activation de l'apoptose, la senescence et l'autophagie au sein du NP, de l'AF et des PV au cours de la dégénérescence sont décrites dans *l'Article II The lumbar intervertebral disc: from development to disc degeneration. P. Colombier, J. Clouet , O. Hamel, L. Lescaudron, J. Guicheux, Joint Bone Spine ,2014.*

ARTICLE II

The lumbar intervertebral disc: from development to degeneration

P. Colombier, J. Clouet , O. Hamel, L. Lescaudron, J. Guicheux

Joint Bone Spine, 2014

Résumé

Les disques intervertébraux (DIV) lombaires sont fortement sujets à une dégénérescence tissulaire dès l'âge de la maturité squelettique. Cette dégénérescence serait à l'origine de 40 % des cas de lombalgie chez l'homme. Malgré des traitements aujourd'hui efficaces contre la douleur, la communauté scientifique cherche à développer de nouvelles approches thérapeutiques afin d'éviter le recours aux arthroèses ou aux prothèses discales. Cependant, le développement de ces nouvelles approches nécessite l'approfondissement de nos connaissances fondamentales relatives à la physiopathologie discale. Récemment, des études ont démontré que les cellules du *Nucleus pulposus* (NP) présentaient un phénotype distinct de celui des chondrocytes articulaires. Parallèlement à ces travaux, des études sur l'origine embryonnaire des cellules du NP ainsi que sur la régulation de l'homéostasie du tissu discal ont permis d'élucider certains mécanismes physiopathologiques. Cette revue résume l'avancée des connaissances relatives à la physiologie du DIV ainsi que les mécanismes mis en place lors de la dégénérescence, permettant ainsi d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.



Available online at
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Review

The lumbar intervertebral disc: From embryonic development to degeneration

Pauline Colombier^{a,b}, Johann Clouet^{a,b,c,f}, Olivier Hamel^{a,b,d,g}, Laurent Lescaudron^{a,b,e}, Jérôme Guicheux^{a,b,h,*}

^a INSERM UMRS 791, LIOAD, Groupe Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology (STEP), 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes, France

^b Université de Nantes, UFR Odontologie, 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes, France

^c Université de Nantes, UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, 9, rue Bias, 44035 Nantes, France

^d Université de Nantes, UFR Médecine, 1, rue Gaston-Veil, 44035 Nantes, France

^e Université de Nantes, UFR Sciences et Techniques, 2, chemin de la Houssinière, 44300 Nantes, France

^f CHU de Nantes, Pharmacie Centrale, 85, rue Saint-Jacques, 44093 Nantes, France

^g CHU de Nantes, Service de Neurotraumatologie, 1, place Alexis-Ricordeau, 44000 Nantes, France

^h CHU de Nantes, Pôle Hospitalo-Universitaire 4 OTONN, 1, place Alexis-Ricordeau, 44000 Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 16 July 2013

Available online 7 August 2013

Keywords:

Intervertebral disc

Embryogenesis

Degeneration

Cartilage

ABSTRACT

Lumbar intervertebral discs (IVDs) are prone to degeneration upon skeletal maturity. In fact, this process could explain approximately 40% of the cases of low back pain in humans. Despite the efficiency of pain-relieving treatments, the scientific community seeks to develop innovative therapeutic approaches that might limit the use of invasive surgical procedures (e.g., spine fusion and arthroplasty). As a prerequisite to the development of these strategies, we must improve our fundamental knowledge regarding IVD pathophysiology. Recently, several studies have demonstrated that there is a singular phenotype associated with *Nucleus pulposus* (NP) cells, which is distinct from that of articular chondrocytes. In parallel, recent studies concerning the origin and development of NP cells, as well as their role in intervertebral tissue homeostasis, have yielded new insights into the complex mechanisms involved in disc degeneration. This review summarizes our current understanding of IVD physiology and the complex cell-mediated processes that contribute to IVD degeneration. Collectively, these recent advances could inspire the scientific community to explore new biotherapeutic strategies.

© 2013 Société française de rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Lumbar intervertebral discs (IVDs) are complex anatomical structures that are essential for the mobility of intervertebral joints. They also participate in anchoring vertebrae together and distributing the pressure that results from movement of the entire trunk. Notably, the functional roles of IVDs in absorption and load distribution are directly related to their unique structure (Fig. 1).

In most mammals, the first signs of IVD degeneration begin to appear upon skeletal maturity in the *Nucleus pulposus* (NP) [1]. Up until this time, two cell types populate the NP: chondrocyte-like cells and notochordal cells. It is now accepted that notochordal cells are largely responsible for maintaining homeostasis [2–5]. Thus, the loss of these cells during skeletal maturation might constitute one of the first changes that occur in the cascade of degenerative events. Although this degeneration arises during the natural aging process, pathological degeneration can also occur, which

progresses in an accelerated and brutal manner. Nevertheless, in this review, we only focus on the mechanisms of development, maturation, and degeneration associated with normal aging.

2. Intervertebral disc physiology

2.1. Embryonic development

In humans, the formation of the three embryonic layers occurs in the third week of gestation. During this phenomenon, called gastrulation, epiblast cells (future ectoderm) invaginate at the Hensen's node and colonize the mesoblastic space to form the notochord (chordal mesoderm). The development of the notochord is dependent on the expression of several genes, including Forkhead box A2 (Foxa2), Brachyury (T), and Notochord homolog (Noto). In addition, a part of maturing somites known as the sclerotome gives rise to the vertebrae, endplates, and *Annulus fibrosus* (AF) under the action of the Sonic hedgehog (Shh) factor and members of transforming growth factor (TGF) family (Fig. 2). The Shh-dependent expression of Paired box 1 and 9 (Pax1/9) controls the vertebral endochondral ossification process [6], whereas TGF- β is involved in the differentiation of the sclerotome into AF cells [7].

* Corresponding author. INSERM U791, 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France. Tel.: +33 2 40 41 29 82; fax: +33 2 40 08 37 12.

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

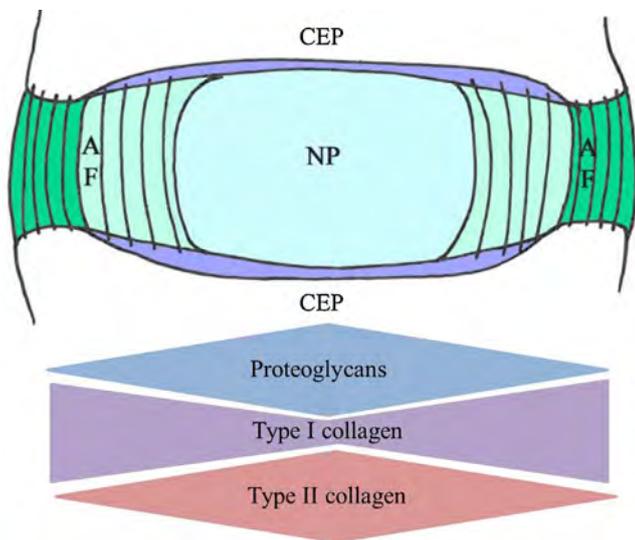


Fig. 1. Schematic representation of the structure and composition of the IVD, indicating proteoglycan content as well as type I and II collagen in the NP and AF. AF: Annulus fibrosus; CEP: cartilage endplate; NP: Nucleus pulposus.

Notochordal cells die by apoptosis when the sclerotome condenses and proliferates to form vertebral bodies. However, the NP is generated by their proliferation at the intervertebral level. Recent studies have demonstrated that all of the NP cells arise from the notochord [8,9].

2.2. The endplates

Like articular cartilage, the endplates are composed of subchondral bone and a thin layer of hyaline cartilage (approximately 1 mm in humans) on which the fibers of the AF anchor. Notably, these cartilage endplates (CEPs) are composed of only chondrocytes, which synthesize an extracellular matrix (ECM) that is rich in type II collagen and proteoglycans (PGs). In these plates, the ratio of PG to type II collagen is approximately 2:1, which is similar to articular cartilage, and the water content is 50–60% [10]. PGs are macromolecules that are composed of a protein body covalently linked to sulfated polysaccharide chains, called glycosaminoglycans (GAGs). These sulfated GAGs carry an overall negative charge that is responsible

for retention of water molecules, efficiently allowing hydration of the extracellular matrix (ECM).

CEPs are also the site of a microscopic network of blood vessels that are responsible for nutritional intake during development and growth of IVDs [11]. Metabolites diffuse through pores present in the growth plates based on their size and charge. Only positive ions (e.g., sodium, calcium) or neutral molecules, such as glucose and oxygen, can diffuse [12].

2.3. The Annulus fibrosus

The AF is composed of fibroblasts (approximately 9000 cells/mm³), which mainly synthesize type I collagen fibers. The ECM of the AF is organized into 15–25 concentric lamellae oriented at 65° relative to the vertical plane. These lamellae are interconnected by PG aggregates and lubricin, as well as type VI collagen fibers [13,14]. Lubricin, known for its lubricant role within diarthrodial joints, is probably involved in the reduction of friction between adjacent lamellae of the AF [14].

The AF can be divided into two distinct areas: the outer AF and inner AF. The inner AF, which is also known as the transition zone, contains poorly organized ECM that is composed of type II collagen, PGs, and water. In contrast, the outer AF is highly organized and is rich in type I collagen, whereas type II collagen and PGs are virtually undetectable in this region [15]. Moreover, the outer AF has a higher resistance to tension than the inner AF. Collectively, the fibrous structure of the AF yields important mechanical properties that limit NP protrusion.

2.4. The Nucleus pulposus

The NP contains approximately 3000 cells/mm³ and is composed of several cell types embedded in a matrix that is rich in both type II collagen and PGs (PG to type II collagen ratio is 27:1). The main PG within the NP is aggrecan, which contains ~30 chains of sulfated GAGs, contributing to a negative charge that fosters the hyper-hydrated state of the NP. Notably, this water content, along with type II collagen fibers, allows the NP to be elastic and deform under stress. Notochordal and chondrocyte-like cells synthesize the matrix components of the NP. It is now accepted that these chondrocyte-like cells have a phenotype distinct from that of articular chondrocytes [16,17]. Moreover, the presence of a third cell type, displaying progenitor properties similar to those of mesenchymal stem cells (MSCs), was recently described by Sakai et al. [18]. However, considering the characteristics of notochordal cells, it is likely that these progenitor cells are actually notochordal cells. Cells of the NP are highly specialized and survive in a very hypoxic environment (1% of O₂). For this reason, the hypoxia inducible transcription factors -1 and -2 (HIF-1 and HIF-2), which are key cellular regulators of the hypoxic response, were found to be constitutively active in NP cells [19]. Indeed, Agrawal et al. have demonstrated that the promoter of the aggrecan gene responds to HIF-1. Thus, constitutive activity of HIF-1 might be partly responsible for the large production of aggrecan by NP-resident cells, independently of oxygen conditions. They also demonstrated that the expression of some glucose transporters (GLUT1 and 2) were under the control of HIF-1 [20]. Therefore, NP cells possess a unique metabolism that allows them to be functionally and constitutively adapted to their environment, which is low in oxygen and nutrients.

Recent studies have shown the importance of notochordal cells in the synthesis of functional ECM and in the survival of chondrocyte-like cells. Erwin et al. have demonstrated that notochordal cells synthesize growth factors, such as connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), stimulating the proliferation of chondrocyte-like cells and the synthesis of type II collagen and aggrecan [4]. It was also found that the secretome of notochordal

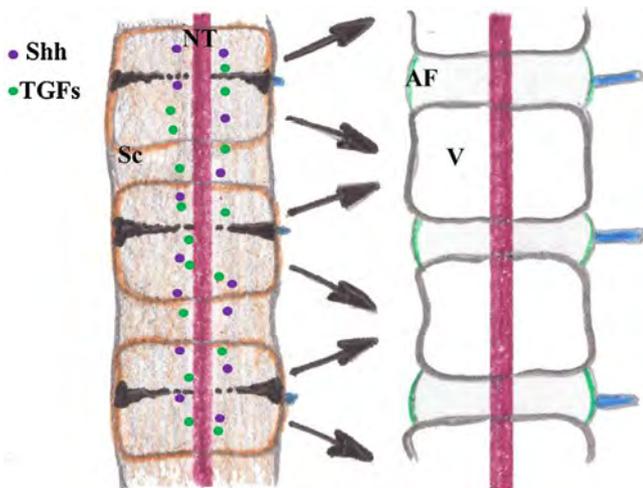


Fig. 2. Schematic representation of the resegmentation phenomenon of the sclerotome during the formation of the V and AF. AF: Annulus fibrosus; NT: notochord; SC: sclerotome; Shh: sonic hedgehog; TGFs: transforming growth factors; V: vertebra.

cells had an anti-apoptotic effect on chondrocyte-like cells [5]. In fact, the uncharacterized factors secreted from notochordal cells have the ability to inhibit the activation of the apoptotic caspases-3 and -9 and favor the expression of aggrecan and type II collagen. Furthermore, similar to HIF-1 regulation in NP cells, it was reported that oxygen tension can control the expression of CTGF/CCN2 by notochordal cells [21]. Thus, this mechanism not only controls the hypoxic response in NP cells, but also the amount of CTGF/CCN2 for maintaining PG production.

Taken together, these data highlight the fundamental role of notochordal cells in the survival and activity of chondrocyte-like cells, which subsequently maintains NP homeostasis. Therefore, the gradual disappearance of notochordal cells during skeletal maturation and aging constitutes a primary event initiating degeneration of the NP.

3. The intervertebral discs aging

So far, it has been challenging to understand the mechanisms involved in disc aging. Thus, even though tissue remodeling during aging has been relatively well described, the mechanisms contributing to age-related changes in the discs remain poorly defined.

3.1. Cell modifications

Cellular changes, which mainly involve the NP, begin to occur upon skeletal maturity. The first major alteration involves a gradual disappearance of notochordal cells, an event that might be explained by their differentiation into chondrocyte-like cells. Indeed, after birth, the NP consists mainly of notochordal cells, which differentiate progressively in chondrocyte-like cells. In fact, it was recently reported that the activation of the Wntless integration site (Wnt)/beta-catenin signaling pathway controls self-renewal and maintenance of notochordal cells during the formation and growth of IVDs [22]. Nevertheless, recent studies have also implicated this pathway in the production of enzymes that degrade ECM during disc aging in humans [23]. Thus, this apparent dichotomy in the role of the Wnt/beta-catenin signaling pathway is of primary interest with regard to disc development and degeneration.

In parallel with the disappearance of notochordal cells during aging, the chondrocytes of CEPs begin to engage their hypertrophic conversion and synthesize type X collagen. Ultimately, the ECM begins to calcify and becomes impermeable, which not only blocks the diffusion of nutrients, but also the removal of metabolites within the NP [24]. These events obstruct tissue homeostasis, primarily by inducing acidification and restricting the supply of oxygen and nutrients. The chondrocyte-like cells residing within the NP are therefore exposed to significant metabolic stress, which may induce cell death. As concerning AF cells, they present membrane mechanoreceptors and are very sensitive to mechanical stresses. It has been described that these cells undergo a massive apoptotic cell death in response to overload [25]. In this context, NP cell apoptosis could be initiated through several caspase-dependent pathways [26]. Aging can result in caspase activation by either the death receptor-mediated extrinsic pathway [27] or the intrinsic pathway, which is linked to mitochondrial activity and the endoplasmic reticulum, especially during the most advanced stages of degeneration [25,28].

Despite the fact that the NP has a low capacity for spontaneous repair, its resident cells have the potential to protect themselves from cell death through the senescence and autophagy pathways. Senescence involves cell cycle arrest at the G1 phase and entry of cells into the non-proliferative G0 phase. Two distinct senescence programs have been described, which include replicative

senescence (i.e., telomere shortening during division) and senescence due to oxidative stress and/or mitochondrial defects [29]. Upon entry into the G0 phase, cells no longer respond to environmental cues (whether anabolic or catabolic), which can permit evasion of programmed death. Interestingly, it has been found that NP cells experience replicative senescence during aging [30].

The second mechanism of cell protection involves autophagy, a process that allows cells to generate their own energy under conditions of high stress, such as prolonged nutrient deficiency [31]. In the NP, it is widely accepted that nutrient intake decreases during aging. In this context, autophagic vesicles have been observed in NP-resident cells [32]. Notably, the number of autophagosomes, as well as autophagic flow, was found to increase with aging. This strongly suggests that NP cells have the potential to compensate for nutrient deprivation by generating their own energy when exposed to intense stress.

Despite these protective mechanisms utilized by NP cells during the aging process, they gradually die, resulting in significant alterations in the ECM.

3.2. Tissue modifications

Similar to cellular changes, tissue remodeling in the NP is also an early step involved in the aging process. ECM integrity within IVDs is based on a balance between anabolism and catabolism. This equilibrium, which is affected by the loss of notochordal cells, is even further disrupted by senescence and apoptosis of chondrocyte-like cells. This results in the uncontrolled synthesis of enzymes that degrade ECM components by the NP cells, including matrix metalloproteinases (MMPs) and A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats (ADAMTS) [33]. These enzymes are capable of degrading both collagen and PGs, leading to dehydration and progressive disorganization of ECM. Under these conditions, it has been observed that the ECM takes on a grainy appearance and displays cracking and tearing. It has also been demonstrated that over time, type II collagen in the NP is replaced by type I collagen. Moreover, the anatomical border between the NP and AF becomes less defined, with the NP gradually becoming fibrous, losing its capacity to absorb and deform under stress.

Degradation of matrix components is later initiated in the AF, resulting in destabilization of its structure. During this process, the collagen fibers become thinner and more irregular, eventually leading to cracking [34].

Along with these structural changes, key players in the inflammatory response (i.e., interleukin-1 [IL-1] and tumor necrosis factor [TNF]) have been found to participate in tissue remodeling within IVDs. Indeed, these cytokines can induce the expression of genes coding for MMPs [35]. In fact, it was found that NP cells were capable of secreting IL-1, which can stimulate the synthesis of nerve growth factor (NGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [36]. Secretion of these growth factors could partly explain the innervation and vascularization observed during aging of the NP. It has also been suggested that NGF production correlates with innervation by nociceptive nerves, which might contribute to discogenic pain during pathological IVD [37].

Disc aging is a physiological process that is defined by a series of changes occurring at both cell and tissue levels (Table 1). IVDs gradually lose integrity, no longer providing their biomechanical role. However, advances in our knowledge regarding the pathophysiological degeneration of IVDs have offered new prospects for treatments. For example, several cellular processes that could be targeted in novel therapeutic strategies are now well acknowledged, such as blocking apoptosis, inhibiting inflammation, or promoting cellular protection. Repopulating the NP with functional cells might also constitute a relevant strategy [38]. In this regard,

Table 1
Table summarizing the major cell and tissue alterations during IVD aging.

	Healthy IVD			Aged IVD		
	NP	AF	CEP	NP	AF	CEP
Cellular modifications	Notochordal Chondrocyte-like	Fibroblast	Chondrocyte	Chondrocyte-like	Fibroblast	Hypertrophic chondrocyte
Cell types						
Cell density	++	+++	++	–	++	+
Apoptosis	–	–	–	+++	++	++
Senescence	–	–	–	+++	++	?
Autophagy	+	+	?	+++	++	?
Inflammation	–	–	–	+++	+	++ (subchondral bone)
Angiogenesis	–	–	+	+	+++	++
Innervation	–	+	+	–	++	++
Tissue modifications						
ECM components						
Aggrecan	+++	+	++	–	–	–
Type I collagen	–	+++	–	+	+	+
Type II collagen	++	+	+++	–	–	–
Type X collagen	–	–	–	+	+	++

AF: *Annulus fibrosus*; CEP: cartilage endplate; ECM: extracellular matrix; IVD: intervertebral disc; NP: *Nucleus pulposus*; +++: strong; ++: moderate; +: weak presence; –: absence; ?: lack of data in the literature.

intradiscal injection of suitable biomaterials along with adult stem cells (e.g., undifferentiated or differentiated into chondrocyte-like cells and/or notochordal cells) could represent a promising approach [39]. This type of therapy would delay the loss of homeostasis as well as the associated adverse consequences.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgments

We thank INSERM, the “Fondation pour la Recherche Médicale” (Victor and Irminia Mesclé), the AO Foundation “start-up grant”, the “Fondation de l’Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée”, the Région Pays de la Loire Bioregion II, the “Agence Nationale de la Recherche” Tecsan (project “Chondrograft”), the “Société française de Rhumatologie”, and the “Société française de Neurochirurgie”. Pauline Colombier is the recipient of a doctoral grant from the AXA Research Fund.

References

- [1] Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, et al. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine* 2002;27:2631–44.
- [2] Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis. *Exp Cell Res* 1999;246:129–37.
- [3] Erwin WM, The Notochord. Notochordal cell and CTGF/CCN-2: ongoing activity from development through maturation. *J Cell Commun Signal* 2008;2: 59–65.
- [4] Erwin WM, Ashman K, O’Donnel P, et al. Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2006;54: 3859–67.
- [5] Erwin WM, Islam D, Inman RD, et al. Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2011;13:215.
- [6] Christ B, Huang R, Wilting J. From somites to vertebral column. *Ann Anat* 1992;174:23–32.
- [7] Hayes AJ, Isaacs MD, Hughes C, et al. Collagen fibrillogenesis in the development of the annulus fibrosus of the intervertebral disc. *Eur Cell Mater* 2011;22:226–41.
- [8] Choi KS, Cohn MJ, Harfe BD. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev Dyn* 2008;237:3953–8.
- [9] McCann MR, Tamplin OJ, Rossant J, et al. Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse: implications for intervertebral disc development. *Dis Model Mech* 2011;5:73–82.
- [10] Roberts S, Menage J, Urban JP. Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc. *Spine* 1989;14:166–74.
- [11] Taylor JR. Growth of human intervertebral discs and vertebral bodies. *J Anat* 1975;120:49–68.
- [12] Grunhagen T, Wilde G, Soukane DM, et al. Nutrient supply and intervertebral disc metabolism. *J Bone Joint Surg* 2006;88:30–5.
- [13] Melrose J, Smith SM, Applezard RC, et al. Aggrecan: versican and type VI collagen are components of annular translamellar crossbridges in the intervertebral disc. *Eur Spine J* 2008;17:314–24.
- [14] Shine KM, Simson JA, Spector M. Lubricin distribution in the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am* 2009;91:2205–12.
- [15] Eyre DR, Muir H. Types III collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *Biochem J* 1976;157:267–70.
- [16] Clouet J, Grimandi G, Pot-Vaucel M, et al. Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes. *Rheumatology* 2009;48:1447–50.
- [17] Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, et al. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum* 2010;62: 3695–705.
- [18] Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat Commun* 2012;3:1264.
- [19] Rajpurohit R, Risbud MV, Ducheyne P, et al. 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.
- [20] Agrawal A, Guttapalli A, Narayan S, et al. Normoxic stabilization of HIF-1alpha drives glycolytic metabolism and regulates aggrecan gene expression in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disk. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:621–31.
- [21] Tran CM, Fujita N, Huang BL, et al. HIF-1alpha and CCN2 form a regulatory circuit in hypoxic nucleus pulposus cells: CCN2 suppresses HIF-1alpha level and transcriptional activity. *J Biol Chem* 2013;288:12654–66.
- [22] Smolders LA, Meij BP, Riemers FM, et al. Canonical Wnt signaling in the notochordal cell is upregulated in early intervertebral disk degeneration. *J Orthop Res* 2011;30:950–7.
- [23] Wang M, Tang D, Shu B, et al. Conditional activation of beta-catenin signaling in mice leads to severe defects in intervertebral disc tissue. *Arthritis Rheum* 2012;64:2611–23.
- [24] Antoniou J, Steffen T, Nelson F, 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;98:996–1003.
- [25] Rannou F, Lee TS, Zhou RH, et al. Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. *Am J Pathol* 2004;164:915–24.
- [26] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281: 1312–6.
- [27] Bachmeier BE, Nerlich AG, Weiler C, et al. Analysis of tissue distribution of TNF-alpha, TNF-alpha-receptors, and the activating TNF-alpha-converting enzyme suggests activation of the TNF-alpha system in the aging intervertebral disc. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1096:44–54.
- [28] Wang H, Liu H, Zheng ZM, et al. Role of death receptor: mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in different stages of degenerative human lumbar disc. *Apoptosis* 2011;16:990–1003.

- [29] Herbig U, Ferreira M, Condel Let al. Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006;311:1257.
- [30] Kim KW, Chung HN, Ha KY, et al. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs. *Spine J* 2009;9: 658–66.
- [31] Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell* 2011;146:682–95.
- [32] Ye W, Zhu W, Xu K, et al. Increased macroautophagy in the pathological process of intervertebral disc degeneration in rats. *Connect Tissue Res* 2012;54:22–8.
- [33] Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* 2000;25:3005–13.
- [34] Urban JPG, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther* 2003;5: 120–30.
- [35] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R732–45.
- [36] Lee JM, Song JY, Baek M, et al. Interleukin-1beta induces angiogenesis and innervation in human intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res* 2011;29: 265–9.
- [37] Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre CL, et al. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J Pathol* 2002;197: 286–92.
- [38] Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, et al. Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009;4:318–29.
- [39] Clouet J, Vinatier C, Merceron C, et al. The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering. *Joint Bone Spine* 2009;76:614–8.

C- Médecine régénératrice

La médecine régénératrice a pour objectif de restaurer les fonctions des tissus ou organes endommagés. Deux types de maladies peuvent être traités par des approches de médecine régénératrice. Il s'agit des maladies dégénératives comme l'arthrose, la dégénérescence discale, les maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer) et des maladies entraînant une destruction des cellules ou des organes comme le diabète. Quatre types d'approches thérapeutiques peuvent être distingués en médecine régénératrice : l'injection de facteurs de croissance, la thérapie génique, la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire [396].

1- Approches thérapeutiques en médecine régénératrice du DIV

Grâce à l'amélioration des connaissances relatives à la physiopathologie discale, le développement de stratégies thérapeutiques pertinentes est aujourd'hui possible. La dégénérescence discale affectant initialement le NP [248, 397], le traitement de cet élément avant que la cascade dégénérative n'atteigne l'ensemble du DIV et devienne irréversible semble être une stratégie prometteuse. Bien que le rôle des PV soit également important dans le maintien de l'homéostasie discale [398-401], la restauration de cette structure paraît difficile au regard de sa complexité (vaisseaux sanguins, pores, plaques sous-chondrale et cartilagineuse). Enfin, étant donné que l'AF est l'élément affecté en dernier dans la cascade dégénérative, nous pensons que la restauration des fonctions du NP pourrait prévenir les futurs dommages de l'AF. Cependant, certaines études portant sur la formation de fibres d'AF *in vitro* sont actuellement en cours. Ces études sont développées dans le but de proposer un système efficace de suture de l'AF, après sa rupture lors des hernies discales ou après injection intradiscale pour traiter le NP [402-404].

Les approches développées dans le cadre de la médecine régénératrice du NP sont détaillées ci-dessous.

L'injection de facteurs de croissance

L'injection de facteurs de croissance au sein de DIV dégénérés est aujourd'hui envisageable de par la production de facteurs recombinants de grade clinique. La réduction des temps d'hospitalisations est également un argument en faveur de développement de ces stratégies. De plus, leur rôle dans la synthèse de la MEC du NP est majeur. En effet, au total quatre essais cliniques de phase I/II sont actuellement en cours afin d'évaluer les effets régénérateurs d'une injection intradiscale de GDF5 (NCT01182337, NCT01158924, NCT01124006, NCT00813813). Ces essais cliniques ont permis l'inclusion de 24 à 40 patients souffrant de douleurs lombaires et ayant au moins un DIV dégénéré. Ces études ont pour objectifs de mettre en évidence la tolérance, la dose optimale de GDF5 et les premiers effets régénérateurs sur le DIV. L'évaluation du potentiel régénérateur est basée sur l'analyse du signal discal à l'IRM et sur la douleur du patient. Les résultats ne sont pas disponibles à ce jour. D'autres candidats tels que les facteurs CTGF ou SHH pourraient également être envisagés au regard de leur importance dans le dialogue moléculaire entre CNT matures et NPCytes. Aucune donnée préclinique n'est actuellement disponible.

Malgré l'avantage majeur d'être peu invasive, cette stratégie présente certaines limites. Le temps de demi-vie des facteurs de croissance étant court, il est nécessaire de réitérer les injections, entraînant des dommages de l'AF. De plus, le nombre de cellules au sein du NP dégénéré est faible ce qui limite la synthèse de la MEC en quantité suffisante pour restaurer les fonctions biomécaniques des DIV. Il

semble par ailleurs difficile d'imaginer, au regard de la complexité du dialogue moléculaire, que l'injection d'un seul facteur de croissance soit efficace.

L'injection d'un cocktail de facteurs serait peut-être plus appropriée mais plus complexe à définir. De plus, l'injection massive de facteurs recombinants entraîne une action instantanée mais non prolongée dans le temps comme c'est le cas des facteurs CTGF, TGF- β ou SHH. Les CNT matures n'étant plus présentes au sein des DIV dégénérés, l'activité des facteurs de croissance recombinants injectés échappera certainement aux régulations fines assurées par le dialogue entre les CNT matures et les NPCytes.

L'utilisation de cette approche pour régénérer le NP est donc très complexe. Le choix des facteurs adaptés pour stimuler les cellules ciblées ainsi que la dose et le temps durant lequel les facteurs doivent être actifs sont des questions auxquelles il faudra répondre avant d'envisager l'utilisation cette stratégie.

Tableau II: Stratégies de thérapie génique du disque intervertébral d'après Priyadarshani et Yao, 2015 [405]. Tableau résumant les principaux résultats obtenus *in vitro* et chez l'animal.

Gènes	Type cellulaire	Modèle	Résultats	Références
hTERT	Cellules NP humaines	<i>In vitro</i>	Restauration de l'activité télomérasique Augmentation de la prolifération Prévention de la senescence Augmentation de synthèse de collagène de type II et d'agrécane	[406, 407]
TIMP-1 ou BMP2	Cellules de NP humaines	<i>In vitro</i>	Augmentation de la synthèse de PG	[408]
BMP7	Cellules NP canines	<i>In vivo</i> Chien	Injections intradiscales avec des cellules de NP surexprimant la BMP7 Amélioration du signal discal à l'IRM Augmentation de synthèse de collagènes et PG	[409]
TGF-β1 et IGF-1 et BMP2	Cellules de NP humaines	<i>In vitro</i>	Augmentation de la synthèse de PG	[410]
OP1 et SOX9		<i>In vivo</i> Lapin	Co- injections virales intradiscales Restauration de la hauteur discale Augmentation de la synthèse de collagène type II et de PG	[411]
TGF-β1		<i>In vivo</i> Lapin	Amélioration du signal discal à l'IRM Augmentation de synthèse de PG	[412, 413]
TIMP-1 et BMP-2	Cellules NP humaines	<i>In vivo</i> Lapin	Co- injections virales intradiscales diminution de la fibrose.	[414]

La thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie basée sur l'intégration de gènes thérapeutiques au génome des cellules ou leur expression sous forme épisomale, assurant la synthèse de protéines manquantes ou corrigées.

Le développement de stratégies de thérapie génique pour le traitement de la dégénérescence discale a montré des résultats positifs *in vitro* et chez l'animal (Tableau II). Cependant, ces stratégies souffrent de limites importantes. L'insertion de gènes dans le génome des cellules du NP *in vitro* implique leur prélèvement et leur réinjection au sein des DIV. Cette approche peut entraîner des dommages de l'AF. De plus, le faible nombre de cellules, leur accessibilité restreinte due à leur enclassement au sein de la MEC dense et leur faible taux de prolifération limite l'insertion du gène d'intérêt dans le génome des cellules du NP *in vivo* [415]. L'injection de cellules du NP produites par différenciation de cellules souches permettrait de pallier à ces limites. De plus, les sites d'insertion non contrôlés des vecteurs viraux peuvent entraîner des dommages au sein du NP tels que la prolifération aberrante des cellules ou leur transformation en cellules tumorales. L'utilisation de vecteurs non intégratifs peut être envisagée mais l'efficacité de transduction est faible *in vivo* [416]. Aucune étude clinique évaluant l'efficacité d'une stratégie de thérapie génique pour la régénérescence du DIV n'est actuellement en cours. Le risque associé à un traitement basé sur l'insertion d'un ou plusieurs gènes dans le génome des cellules du NP semble trop grand par rapport au bénéfice qu'il pourrait apporter.

La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à traiter un organe déficient par l'apport de cellules pouvant remplacer ou suppléer des cellules défaillantes.

L'utilisation de cellules de NP autologues et de chondrocytes articulaires juvéniles a fait l'objet d'études cliniques. L'étude Eurodisc est basée sur la transplantation de cellules du NP provenant de hernies discales au sein des mêmes DIV herniés. L'objectif thérapeutique de cette étude est la restauration du NP qui a été extrudé lors de la rupture de l'AF [417, 418]. Sur plus de 100 patients et après deux ans de suivi, l'amélioration du signal discal à l'IRM, le maintien de la hauteur discale et la diminution de la douleur ont été observés. Une seconde étude clinique basée sur la même stratégie incluant 120 patients présentant une hernie discale est en cours (Novocart Disc plus). Cette étude consiste à évaluer la prévention de l'apparition d'une dégénérescence discale après transplantation de NPCytes autologues au sein des DIV herniés. Un suivi par IRM est prévu sur 5 ans.

Une étude clinique prospective basée sur l'injection de chondrocytes articulaires juvéniles a également été réalisée chez 15 patients souffrant de douleurs lombaires d'origine discale [419]. Aucune modification du signal discal à l'IRM ni de la hauteur discale n'a été rapportée un an après transplantation. Une diminution de la douleur a cependant été mesurée chez l'ensemble des patients. Une seconde étude clinique, cette fois-ci randomisée et en double aveugle est aujourd'hui en cours.

Ces études cliniques rapportent une diminution de la douleur et une amélioration de la qualité de vie des patients après transplantation. Cependant, aucune information sur les processus régénératifs n'est aujourd'hui disponible. De par l'impossibilité d'analyser la qualité de la MEC et les types cellulaires peuplant le NP, nous ne pouvons pas conclure quant au potentiel régénérateur de ces transplantations. De plus, la dédifférenciation des cellules du NP et des chondrocytes est décrite lors de la culture *in vitro* [420-424]. Il est donc possible que les cellules transplantées aient changé d'identité et soient de type fibroblastique. Dans ce cas, il est possible que le

tissu néoformé au sein des DIV soit un tissu fibreux inapproprié à la gestion des contraintes mécaniques de l'ensemble de la colonne. C'est pour ces raisons qu'un recul plus important sur ces études cliniques est nécessaire avant de proposer raisonnablement ces transplantations comme traitement de la dégénérescence discale.

L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour régénérer les DIV a également fait l'objet d'études cliniques. Les résultats seront présentés dans la partie 3 de ce chapitre.

L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire associe l'utilisation de biomatériaux à la thérapie cellulaire. L'utilisation des biomatériaux présente plusieurs intérêts : ils servent de véhicule de transport des cellules assurant leur maintien au site d'injection, permettent la protection des cellules vis-à-vis de l'environnement dans lequel elles sont injectées et également le renforcement mécanique des DIV lésés [11]. Dans une perspective de restauration du DIV, l'ensemble de ces caractéristiques est crucial pour le succès de la thérapie. L'utilisation d'un biomatériau approprié permettant de rétablir les fonctions biomécaniques que la MEC dégénérée n'assure plus, est essentielle. C'est d'ailleurs un point qui aujourd'hui encourage les ingénieurs tissulaires du DIV à développer des stratégies thérapeutiques uniquement basées sur l'utilisation de biomatériaux, sans association avec des cellules régénératrices [425, 426]. Il existe plusieurs classes de biomatériaux, mais la classe des hydrogels retient plus particulièrement l'attention des ingénieurs tissulaires pour la régénérescence du NP. Les caractéristiques intrinsèques des polymères synthétiques sont contrôlables et modulables permettant d'adapter leurs propriétés aux tissus à régénérer. Il n'y a cependant aucun consensus définissant le biomatériau à utiliser pour la médecine

régénératrice du DIV. Malgré tout, certains critères sont à respecter tels que sa biocompatibilité, sa perméabilité pour assurer la diffusion des nutriments et des métabolites, son injectabilité et sa biofonctionnalité. Les polymères synthétiques ou naturels forment des réseaux hydrophiles et sont composés d'au moins 90% d'eau, rappelant la structure de la MEC du NP [427-429].

En plus de l'utilisation de biomatériaux, l'apport de cellules exogènes semble primordial pour régénérer le NP au regard des propriétés intrinsèques de ce tissu à recruter des cellules provenant des tissus environnants. En effet, les cellules du NP sont capables de recruter des CSM à travers les PV au cours de la dégénérescence [430, 431]. Ainsi, les cellules du NP activent des mécanismes de réparation basés sur le recrutement de CSM *in vivo*. C'est pourquoi des injections intradiscales de CSM chez des patients souffrant de dégénérescence discale ont été réalisées. Les résultats de ces études sont détaillés dans la partie 3 de ce chapitre.

Nous pensons que l'association de CNT matures et NPCytes dérivés de cellules souches humaines à un biomatériau assurant leur protection permettra de restaurer les fonctions biologiques et biomécaniques du NP pour une régénérescence du DIV à long terme. Le potentiel des cellules souches pluripotentes humaines pour la production de CNT matures ou de NPCytes est décrit ci-dessous.

2- Potentiel des cellules souches pluripotentes

Issues de la masse cellulaire interne de blastocystes (entre 5 à 7 jours après la fécondation chez l'homme), les cellules souches embryonnaires (Cellules ES) possèdent la capacité de se renouveler à l'infini (autorenouvellement) et sont pluripotentes, c'est-à-dire capables de donner naissance à tous les types cellulaires de l'organisme. Leur utilité est grande en recherche biomédicale puisqu'elles permettent de modéliser et d'étudier les mécanismes du développement

embryonnaire humain précoce. De plus, leur différenciation permet à la fois d'élucider les mécanismes à l'origine du développement de maladies mais également de produire des cellules régénératrices [432]. Leur utilisation pose cependant des problèmes éthiques puisque qu'elle nécessite la destruction d'un embryon humain. L'origine des débats est principalement culturelle et religieuse et dépendante du stade à partir duquel un embryon est considéré comme un être vivant. La recherche sur l'embryon a été interdite pendant de nombreuses années en France. Après la révision de la loi de bioéthique en 2013, la recherche sur les cellules ES humaines est aujourd'hui autorisée et soumise à des régulations très strictes (Décision n° 2013-674 du 1^{er} août 2013).

Une autre source de cellules pluripotentes est aujourd'hui disponible. Il s'agit des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) générées à partir de cellules somatiques adultes. Les travaux pionniers de Yamanaka et Gurdon qui ont été récompensés par le prix Nobel de médecine en 2012, ont mis en évidence les 4 facteurs de pluripotence *Kruppel-Like Factor 4 (Klf4)*, *POU Class 5 Homeobox 1 (Oct4/Pou5f1)*, *Sox2* et *Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (c-Myc)* (cocktail OKMS) essentiels à la reprogrammation des fibroblastes murins et humains [433, 434]. Depuis ces travaux pionniers, la communauté scientifique s'intéresse au potentiel transfert de ces cellules à la clinique humaine. Pour cela, les techniques de reprogrammation ont été améliorées pour être plus efficaces, plus rapides, non intégratives et pour remplacer c-Myc, qui est connu pour son rôle oncogénique [435-439].

Cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites

Le comportement d'une iPSC efficacement reprogrammée est très proche de celui d'une cellule ES. Dans le modèle de la souris, la pluripotence de ces cellules est démontrée par la création de chimères. C'est-à-dire, après injection des cellules reprogrammées dans des blastocystes, ces cellules colonisent l'épiblaste et contribuent à la formation des trois feuilletts embryonnaires. La formation de chimères avec des iPSC humaines n'étant pas réalisable pour des raisons éthiques, la pluripotence des iPSC humaines est analysée par la formation de tératome *in vivo* dans des modèles murins immunodéficients. La formation de tissus dérivés du mésoderme, de l'endoderme et de l'ectoderme *in vivo* définit ainsi la pluripotence de ces cellules. Une étude a cependant réalisé des transplantations de cellules ES et iPSC humaines dans la région antérieure à la ligne primitive naissante des embryons de souris à E6.5 (épiblaste, EGO et ligne primitive antérieure). Les cellules injectées ont colonisé l'ensemble des structures issues de l'ectoderme, du mésoderme et de l'endoderme démontrant leur capacité à former les différents types cellulaires de l'organisme et donc leur pluripotence [440].

De nombreuses études montrent que le transcriptome d'iPSC et de cellules ES est difficilement distinguable [441]. Il existe plus de variations entre les clones d'iPSC que de variations entre les deux types de cellules pluripotentes (ES et iPSC). Il a été récemment démontré que cette variation était majoritairement liée au profil génétique du donneur et que la signature résiduelle de la cellule originelle (mémoire épigénétique) était peu importante dans ces variations [442, 443].

Un autre point majeur de discussion autour de l'utilisation d'iPSC est la différence de potentiel de différenciation avec les cellules ES. Une étude a montré que l'efficacité de la différenciation des iPSC humaines en cellules *Paired box 6 (PAX6)* positives

(lignage neural) varie de 10 à 50% en comparaison avec 90% d'efficacité avec les cellules ES [444]. Des études contradictoires rapportent une efficacité de différenciation similaire entre les iPSC et les cellules ES en neurones [445-447]. Ces observations contradictoires peuvent s'expliquer par la reprogrammation incomplète des cellules somatiques d'origine et par des différences de conditions de culture des iPSC entre les laboratoires de recherche [448, 449]. Une étude réalisée sur les cellules ES humaines montre que l'efficacité de différenciation dans la voie de l'endoderme augmente en fonction du passage en culture [450]. Une autre étude a rapporté que l'augmentation du passage en culture promeut la différenciation des iPSC dans la voie neuronale [451]. Ainsi, il semble crucial d'uniformiser les procédures de reprogrammation et de culture des iPSC afin de générer des données homogènes et éviter les biais dans les protocoles de différenciation.

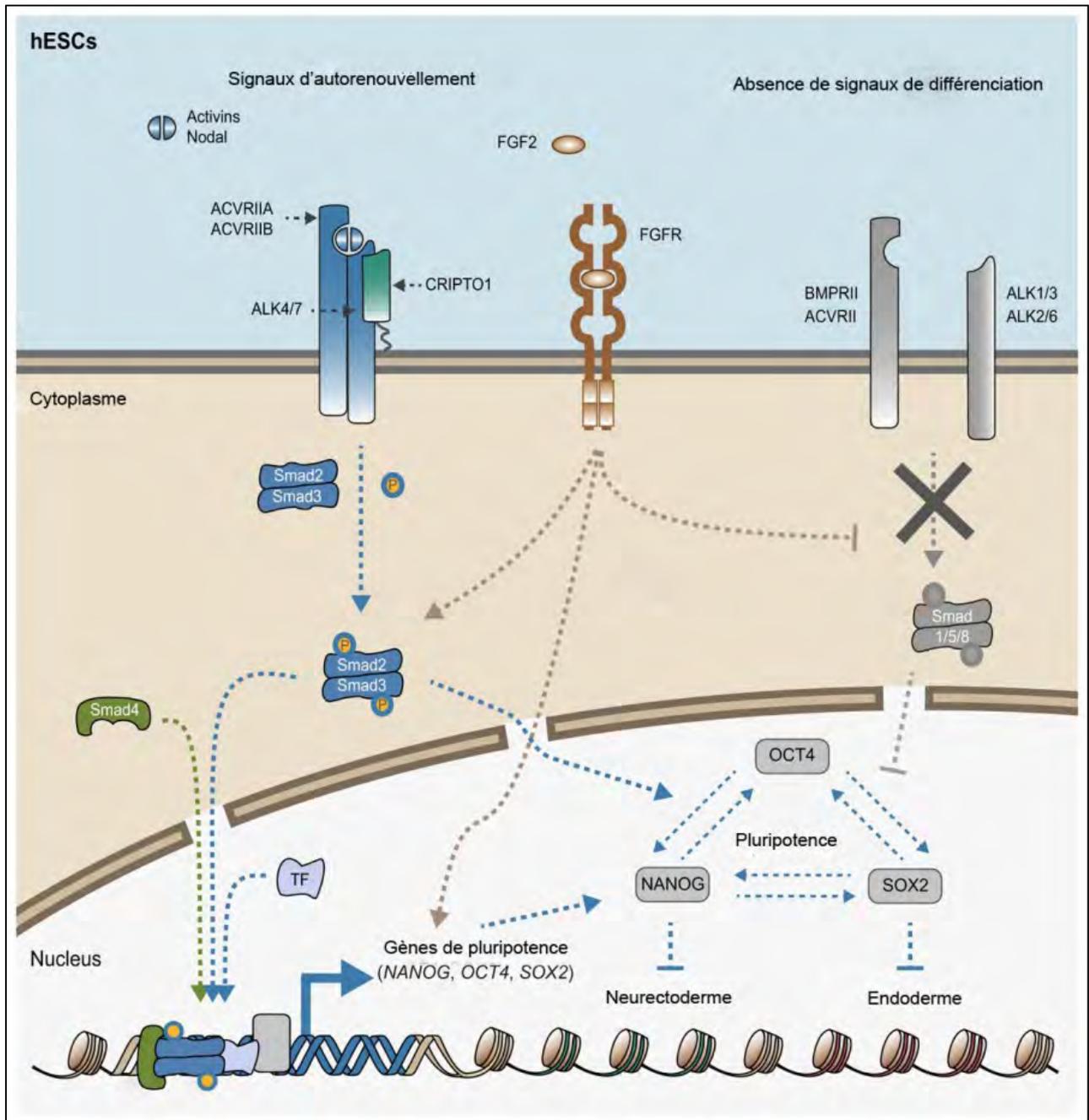


Figure 23 : Implication des voies TGF- β /Nodal/Activin et FGF dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires d'après Pauklin et Vallier, 2015 [452]. La transduction du signal TGF- β /Nodal/Activin est assurée par les effecteurs Smad2/3. Leur translocation au noyau induit la transcription des gènes NANOG, OCT4 et SOX2. Les protéines Smad2/3 peuvent également interagir physiquement avec OCT4 et NANOG pour réguler l'expression de gènes cibles. La voie FGF est également impliquée dans la régulation de l'expression des marqueurs de pluripotence [453]. Son activité renforce l'activité de la voie TGF- β /Nodal/Activin et active l'expression de NANOG et SOX2 de façon indépendante (voie effectrice ERK) [454, 455].

Maintien de la pluripotence

L'équilibre entre le maintien du statut indifférencié et la différenciation des cellules ES ou iPSC *in vitro* est très fragile. Ce maintien est assuré par une balance finement régulée de l'activation des voies TGF- β /Nodal/Activin et FGF assurant le maintien de l'expression de facteurs de transcription *NANOG*, *OCT4* et *SOX2* [456-462].

Le statut pluripotent des cellules ES ou iPSC est principalement maintenu par la voie Smad2/3 activée en réponse à l'apport exogène de TGF- β , Nodal ou Activin A [460, 463, 464] (Figure 23). L'importance de la voie Nodal a été également confirmée *in vivo*. En effet, l'inactivation de l'expression de Nodal chez des embryons de souris induit une diminution de l'expression précoce des marqueurs de pluripotence et une différenciation précoce de l'épiblaste en neurectoderme [465].

L'expression de *NANOG* n'est pas requise pour la reprogrammation des cellules somatiques en cellules pluripotentes. En revanche, l'expression de ce facteur de transcription maintient le caractère pluripotent, assure la prolifération des cellules pluripotentes en absence de cellules nourricières et réprime la différenciation des cellules ES humaines [466-468]. L'expression de *OCT4* assure le maintien du caractère pluripotent mais également la différenciation des cellules en progéniteurs de mésendoderme [469, 470]. Ces données mettent en évidence la régulation fine de son expression et de son activité de transcription assurant à la fois l'activation et la répression de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules pluripotentes. Enfin, l'expression de *SOX2* est requise pour la reprogrammation des cellules somatiques humaines et pour le maintien de leur caractère pluripotent [471]. Des interactions complexes de régulations entre ces facteurs assurent le maintien de la pluripotence. En effet, les facteurs *NANOG*, *OCT4* et *SOX2* peuvent former des complexes actifs de transcription tels que des complexes homodimériques *NANOG*-

NANOG, des complexes hétérodimériques OCT4-SOX2 et OCT4-NANOG [472-474]. Les facteurs OCT4 et SOX2 agissent de façon synergique et régulent leur propre expression ainsi que celle de NANOG [472, 475]. De façon très intéressante, un faible niveau d'expression du facteur OCT4 entraîne une augmentation de l'expression de NANOG tandis qu'un fort niveau de OCT4 induit une diminution de l'expression de NANOG [476]. La modulation de l'activité de transcription de OCT4 peut ainsi expliquer son rôle dans le maintien de la pluripotence et dans la différenciation de ces cellules.

De nombreux événements épigénétiques sont également impliqués dans le maintien de l'équilibre entre pluripotence et différenciation [477-480].

Différenciation des cellules pluripotentes

La différenciation des cellules ES ou iPSC dans les voies neurectoderme et mésendoderme est majoritairement régulée par l'activité des voies TGF- β /Nodal/Activin, FGF et Wnt. Au regard de l'origine embryonnaire du NP, seules les études de différenciation dans la voie mésendoderme seront présentées dans ce manuscrit. A notre connaissance, aucune étude n'a rapportée l'existence d'un protocole de différenciation de cellules ES ou iPSC humaines en cellules de notochorde.

La différenciation en endoderme ou mésoderme à partir des cellules ES ou iPSC humaines passe par la formation de progéniteurs de mésendoderme bipotents [39]. Ces cellules étant caractérisées principalement par l'expression de *FOXA2*, *T*, *GSC* et *MIXL1* sont générées en activant les voies TGF- β /Nodal/Activin et Wnt. Pour cela, l'utilisation de l'Activin A et du ligand Wnt3A a été rapportée [460, 481-483]. La différenciation de ces progéniteurs en endoderme requiert de fortes doses d'Activin A activant les effecteurs intracellulaires Smad2/3. Cette différenciation requiert

également l'expression du facteur de transcription *EOMES* [484-486]. L'engagement de ces progéniteurs dans la voie de l'endoderme dépend de l'inhibition de la Pi3K et de l'ajout de FGF2 et de BMP4 [487, 488]. L'ajout de BMP4 diminue fortement l'expression des marqueurs de pluripotence et permet ainsi une meilleure réponse des cellules à l'Activin A [489]. Des études récentes ont démontré que la stimulation des cellules avec l'agoniste CHIR99021 (agoniste de la voie Wnt/ β -Catenin : inhibiteur de la GSK3) était suffisante pour générer ces progéniteurs bipotents. La capacité de ces progéniteurs à se différencier en mésoderme et endoderme a été validée [469, 481, 490]. La spécification de ces progéniteurs en mésoderme paraxial a lieu par inhibition de la voie BMP et par ajout de FGF2 tandis que leur spécification en endoderme requiert uniquement l'ajout d'Activin A. La différenciation de ces progéniteurs en mésoderme axial ou en notochorde n'est pas élucidée.

Une étude rapporte la possibilité de générer des CNT à partir de cellules ES murines *Noto*^{GFP/+} [491]. Le protocole de différenciation repose sur l'inhibition des voies Wnt, de l'acide rétinoïque, des BMP et l'activation de la voie FGF. Ce protocole de différenciation permet de générer environ 10% de cellules exprimant *Noto*. Les cellules *Noto* positives expriment *FoxA2*, *T*, *Shh*, *Chordin*, *Noggin* et *FoxJ1*. Malgré ces résultats encourageants, la population de cellules *Noto* positive exprime également le facteur de transcription *Aristaless related homeodomain transcription factor (Arx)*, marqueur exprimé par les cellules du plancher du tube neural à partir de E8.0 [492, 493]. Ces observations montrent que la population générée par ce protocole de différenciation est très hétérogène. Cette étude a également montré que la surexpression de NOTO (transfection d'un plasmide d'expression) dans les cellules exprimant *FoxA2* et *T* avait un effet positif sur l'expression endogène de

NOTO (10% de cellules *Noto*^{GFP} après transfection contre 5% avant). Cette population cellulaire n'a pas été caractérisée dans cette étude.

En parallèle, une étude a montré la différenciation des iPSC murines en CNT [494]. Le protocole de différenciation est basé sur une première étape de différenciation spontanée des cellules sous forme de corps embryoides. La sélection des cellules CD24 positives a été réalisée. Ces cellules expriment les marqueurs de CNT embryonnaires *FoxA2*, *T*, *Noto*, *Shh* et *Noggin*. La deuxième étape du protocole est la différenciation des CNT en cellules produisant du collagène et de l'agrecane, similaires aux NPCytes. Pour cela, les cellules CD24 positives ont été cultivées en 3 dimensions dans du Matrigel et en présence de surnageant de CNT matures, isolées de jeunes cochons. Basés sur ces données encourageantes, la transposition de ce protocole aux iPSC humaines a été réalisée. Les CNT sélectionnées à la fin de la première phase du protocole ont été caractérisées uniquement par l'analyse de l'expression de *T*, *CYTOKERATIN 8* et *18* (*CK8*, *CK18*). Bien que ces marqueurs soient exprimés par les CNT matures, l'absence d'information sur l'expression de *FOXA2*, *NOTO* et *SHH* fragilise les résultats de cette étude. Néanmoins, la culture de ces cellules de type « CNT matures » en présence de composants de MEC du NP a entraîné leur différenciation en cellules produisant des PG et du collagène de type II [495].

La démonstration claire de la différenciation des cellules ES ou des iPSC humaines en CNT ou en cellules du NP n'est à ce jour pas établie.

3- Potentiel des cellules souches et stromales mésenchymateuses

La caractérisation des CSM et la définition de leurs capacités régénératrices ont été mises en évidence dans la moelle osseuse depuis les années 1960 [496-498]. Les critères minimaux définissant les CSM ont été précisés en 2006 [499] :

- Les CSM sont adhérentes ;
- Les CSM sont douées de capacité d'autorenouvellement ;
- Les CSM ont un phénotype immun spécifique : elles expriment les récepteurs membranaires CD90, CD73 et CD105 et sont négatives pour les CD34 et CD45 ;
- Les CSM sont capables de se différencier dans la voie adipo-, ostéo- et chondro-génique, attestant leur caractère multipotent.

Après la découverte des CSM au sein de la moelle osseuse, des cellules stromales mésenchymateuses ont été isolées à partir de tissu adipeux, du derme de la peau, du liquide synovial, de la membrane synoviale, du cordon ombilical, du placenta et du liquide amniotique. Le nombre de cellules stromales mésenchymateuses varie de 0.002% pour le liquide synovial, et 0.01% pour la moelle osseuse à 2% pour le tissu adipeux [500-503]. Les cellules stromales issues de ces différentes sources présentent des variations dans l'efficacité de leur engagement dans les voies adipo-, ostéo- et chondrogéniques. En effet, les CSM issues de la moelle osseuse présentent une capacité à s'engager dans les voies ostéo- et chondro-géniques supérieure aux cellules stromales adipeuses (CSA) [504]. Il est également rapporté que les CSM de moelle osseuse ont une propension à se différencier en chondrocytes hypertrophiques plus importante que les CSA [505, 506]. Ainsi, l'accessibilité des CSA, leur nombre important au sein du tissu adipeux et leur faible capacité de différenciation hypertrophique rend leur utilisation particulièrement attractive pour la médecine régénératrice du DIV.

La présence de CSM dans la plupart des organes est potentiellement due à une origine péri-vasculaire.

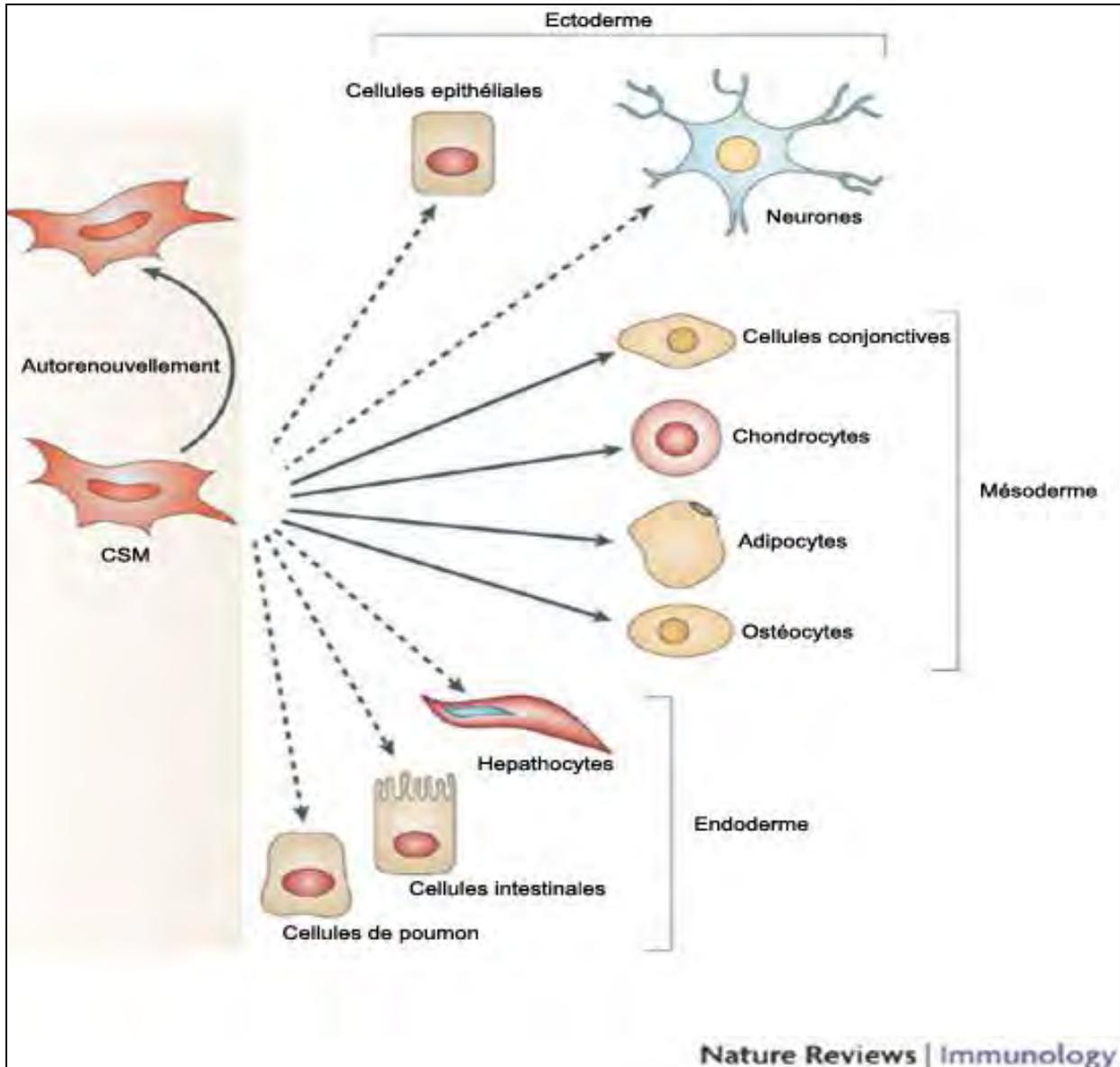


Figure 24: Capacités de différenciation et transdifférenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) modifiée d'après Ucelli, 2008 [507]. Les MSC sont issues du mésoderme latéral [508] et ont la capacité de se différencier en cellules également issues du mésoderme latéral (chondrocytes, ostéocytes, adipocytes). Les CSM présentent également la capacité de se transdifférencier en cellules issues de l'endoderme et de l'ectoderme.

Ces cellules périvasculaires donnent naissance à des progéniteurs multipotents de type CSM exprimant les marqueurs de surface principaux CD73, CD105 et CD90 et négatives pour CD34 et CD45 [509, 510]. Leur capacité à se différencier dans les voies adipo-, ostéo- et chondro-géniques atteste leur propriété de multipotence.

Les CSM sont également capables de générer des cellules provenant de l'endoderme et de l'ectoderme (Figure 24). Ces processus de différenciation attestent de leur capacité à se transdifférencier, ouvrant ainsi de plus larges perspectives de traitement. En effet, l'utilisation des CSM n'est plus seulement envisagée pour régénérer les tissus d'origine mésodermique mais également les tissus d'origine neurectodermique ou endodermique [511, 512]. La capacité des CSM à se différencier en cellules du NP a fait l'objet de deux études ayant rapporté un potentiel effet du GDF5 [513, 514].

Les CSM sont également capables de moduler la réponse inflammatoire au sein d'un tissu par la sécrétion de molécules anti-inflammatoires (TNF-stimulated gene 6 protein TGS-6, IL-6, IL-10, Prostaglandine E2 PGE-2...) [515]. La capacité des CSM à restaurer la fonction d'un tissu repose également sur leur capacité à produire des facteurs de croissance et des facteurs trophiques capables de mobiliser des cellules des tissus environnants [57, 516, 517]. Ces propriétés sont d'ailleurs exploitées dans le cas des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn [518-520] ou encore des maladies dégénératives dont la composante inflammatoire est majeure telles que l'arthrose et certaines maladies neurodégénératives (sclérose en plaque) [521, 522]. Ces propriétés immunomodulatrices en font également des cellules candidates pour la régénérescence du DIV.

Tableau III: Thérapie cellulaire du disque intervertébral d'après Sakai, 2015 [243]. Tableau résumant les études cliniques basées sur l'utilisation des cellules souches/stromales mésenchymateuses non différenciées. X : les études sont en cours, les résultats ne sont pas encore publiés

Source de CSM	Nombre d'essai	Modalité d'injection	Nombre de patients inclus	Effets thérapeutiques	Références
Cellule souches hématopoïétiques	1	Autologue	10	Aucun	[523]
Cellules souches de la moelle osseuse	2	Autologue	12	Amélioration du signal discal à l'IRM Diminution de la douleur	[524, 525]
Concentré de moelle osseuse	1	Autologue	26	Amélioration du signal discal à l'IRM Diminution de la douleur	[526]
Cellules stromales du cordon ombilical	1	Allogénique	2	Diminution de la douleur	[527]
Cellules souches de la moelle osseuse	1	Allogénique	24	x	NCT01860417
Cellules stromales adipeuses	2	Allogénique	estimé à 100, estimé à 8	x	NCT01643681 NCT02097862

Malgré des avancées majeures concernant l'utilisation des CSM pour la restauration du tissu discal chez l'homme, peu d'informations sur l'implication de leurs propriétés immunomodulatrices sont rapportées.

Etudes pré-cliniques et cliniques

Les premiers effets de CSM non différenciées de moelle osseuse sur le tissu discal ont été rapportés en 2003 chez le lapin. En effet, l'injection de CSM au sein de DIV dégénérés a démontré un ralentissement du processus de dégénérescence discale en maintenant des niveaux de PG comparables aux DIV sains jusqu'à 8 semaines après injection [528]. Suite à ces résultats encourageants, d'autres études précliniques ont été réalisées utilisant différents modèles animaux et différentes sources de cellules stromales mésenchymateuses. L'ensemble de ces études a récemment fait l'objet d'une revue [243]. Suite aux résultats encourageants de ces études pré-cliniques, des essais cliniques ont été réalisés dont certains sont encore en cours (Tableau III). Alors que la diminution de la douleur est rapportée dans la majeure partie des cas cliniques, la hauteur discale est rarement rétablie. Enfin, l'utilité des CSM en médecine régénératrice du DIV n'est pas encore prouvée compte tenu de l'absence de comparaison des DIV injectés et des DIV sains. La majeure partie de ces études a été réalisée avec des CSM de moelle osseuse. Compte tenu de la facilité d'utilisation des cellules stromales du tissu adipeux et de leur proportion importante au sein de ce tissu, les résultats des études cliniques utilisant cette source cellulaire sont très attendus. L'ensemble de ces études a été réalisé avec des cellules souches non différenciées. Les effets bénéfiques de CSM non différenciées sur la synthèse de composants matriciels par les NPCytes ont été démontrés *in vitro*. De plus, la différenciation des CSM en NPCytes n'a pas été formellement établie.

Grâce aux études pré-cliniques et aux données histologiques, la migration des CSM dans l'AF après transplantation a été rapportée chez le rat, le lapin et le cochon [529-531]. La différenciation préalable des cellules à leur transplantation permettrait-elle leur ancrage au sein du NP ? La régénérescence du tissu serait-elle plus efficace ? Ces questions restent pour l'instant sans réponse.

Mécanismes de régénérescence activés par les cellules souches/stromales mésenchymateuses

La co-culture de cellules souches/stromales mésenchymateuses de liquide synovial, de cordon ombilical, de moelle osseuse ou de tissu adipeux avec des cellules du NP (cochon, homme et rat) entraîne l'expression de collagène de type II, d'agrécan et de Sox9 par les cellules souches/stromales [532-535]. Cette observation a été confirmée *in vivo* après injection intradiscale de CSM de moelle osseuse d'origine humaine ou de lapin chez le cochon et chez le lapin [536-538]. Ceci indique que les CSM sont capables de se différencier en présence de facteurs sécrétés par les cellules du NP. Cependant, l'expression de marqueurs spécifiques du NP tels que *PAX1*, *OVOS2*, *CA12* ou *CD24* par ces CSM différenciées n'a pas été rapportée. Il est donc difficile de conclure quant à leur différenciation en NPCytes. L'activité de sécrétion des cellules chondrogéniques étant différente de celle des NPCytes illustrée par le ratio agrécane/collagène de type II égal à 3 pour le cartilage et à 20 pour le NP, la présence de cellules de type chondrogéniques au sein du NP pourrait compromettre la restauration d'une MEC adaptée.

En plus d'une potentielle différenciation *in vivo* des cellules souches/stromales mésenchymateuses en présence de cellules de NP, les CSM sécrètent des facteurs trophiques [539, 540]. Le rôle de ces facteurs trophiques a été mis en évidence sur les cellules du NP par des expériences de co-culture de cellules souches/stromales

mésenchymateuses humaines avec des cellules du NP provenant de NP humains dégénérés. Ces études rapportent une stimulation de la prolifération des cellules du NP, une augmentation de l'expression de Sox9, d'agrécan et de collagène de type II accompagnée d'une augmentation d'expression des facteurs TGF- β 1, GDF5 et CTGF [541, 542]. De plus, la présence des CSA protège les cellules du NP de l'apoptose en inhibant l'activation des caspases 3 et 9. La diminution de l'expression des MMP3 et MMP13 accompagnée de la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α , est également rapportée [543]. Ces effets bénéfiques relatifs à l'activité paracrine des CSM ont également été démontrés par un mécanisme de contact cellulaire entre des CSM humaines de moelle osseuse et des cellules du NP d'origine autologue [544, 545].

L'ensemble de ces résultats démontre l'effet protecteur des CSM de moelle osseuse et de tissu adipeux sur les cellules du NP.

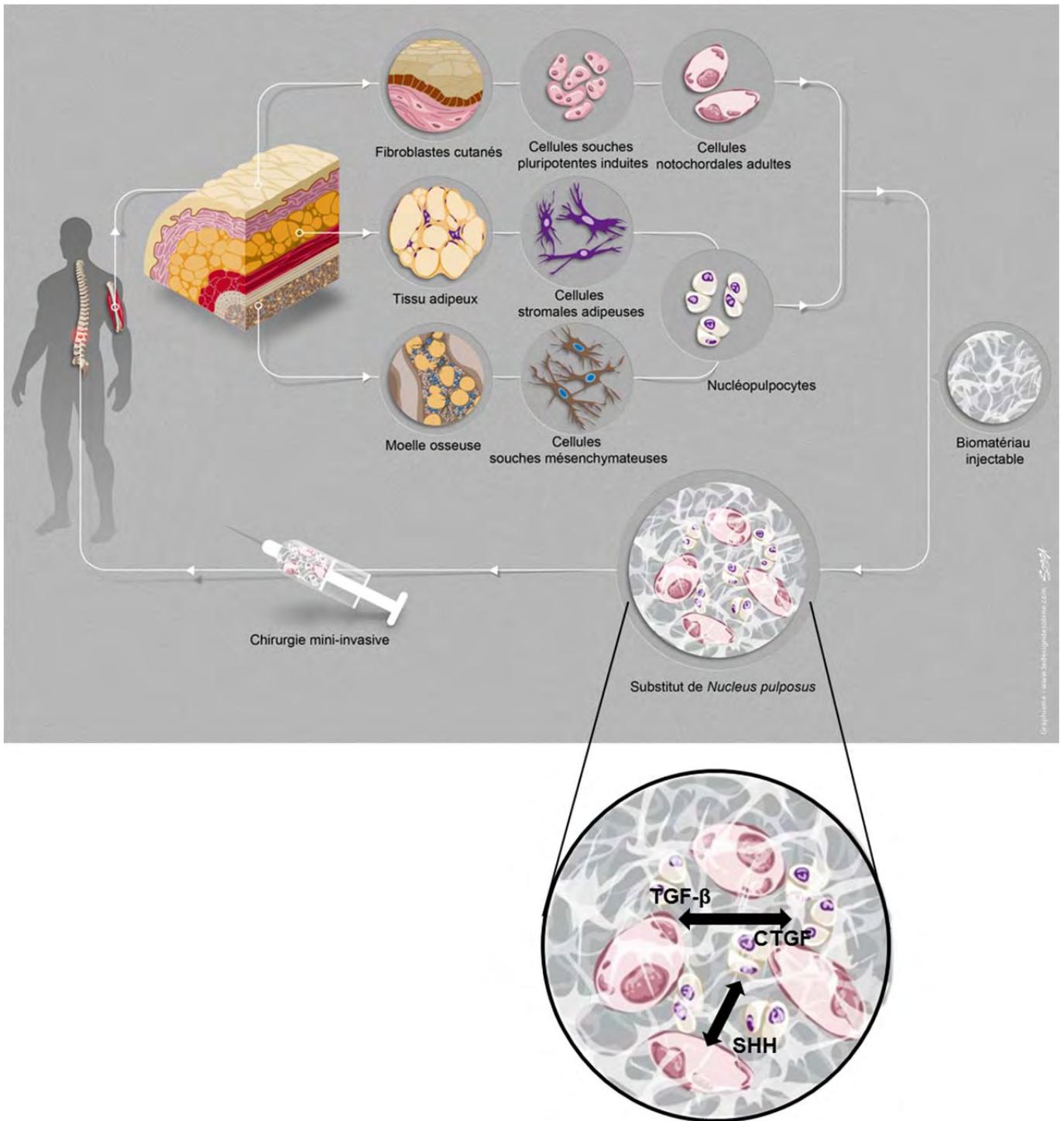


Figure 25 : Stratégie de médecine régénératrice du disque intervertébral modifiée d'après Colombier, 2014 [9]. Cette approche consiste en la différenciation de cellules souches pluripotentes induites en cellules notochordales et de cellules souches mésenchymateuses (tissu adipeux ou de la moelle osseuse) en nucléopulpcytes. L'objectif final est d'associer ces deux types cellulaires à un biomatériau adapté injectable afin de restaurer le dialogue moléculaire entre les CNT et les NPCytes. Enfin, ce substitut de Nucleus pulposus sera injecté au sein des DIV dégénérés par une approche chirurgicale mini-invasive.

III- Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'établir les modalités de différenciation de cellules souches humaines en cellules du NP. Il s'agira de produire à la fois des CNT (objectif 1), clés dans l'homéostasie du NP et les NPCytes (objectif 2), responsables de la synthèse de MEC. Cet objectif s'intègre dans une stratégie de médecine régénératrice du DIV développée par le laboratoire INSERM UMR5791 (Figure 24). L'intérêt de cette approche est de rétablir le dialogue moléculaire au sein de NP dégénérés assurant ainsi une régénérescence à long terme du tissu discal. L'injection intradiscale de ces deux types cellulaires permettrait de compléter le NP en cellules régénératrices capables de rétablir le dialogue moléculaire et ainsi restaurer les fonctions du NP à long terme.

Pour répondre à l'objectif 1, nous nous sommes dans un premier temps interrogés sur la source cellulaire à utiliser pour générer des CNT. Etant donné qu'aucune étude ne rapporte la possibilité de générer des CNT à partir de CSM ou de CSA, nous avons décidé d'utiliser des cellules iPSC et de transposer les connaissances relatives à la formation de la notochorde chez l'embryon de souris à ce modèle *in vitro*. Ainsi, l'effet de l'activation des voies de signalisation Nodal et Wnt sera étudié dans la différenciation notochordale des iPSC. Le rôle du facteur de transcription NOTO sera également étudié au regard sa spécificité et de son rôle au sein du lignage notochordal. Enfin, nous évaluerons la stabilité du phénotype des cellules générées à partir des iPSC.

Pour répondre à l'objectif 2, qui porte sur la génération de NPCytes, nous avons étudié le potentiel des CSA à se différencier dans la voie nucléopulpogénique. En effet, les mécanismes à l'origine de l'apparition des NPCytes à partir des CNT matures ou d'un autre type cellulaire étant méconnus à ce jour, nous nous sommes

intéressés aux propriétés des CSA à se différencier en cellules de type chondrogéniques, produisant du collagène de type II et de l'agrecane. La modulation de cette différenciation pourrait permettre de générer des cellules de type NPCytes. Nous évaluerons ainsi la potentielle différenciation nucléopulpogénique des CSA en présence des facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF5, impliqués dans l'activité anabolique des NPCytes *in vivo*. Nous étudierons leur capacité à produire de la MEC similaire à celle du NP dans un modèle de transplantation sous-cutanée chez la souris *nude*. Enfin, l'implication des voies de signalisation activées par ces différents facteurs au cours de la différenciation des CSA en NPCytes sera décrite.

PARTIE II

CONTRIBUTION A LA MEDECINE REGENERATRICE DU DIV : DIFFERENCIATION NOTOCHORDALE ET NUCLEOPULPOGENIQUE DE CELLULES SOUCHES HUMAINES

IV- Différenciation notochordale des cellules souches pluripotentes induites humaines

A- Rationnel de l'étude

Compte tenu de l'importance des CNT matures dans l'homéostasie du NP, il semble essentiel de pouvoir disposer de ces cellules pour la régénérescence du NP. Chez l'homme, les CNT matures sont retrouvées dans les DIV jeunes sauf cas pathologique rare. Des tumeurs vertébrales malignes rares, appelées chordomes, se développent en effet à partir de CNT qui persistent au sein des corps vertébraux durant la formation du squelette axial [546]. Bien que certaines caractéristiques de CNT soient conservées, comme l'expression du marqueur *Brachyury (T)*, cette source de CNT n'est malheureusement pas envisageable pour la régénérescence discale au regard de leur caractère tumoral [547, 548]. La différenciation de cellules souches humaines en CNT matures est alors le seul moyen de produire ce type cellulaire. L'utilisation des cellules ES humaines étant limitée en France, nous nous sommes tournés vers l'utilisation des iPSC.

A notre connaissance, seulement une étude a rapporté la formation d'une population de type « organisateur EGO-MGO-nœud » à partir de cellules pluripotentes humaines différenciées spontanément sous forme de corps embryoides [549]. Cependant, la différenciation de ces cellules dans ce système est hétérogène et peu contrôlée. Dans le but de générer une population de CNT la plus homogène et pure possible, l'établissement d'un protocole de différenciation à partir de cellules en monocouche semble être une stratégie plus appropriée.

De plus, l'établissement d'un tel protocole pourrait permettre de définir précisément les mécanismes moléculaires impliqués à la fois dans la spécification du lignage

notochordale mais également dans la mise en place du NP. Par exemple, la chute de l'expression des facteurs de transcription FoxA2 et Noto dès le début de la transformation de la notochorde en NP (E12.5) représente probablement une étape clé dans la mise en place des NP. Cependant, aucune information sur cette étape n'est rapportée chez l'homme de par le manque de modèle cellulaire approprié.

Le développement de ce protocole de différenciation repose sur les connaissances fondamentales sur la formation de la notochorde chez l'embryon de souris et les propriétés des cellules iPS. Les progéniteurs du lignage nœud/notochorde sont doubles positifs pour FoxA2 et T. Au regard de la différenciation effective des cellules pluripotentes humaines (cellules ES ou iPSC) en cellules doubles positives pour FoxA2 et T (progéniteurs de mésendoderme) [460, 481-483], la génération de ces progéniteurs et leur différenciation en CNT semble être une stratégie envisageable. Les études réalisées sur la génération de ces progéniteurs de mésendoderme à partir de cellules ES ou iPSC se sont focalisées sur leur devenir en endoderme ou mésoderme. Ce qui peut être une explication à l'absence de données relatives à l'expression de marqueurs spécifiques de la notochorde. Nous avons ainsi étudié le rôle de la voie TGF- β /Nodal/Activin et Wnt sur l'engagement des iPSC en progéniteurs de mésendoderme mais également en cellules du nœud afin de définir la population progénitrice générée. Les voies Wnt et Shh sont cruciales pour l'élongation et le maintien du phénotype notochordale *in vivo* [160]. Enfin, la voie FGF est impliquée dans la postériorisation des structures embryonnaires et l'élongation de l'axe antéro-postérieur [179, 550-552].

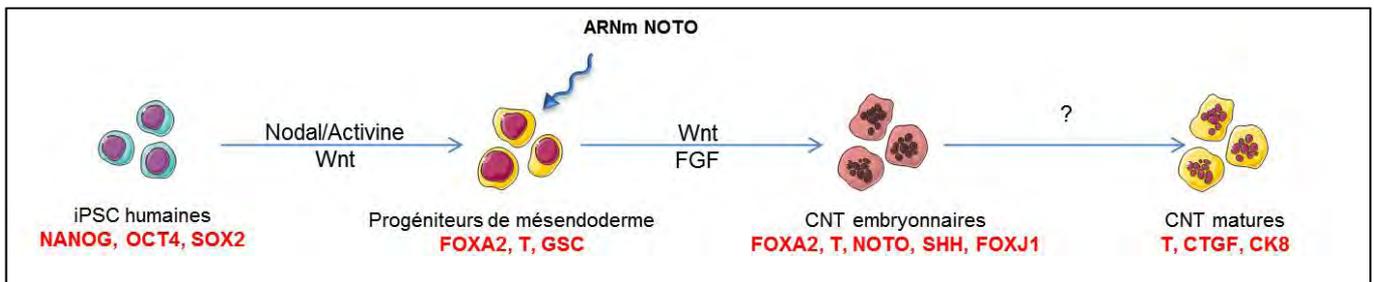


Figure 26: Stratégie de différenciation des cellules pluripotentes induites humaines (iPSC) en cellules notochordales (CNT). La différenciation des iPSC en progéniteurs de mésendoderme est contrôlée par l'activation des voies de signalisations Nodal/Activine et Wnt. La surexpression de NOTO par les progéniteurs de mésendoderme est assurée par transfection d'ARNm synthétiques. L'implication des voies de signalisation Wnt et FGF dans la différenciation notochordale des progéniteurs sera investiguée.

Nous avons ainsi défini une stratégie basée sur la différenciation des progéniteurs de mésendoderme en cellules du mésoderme axial antérieur. L'activation des voies Wnt et FGF permettrait de modifier leur caractère antérieur et générer des cellules du mésoderme axial de type postérieur, c'est-à-dire de notochorde. En parallèle, le facteur de transcription Noto étant clé dans la formation de la notochorde chez la souris, nous avons étudié son rôle potentiel dans la différenciation notochordale humaine. Pour cela, une surexpression de NOTO a été réalisée par transfection d'ARN messagers (ARNm) synthétiques (Figure 26). L'objectif final de cette étude est la production de CNT matures capables de stimuler les NPCytes et de restaurer le dialogue moléculaire responsable de l'homéostasie du NP. A l'heure actuelle, les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de cette maturation ne sont que partiellement élucidés dans la littérature.

Cette partie de ces travaux ont permis de définir les modalités de différenciation des iPSC en CNT embryonnaires et fait l'objet d'un article en préparation **Article III :**

Noto transcription factor directs human iPSC mesendoderm progenitors to a notochordal fate. P. Colombier, C. Chédeville, J. Clouet, C. Chariou, L. Lescaudron, L. David, J. Guicheux, A. Camus. En preparation

B- Article III

ARTICLE III **Noto transcription factor directs human iPSC mesendoderm progenitors to a notochordal fate.**

**P. Colombier, C. Chédeville, J. Clouet, C. Chariou, L. Lescaudron, L. David, J.
Guicheux, A. Camus.**

(En préparation)

Résumé

La notochorde est à l'origine de la formation des Nuclei pulposi (NP), parties centrales des disques intervertébraux (DIV). Au cours de la croissance, les cellules notochordales adultes, considérées comme les cellules progénitrices du NP, disparaissent progressivement. Cette disparition entraîne à terme la dégénérescence du NP. Afin de comprendre les mécanismes à l'origine de la formation des NP et de leur dégénérescence, nous avons développé un protocole de différenciation de cellules pluripotentes induites humaines en cellules notochordales. Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle des voies de signalisation Nodal, Wnt et FGF et du facteur de transcription NOTO dans la formation de progéniteurs de mésendoderme et dans leur différenciation en notochorde. Nous avons démontré que l'activation des voies Nodal et Wnt entraîne la formation de progéniteurs de mésendoderme et que leur différenciation en cellules notochordales était contrôlée par le facteur NOTO. Nous avons démontré que la formation d'un complexe protéique FOXA2/T/NOTO a lieu durant ce processus de différenciation notochordale. Enfin, nous avons démontré que l'activité de la voie Wnt maintient l'identité des cellules notochordales dérivées de cellules pluripotentes induites humaines. Nous avons ainsi établi un modèle *in vitro* de formation de cellules notochordales embryonnaires humaines à partir de cellules souches pluripotentes. Ce modèle offre de nombreuses perspectives dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la maturation et différenciation des cellules notochordales embryonnaires.

Noto transcription factor directs human iPSC mesendoderm progenitors to a notochordal fate

Pauline Colombier^{1,2}, Claire Chédeville^{1,2}, Johann Clouet^{1,2,3,4}, Caroline Chariou⁵, Laurent Lescaudron^{1,2,6}, Laurent David^{5,7}, Jérôme Guicheux^{1,2,8*}, Anne Camus^{1,2*}.

Affiliations :

¹INSERM UMRS 791, Laboratoire d'Ingénierie Osteo Articulaire et Dentaire (LIOAD).

²Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes. ³Université de Nantes, UFR

Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Nantes. ⁴CHU Nantes, Pharmacie

Centrale, PHU 11, Nantes. ⁵INSERM UMS016, CNRS UMS 3556, SFR santé,

Plateforme iPSC, Université de Nantes. ⁶Université de Nantes, UFR Sciences et

Techniques, Nantes. ⁷INSERM UMRS1064-ITUN, Institut de Transplantation en

Urologie et Néphrologie, Université de Nantes. ⁸CHU Nantes, PHU 4 OTONN,

Nantes. * Authors equally contributed to this work.

Introduction

The posterior axial mesoderm, also called the notochord, is a transient signaling structure involved in dorso-ventral regionalization of the overlying neural tube and in the patterning of adjacent somites. Through the secretion of Shh and Noggin, the notochord induces the condensation and differentiation of surrounding mesenchymal cells to form the future vertebrae and *Annulus fibrosus*, the peripheral part of the intervertebral disc (IVD) [1-4]. During organogenesis, notochord cells (NTC) accumulate in the presumptive intervertebral region and vanish from the future vertebral body [5, 6]. Lineage tracing studies demonstrated that NTC are the founder cells of the adult *Nucleus Pulposus* (NP), the central part of the IVD [7, 8]. After birth, mature NTC found in the adult NP are considered as the regulators of its homeostasis [9-11]

During gastrulation, the primitive streak (PS) forms at the posterior end of the embryo. Epiblast cells undergo an epithelial-mesenchymal transition (EMT), ingress into the PS and later emerge from it as two distinct germ layers, the mesoderm and the endoderm [12]. The primitive streak cells are characterized by the expression of *Brachyury (T)*, *Mixl1* and *Eomes* [13-15]. Fate mapping and genetic studies have demonstrated that axial mesoderm distinguishes from pan-mesoderm since it arises from the organizer of the gastrula embryo. Indeed, axial mesoderm progenitors are located within three temporally distinct organizer regions depending on their final contribution to different antero-posterior (A-P) segments [16, 17]. Descendant cells of the Early Gastrula Organizer (EGO) located anterior to the nascent PS at E6.5 and the Mid Gastrula Organizer (MGO) located at the anterior part of the PS at E7.0 give rise to the anterior axial mesoderm (*Gooseoid (Gsc)*-expressing prechordal mesoderm) but also contribute to the axial mesoderm at all levels of the A-P axis. At

E7.5, the Node is positioned anterior to the PS and comprises inherited cells from the EGO and the MGO. Node descendant cells give rise exclusively to posterior axial mesoderm (expressing the notochord-related markers *FoxA2*, *T*, *Noto*, *Shh*, *Noggin*, *Chordin* and *Sox9*) [18-23]. The EGO is delineated by the expression of *Gsc*, *Forkhead box A2 (FoxA2)* and *Notochord homeobox (Noto)* [18, 24], and the MGO by the combination of the former three, *Noggin* and *Chordin* [19] while the Node is defined by the expression *FoxA2*, *T*, and *Noto* [18, 25]. According to its highly specific expression, the marker *Noto* conveniently delineates organizer regions where axial mesoderm progenitors are found at all developmental stages and later node-derived axial mesoderm cells [8, 26].

Although the invalidation of *Noto* gene results in moderate defects in node and tail notochord formation in mouse, *floating head* (*Noto* homolog) mutation in zebrafish embryos leads to a complete lack of axial mesoderm which is replaced by paraxial mesoderm [18, 27, 28]. Consistent with this finding, cell-tracking study in the mouse embryo invalidated for *Noto* provided evidence for a change in cell fate [17]. Mutant cells had lost the expression of *FoxA2* and *T* and were found mis-sorted into the paraxial mesoderm demonstrating that, in the mouse, *Noto* also play a role in the maintenance of notochordal identity.

Numerous studies demonstrated the involvement of the Nodal and Wnt/ β -Catenin signaling pathway in the formation of the anterior primitive streak (APS) derivatives including the definitive endoderm and the node/notochord [29-35]. Other studies support a role Wnt and Shh in the maintenance of the notochordal lineage during axis elongation. TOPGAL reporter transgenic embryos exhibit a strong Wnt signaling activity in the node and tail notochord from E8.5. In addition, the conditional inactivation of β -catenin in *Noto*-expressing cells leads to a downregulation of *T* and

Shh expression and defects in the notochord maintenance and elongation [36]. A similar phenotype is observed when conditional inactivation of *Shh* in notochord is performed is correlated with the decrease of *T* and *FoxA2* expression [7]. Finally, the role of Fibroblast Growth Factor (FGF) signaling pathway is involved in node morphogenesis. *Fgf8*^{-/-} mutant mouse embryos fail to form the anterior axial mesoderm even though *FoxA2*, *Gsc* and *Shh* expression is detected in APS. These findings suggest that FGF activity is required for the anterior migration of the axial mesoderm progenitors derived from the EGO and MGO [37].

The differentiation of embryonic stem (ES) cells represents an attractive model for dissecting early lineage commitment. Two studies reported the differentiation of mouse pluripotent stem cells toward notochord lineage. Using a differentiation protocol based on the inhibition of Wnt, Retinoic acid and BMP pathways and the activation of FGF pathway, one study reported the formation of a discrete population of *Noto*-positive cells and demonstrated that the transfection of *Noto* slightly extended the population. However, notochord-like cells could not be maintain over longer culture period and the detection of the floor plate marker *Arx* argues against the generation of bona fide notochord cells [38]. Another study showed that embryoïd bodies (EB) formation from mouse induced pluripotent stem cells produced CD24 positive cells that exhibit notochordal character [39]. However, similar conclusion could not be made with CD24 positive cells isolated from EB formed with human induced pluripotent stem cells [40]. The expression and the role of NOTO in human notochord formation *in vivo* or in stem cell model *in vitro* has not been reported yet.

The generation of NTC from human pluripotent stem cells is a pertinent model to understand the molecular and cellular mechanisms of notochord formation in human and to study the biology of the founder cells and regulators of the NP. In this context,

we investigated how Nodal, Wnt and FGF signaling pathways could influence hiPSC differentiation and trigger the emergence of node/notochord lineage. In addition, we assessed the role of NOTO in the notochord specification of hiPSC. We showed that the generation of human node/notochord-like cells is not achievable by modulating signaling pathways involved in the specification of this lineage in other vertebrate models. By using synthetic mRNA encoding for NOTO, we demonstrated that hiPSC differentiate towards a phenotypically stable NTC-like population. The presence of NOTO ensures the formation of NTC-like cells by maintaining FOXA2 and T physical interactions.

Results

Wnt and Activin/Nodal signaling pathways influence the commitment of hiPSC towards mesendoderm progenitors

To study how Wnt and Nodal activities regulate hiPSC differentiation *in vitro*, we cultured these cells in the presence of increasing doses of CHIR99021 (CHIR) (Figure 1A) and increasing doses of Activin A for 24 h or 48 h (Figure 1E). CHIR is an inhibitor of glycogen synthase kinase (GSK-3). In turn, GSK-3 inhibition leads to the stabilization of the Wnt intracellular signal transducer β -catenin, and the regulation of target genes, such as *LEF1* and *NODAL* as shown in previous studies using human embryonic stem cell model [41, 42]. Expression analysis of induced hiPSC revealed that increasing doses of CHIR resulted in increased transcription of *LEF1* (Figure 1B). Differentiation was attested by the decreased expression of the pluripotency marker *SOX2* after 24 h of CHIR treatment with both intermediate and high concentrations (3 and 6 μ M; Figure S1A). This was followed by a decrease in *NANOG* and *POU5F1* expressions at 48h of CHIR treatment. Drastic reduction of *NANOG*

and *SOX2* were only observed at 48h with the highest concentration of CHIR (6 μ M). Following a 48 h induction period, intermediate CHIR concentration (3 μ M) induced hiPSC to express high level of *NODAL* and primitive streak markers *BRACHYURY* (*T*), *MIXL1* and *EOMES*. In this condition, differentiated cells adopted an APS-like identity as demonstrated by the high levels of expression of the anterior PS markers *FOXA2* and *GSC*, which are also typical mesendoderm markers.

The marker *CERBERUS1* (*CER1*), transiently expressed in the definitive endoderm emerging from the APS in the mouse embryo (E7.5) [43] was also found increased after 24 h and 48 h of 3 μ M CHIR treatment [44]. A different outcome was observed when hiPSC were treated with the highest CHIR concentration. This condition promoted the acquisition of a Posterior PS-like identity as shown by the elevated level of expression of *T* and *MIXL1* and conversely low levels of *NODAL*, *FOXA2*, *EOMES* and *CER1* expressions. Notably, the expression of the pan-neural marker *SOX1* and the floor plate marker *ARX* were not detected following a 48 h induction period with 3 μ M and 6 μ M CHIR (data not shown). Immunostainings for *FOXA2* and *T* showed that after 24h of CHIR treatment, cells were mainly positive for *T* staining indicating that this committed state may correspond to an early PS stage *in vivo* (Figure S1B). Consistent with RT-qPCR results, 48 h of 3 μ M CHIR treatment scored 70% of cells positive for both *FOXA2* and *T* stainings whereas only 1% of double positive cells were scored after 6 μ M CHIR treatment (Figure 1C, 1D). This last condition triggers commitment towards mesoderm progenitors as demonstrated by the widespread *T* staining at 48h (99% of the population). In summary, *FOXA2* and *T* immunostaining analysis demonstrated that CHIR treatment (above 1 μ M) is sufficient to induce differentiation of hiPSC as shown by the score of less than 5% unstained cells. Intermediate dose of CHIR (3 μ M) promoted the emergence of mesendoderm

progenitors whereas higher doses of CHIR favored the generation of mesoderm progenitors (Figure S1C).

We next investigated the differentiation outcome of additional stimulation such as exogenous activation of Nodal signaling pathway. Human iPSC were stimulated by 3 μ M CHIR and increasing doses of Activin A for 48 h (Figure 1E). A fourth condition was tested to assess the length of exposure to stimuli. In this case, hiPSC were stimulated with 3 μ M and 2ng/ml Activin A for 24 h to compare with that of 48 h condition. After 48h of stimulation, similar expression of *LEF1*, *LEFTY1* and *NODAL* were observed indicating that the addition of 2, 5 or 10ng/ml Activin A did not change the level of activity of Wnt and Nodal signalings (Figure 1F). However, a shorter stimulation period (24h) resulted in apparently lower Wnt signaling activity but high Nodal signaling activity. The expression of the PS (*T*, *MIXL1*, *EOMES*) and mesendoderm markers (*FOXA2*, *GSC*) was found unchanged after 48 h of increasing doses Activin A stimulation. In contrast, *CER1* expression increased with greater concentration of Activin A. The expression of pluripotency markers *NANOG* and *SOX2* was found reduced while *POU5F1* expression was unchanged in these conditions (Figure S1D). Interestingly, the reduction of the stimulation period led to a decrease in levels of *T* and *MIXL1* expression while the expression of *EOMES*, *FOXA2* and *GSC* was found unchanged (Figure 1F). High level of *CER1* expression was also observed in this condition. Thus, a short stimulation period of 24h triggers hiPSC commitment toward endoderm progenitors expressing high levels of *FOXA2* and *CER1* and low level of *T*. *FOXA2* and *T* immunostainings showed that at 24 h, cells were predominantly positive for *T* staining (Figure S1E). Remarkably, at 48 h, the number *T/FOXA2* double positive cells lowered from 44% to 30% with increasing doses of Activin A (Figure 1G, 1H). A range of 10 to 14% of cells was found

unstained in any of these conditions. Shorter length of exposure to stimulation resulted in a small number of T/FOXA2 double positive cells (6%) and a relatively high number of FOXA2 single positive cells (53%) consistent with the apparent commitment toward endoderm progenitors revealed by quantitative gene expression analysis. Interestingly, 38% of cells were found unstained in this last condition indicating that the differentiation of hiPSC stimulated during 24 h is less efficient as also revealed by the persistence of high levels of expression of the pluripotency markers (Figure S1D).

The FGF signaling pathway is required for effective EMT and involved in the formation of different mesoderm subtypes in mouse embryo or in mouse ES differentiation, in particular in determining cellular fate of the future node [37, 45, 46]. Thus, we investigated whether the addition of FGF would influence the differentiation of the iPSC. To address this question we cultivated hiPSC with 3 μ M CHIR, 6 μ M CHIR and 2ng/mlActA+3 μ M CHIR for 48 h with or without the addition of FGF2 (Figure S1F, S1G and S1H). Expression analysis of *SPRY1*, a direct target gene and antagonist of FGF, revealed that FGF signaling pathway is active in undifferentiated cells because of the presence of FGF2 in the culture media, and during the course of differentiation upon CHIR stimulation. The increasing doses of FGF2 did neither affect the level of expression of *SPRY1* nor the expression of PS (*T*, *MIX11* and *EOMES*) and mesendoderm (*FOXA2* and *GSC*) markers.

Altogether, these results showed that CHIR acts as potent inducer of mesendoderm progenitors in the hiPSC model. The addition of Activin A in the differentiation medium led to a decrease of these progenitors while the addition of FGF2 had no effect.

Distinct lineage specification roles for Wnt and FGF signaling pathways

In a second phase, we aimed at further differentiate hiPSC-derived mesendoderm progenitors (*FOXA2*, *GSC* and *T*) towards notochordal lineage by modulating activities of the Wnt and FGF signaling pathways. Human iPSC were treated with 3 μ M CHIR supplemented or not with 2, 5 or 10ng/ml of Activin A for 2 days to generate mesendoderm progenitors. This protocol was followed by 3 days of sustained 3 or 6 μ M CHIR treatment (Figure 2A). Expression analysis of hiPSC-derived mesendoderm progenitors maintained in the presence of 3 μ M CHIR up to 5 days showed that increasing doses of Activin A correlated with greater endoderm specification as shown by the increased expression of *SHH* and *SOX17* (Figure 2B). The gene marker *CER1*, expressed in the nascent definitive endoderm in the mouse embryo (from E7.5 to E8.25), was induced transiently at day 2, consistent with previous reports on endoderm differentiation using hES cells [44, 47]. This transient activation of *CER1* in our differentiation conditions indicates a proper endoderm specification of hiPSC. Human iPSC-derived mesendoderm progenitors maintained in the presence of 6 μ M CHIR up to 5 days differentiated towards mesoderm lineages as shown by the high and consistent expression of *MIXL1*, *T-Box Transcription Factor 6 (TBX6)* and *Forkhead Box F1 (FOXF1)* (Figure 2C). Remarkably, the dose effects of Activin A were not observed on mesodermal lineage specification as it was seen in the endoderm context.

These results showed that both Wnt and Activin A influence cell lineage specification in hiPSC. Activin A regulates hiPSC-derived mesendoderm progenitor differentiation towards endoderm fate rather than mesoderm fate, which is promoted by high level of Wnt signaling activity. The absence of detection of the node/notochord specific marker *NOTO* expression in any of the differentiation conditions analysed revealed

that the continuous activation of Wnt signalling is not sufficient to induce the differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors toward notochordal lineage.

Thus we investigated whether in addition to Wnt activity, whether the activation of FGF signaling could influence the differentiation of mesendoderm cells toward notochord lineage (Figure 2D). To get around evident definitive endoderm differentiation, Activin A was omitted and hiPSC were treated with 3 μ M CHIR for 2 days to generate mesendoderm progenitors (Figure 1B and 1D). The addition of FGF2 in the presence of 3 μ M of CHIR during the last 3 days did not affect the endoderm specification fate as shown by similar levels of *SOX17* and *SHH* at day 3 and day 5 (Figure 2E). Immunostainings for FOXA2 and T showed a complete absence of double positive cells at day 5 and a similar distribution of FOXA2 and T single positive cells in the presence or absence of FGF stimuli (Figure 2F). The addition of FGF2 in the presence of 6 μ M of CHIR during the last 3 days reinforced the differentiation toward mesoderm lineages as shown by a strong levels of *T*, *MIXL1*, *TBX6* and *FOXF1* expressions and conversely blocked endodermal fate specification as shown by the decrease level of transcription of the *SOX17* and *SHH* (Figure 2G). Consistent with the finding of the RT-qPCR analysis, immunostainings for FOXA2 and T showed a high number of T positive cells (Figure 2H). A complete absence of double positive cells at day 5 was observed and similar distribution of FOXA2 and T single positive cells were observed in the presence or absence of FGF stimuli.

To gain a global view of the lineage derivatives generated, digital sequencing analyses were performed to compare hiPSC to differentiated hiPSC at day 5 (Figure 2I). The expression profiles of hiPSC-derived mesendoderm progenitors treated with

3 μ M CHIR, 3 μ M CHIR+FGF2 and 6 μ M are similar. Remarkably, the hiPSC-derived mesendoderm progenitors treated with 6 μ M CHIR and FGF2 expressed high level mesoderm markers (*WNT2B*, *WNT5A*, *WNT5B*, *PDGFRA*, *FOXF1*) and low level of endoderm markers (*SOX7*, *GATA4*, *GATA6*, *HNF1B*, *HNF4A*). The expression of cardiac mesoderm specific markers *MESP1*, *MESP2* and *NKX2-5* was not detected in any of the four differentiation conditions suggesting that hiPSC-derived mesendoderm progenitors did not differentiated towards cardiac lineage. The strong expression of *SNAI1* and *CDH2* suggested that hiPSC underwent the EMT to generate mesoderm cells. None of these differentiation conditions led to the induction of the node/notochord specific marker *NOTO* (data not shown) suggesting the lack of differentiation toward notochordal lineage.

***NOTO* drives notochord fate and maintains crucial transcription factor interactions.**

In the consideration of *T*, *FOXA2*, *GSC* and *SHH* expressions, the presence of a minor population of axial mesoderm cells among differentiated hiPSC cells cannot be excluded. However, two observations argue against this possibility: the loss of T/*FOXA2* double positive cells in the course of the differentiation and the lack of expression of the node/notochord specific marker *NOTO* which is the unequivocal proof of the presence of notochord-like cells in the mouse model. To address whether the transcription factor *NOTO* plays a role in notochordal cell fate decision in human and whether it can influence hiPSC-derived mesendoderm progenitor differentiation, we designed the following experiments. The overexpression of the mRNA encoding for human *NOTO* was conducted in two distinct cell types: hiPSC committed mesendoderm progenitors and hiPSC-committed endoderm progenitors to compare the differentiation outcome (Figure S2). We first characterized at day 3, the

expression profile by RT-qPCR and T/FOXA2 distribution by immunostainings, in the two populations (Figure S2A, S2B, S2C and S2D). The forced expression of NOTO did not affect endoderm progenitor fate whereas this led to an increased expression of axial mesoderm markers *T*, *FOXA2* and *SHH* in mesendoderm progenitors at 24 h after transfection (Figure S2E, S2F, and S2G). Immunostainings for NOTO and T revealed that both proteins were found co-expressed in mesendoderm progenitors, consistent with its role during notochord formation in mouse embryo (Figure S2H). Our digital sequencing experiment showed a decrease in mesoderm marker expression (*MEOX2*, *PAX3*, *MESDC1* and *WNT5B*) and an increase in axial mesoderm makers (*FOXA1*, *T* and *NOGGIN*) after NOTO transfection in hiPSC-committed mesendoderm progenitors (Figure S2I). These results support the hypothesis that the factor NOTO can drive the commitment of double T/FOXA2 positive hiPSC towards axial mesoderm cells.

We next performed a time-course analysis of lineage specific markers to study the differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors when mRNA NOTO was transfected every 24 h from day 2 to day 4. In order to modulate and determine the level of Wnt signaling activity compatible with notochord differentiation, the transfected hiPSC were maintained either with 3 μ M and 6 μ M CHIR during differentiation (Figure 3A). In both condition, we found that NOTO overexpression led to an increase in the axial mesoderm markers *FOXA2*, *T*, *SHH* and *FOXJ1* at day 3 and day 5. At day 5, *GSC* was not detected in both control and NOTO transfected conditions suggesting that no anterior axial mesoderm was generated or maintained (Figure 3B, 3C). As previously described in the present work, the expression of *T*, *MIXL1* and *TBX6* was consistently increased by 6 μ M CHIR treatment (compare Figure 3D and 3C with Figure 2E and 2G). Remarkably, double positive T/FOXA2 cell

population was maintained until day 5 when sustained with 3 μ M CHIR whereas this population was lost after day 3 with 6 μ M CHIR (Figure 3D). Digital sequencing analyses at day 5 revealed that overexpression of NOTO in the presence of 3 μ M CHIR strongly reduced the expression of endoderm markers (*SOX7*, *GATA4*, *GATA6*, *HNF1B*, *HNF4A*) compared to hiPSC-derived mesendoderm progenitors. In contrast, this condition promoted the emergence of axial mesoderm (*FOXA1*, *FOXA1*, *T*, *NOGGIN*, *CHORDIN*, *CTGF*) of posterior character as demonstrated by the absence GSC typically expressed in anterior axial mesoderm (Figure 3E). *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* and *collagen type II (COL2A1)* genes are expressed in the notochord during mouse embryonic development and known to regulate survival and extracellular matrix synthesis activity [48]. Interestingly, our results showed a neat increase in the expression of these markers in NOTO transfected cells maintained in the presence of 3 μ M CHIR but not at higher dose. Finally, the observed decrease of EMT target genes *SNAI1* and *CDH2* expression is consistent with the well described epithelial feature of the notochord [5, 49]. Altogether our findings indicates that NOTO overexpression and 3 μ M CHIR sustained culture condition allowed the emergence of hiPSC differentiated cells with a proper notochord signature.

To address whether the FGF signaling could also positively influence the notochord differentiation from hiPSC-derived mesendoderm progenitors, we performed similar experiments in the presence of FGF2 (Figure S3A). RT-qPCR and T/FOXA2 immunostainings analyses showed that the differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors towards NTC when NOTO is overexpressed was not enhanced by the addition of FGF2. (Figure S3B, S3C, S3D and S3E). In the contrary, digital sequencing analyses revealed that addition of FGF2 led to a decrease in the expression of the notochord markers (*FOXA1*, *NOGGIN*, *CHORDIN*, *SOX5*, *SOX6*)

and similarly, in the endoderm markers (*SOX7*, *GATA4*, *GATA6*, *HNF1B*, *HNF4A*) and to an increase in expression of mesoderm markers (*WNT5B*, *CDH2*, *BMP1*, *MESP2*) (Figure S3F).

In order to understand the regulatory role of NOTO in the differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors towards NTC-like cells, co-immunoprecipitation analyses were performed (Figure 3F). We demonstrated that FOXA2, and T proteins interact in hiPSC-derived mesendoderm progenitors at day 2. As early as 24 h after NOTO transfection (day 3) and up to day 5, FOXA2, T and NOTO were found interacting together. In addition, in the presence of NOTO, a strong increase in FOXA2 and T protein synthesis was observed at day 3 and day 5. Protein-protein interactions between FOXA2, T and NOTO transcription factors may play important role in modulating gene expression in our hiPSC differentiation system.

NOTO overexpression and Wnt signaling are sufficient to induce a stable notochord population

During embryonic development, the expression of *NOTO* is firstly detected in the EGO at E6.5. This factor is expressed in the node and the notochord until E12.5 [17, 18, 50]. We investigated whether the overexpression of this transcription factor during 3 consecutive days is an appropriated time frame and could mimic, *in vitro*, the transitory activity of NOTO required for notochord specification *in vivo*. We also examined whether cells had acquired a stable notochord molecular profile and could be maintained in culture. As previously described, Wnt and Shh signaling have crucial role in the maintenance of the notochord *in vivo* [7, 36]. FGF signaling is involved in axis elongation [51]. Thus, we analyzed the evolution of the differentiated cells up to 7 days in the 3 μ M CHIR, 3 μ M CHIR + SHH and 3 μ M CHIR + FGF2

(Figure 4A). Our results showed similar expression levels of *FOXA2*, *T*, *SHH* and *FOXJ1* at day 5 and day 7 indicating that the expression profile of NTC-like cells was stable when sustained with 3 μ M CHIR (Figure 4B). The addition of FGF2, SHH or both factors (data not shown) did not change the expression of the notochord markers as well the T/FOXA2 double positive cell population (Figure 4C) indicating that both signaling pathways were not necessary for the maintenance of hiPSC-derived NTC *in vitro*.

Discussion

Controlling early cell fate decision and notochord specification of human pluripotent stem cells remains a crucial challenge. Consistent with previous studies, we show here that CHIR is a potent inducer of hiPSC differentiation and triggers their commitment towards mesendoderm progenitors [41, 52]. We demonstrated that the generation of mesendoderm progenitors occurs specifically by using 3 μ M CHIR while higher doses favor hiPSC differentiation towards posterior PS-like fate. The combination of Wnt, Activin and FGF signaling activities did not differentiate hiPSC towards node/notochord lineage. In addition, hiPSC-derived mesendoderm progenitors were rather efficiently differentiated toward endoderm and mesoderm cells by sustaining Wnt and FGF signaling. Given the definitive endoderm and visceral endoderm overlapping expression patterns, it can be difficult to distinguish visceral endoderm from definitive in ES cell differentiation model. For example, the addition of BMP2, involved in the formation of extraembryonic tissues during mouse development, induces the differentiation of hES cells towards visceral endoderm that compromise the generation of bonafide hepatocytes [53].

Thus, the establishment of conditions that specifically support the *in vivo* development of definitive endoderm is necessary to produce proper cell types. High doses of Activin A and Wnt3a are mostly used to differentiate hES/hiPSC towards definitive endoderm [54-57]. Here, we demonstrated that low doses of Activin A in association with an intermediate Wnt activity, which mimic signals in the APS in mice embryos, efficiently drive the differentiation of hiPSC toward definitive endoderm. Our results also showed that mesoderm differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors occurred by sustaining high Wnt and FGF signaling activities. It has been reported that in the course of mesoderm differentiation of hES cells, a downregulation of *T* expression occurs between 24 and 48 h of stimulation [58, 59]. This expression profile is consistent with the transient expression of *T* observed in forming mesoderm in the mouse embryo [23]. The first steps of mesoderm specification of hES cells *in vitro* likely reproduce events occurring during mouse embryonic development. In our study, we aimed at preserving the level of *T* expression as in mouse embryo the expression of *T* remained expressed in the axial mesoderm after E8.5 [60]. Here, we provide for the first time, the inducing conditions to maintain *T* expression up to day 5 *in vitro* consistent with an axial mesoderm differentiation of hiPSC. Nevertheless, these differentiated cells did not expressed *GSC* or *NOTO* but rather high levels of *MIXL1*, *TBX6* and *FOXF1* indicating that generated cells are different from axial mesoderm. Regarding the constant expression of *T* and the absence of axial mesoderm commitment of hiPSC, we conclude that a stable population of mesoderm progenitor was established from hiPSC-derived mesendoderm progenitors when stimulated by high Wnt and FGF activities.

Remarkably, the expression of *NOTO* was not detected in the high fraction of T/FOXA2 mesendoderm progenitor population. We postulated that if *NOTO* play a

key role in notochordal lineage specification in human, the lack of NOTO activity *in vitro* prevented hiPSC-derived mesendoderm progenitors to adopt notochordal identity. To bypass this molecular roadblock of *NOTO* endogenous expression, we used synthetic mRNA encoding for human NOTO proteins to force its expression in hiPSC-derived mesendoderm progenitors. Our results clearly demonstrated that the overexpression of NOTO and sustained Wnt signaling activity induced the differentiation of hiPSC towards stable NTC-like cells. This observation indicates that the transfected mRNA NOTO likely reproduce in the mesendoderm progenitors, the function of endogenous transcription factor NOTO during *in vivo* notochord development. Interestingly, the overexpression of *NOTO* also resulted in the maintenance of a population of T/FOXA2 double positive cells up to day 7 exhibiting notochord-like molecular signature (RT-qPCR and digital sequencing data at day 5). Our RT-qPCR, immunostainings and co-immunoprecipitation results provided some insights on molecular mechanisms involved in NTC differentiation *in vitro*. We showed evidence for the formation of a complex including the three transcription factors FOXA2, T and NOTO as early as day 3. In an attempt to explain the role of this complex, we propose the hypothesis that NOTO exert its transcriptional activity via the stabilization of the physical interaction between FOXA2 and T proteins. However whether the formation is involved in the notochordal lineage commitment remains to be proved. Previous studies reported that T physically interacts with Mixl1, another homeodomain-containing transcription factor. This interaction has been shown to negatively regulate the expression of *Gsc* in mouse ES embryoid bodies [61]. As *T* and *Mixl1* are expressed murine node and tail notochord that lack *Gsc* expression, this interaction may occur to downregulate *Gsc* expression in this lineage [62]. Our results showed that an increase in *Mixl1* expression is observed when

NOTO is overexpressed. Thus, the FOXA2/T/NOTO complex may positively regulate the expression of *MIXL1* which subsequently would repress the expression of *Gsc* and prevent the differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors toward anterior axial mesoderm. The overexpression of NOTO induces or maintains high levels of *FOXA2* and *T* transcripts and proteins and upregulates the expression of notochordal-related markers in hiPSC. Another hypothesis would be that the presence of NOTO maintains high levels of FOXA2 and T therefore preventing hiPSC-derived mesendoderm progenitor differentiation towards endoderm or mesoderm fate. Both hypotheses are supported by the existence of putative binding sites for FoxA2, T or Noto in notochordal-related gene promoters and by the model of gene regulatory network of node/notochord proposed by Tamplin [63].

In summary, we demonstrated that the differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors towards endoderm and mesoderm lineages is effective by modulating Wnt and FGF signaling pathways. The generation of stable NTC-like cells is mediated by NOTO overexpression and sustained Wnt signaling. This study provides new insights on potential molecular mechanisms involving NOTO transcription factor in the context of notochord formation. Notochordal differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors may be achieved *via* the formation of FOXA2, T and NOTO interacting complex necessary to regulate notochordal-related target genes or to prevent the activation of mesodermal and endodermal-related target genes. Further investigations are needed to understand the gene regulatory network responsible for endoderm, mesoderm or notochord differentiation of hiPSC.

Experimental procedures

Reprogramming, validation and culture of human induced pluripotent stem cells

Human induced pluripotent stem cells were generated from dermal fibroblast. They were reprogrammed by transfection of synthetic mRNA encoding for OCT4, SOX2, c-MYC, KLF4 and LIN28 and are routinely maintained in feeder free conditions, on matrigel coated plates with mTeSR1 media. Reprogrammed cells have normal karyotypes, no gain of SNP compared to parental fibroblasts and the injection of reprogrammed iPSC into NOD SCID mice led to the formation of teratomas that included differentiated tissues from endoderm, mesoderm and ectoderm germ layers. For differentiation experiments, hiPSC were used between passages 25 and 40.

Differentiation of human induced pluripotent stem cells

Human iPSC were seeded in single cells at 35.000cells/cm² after gentle enzymatic digestion with TrypLE (12605-1010, Life technologies) with Rock inhibitor (1254, Tocris). Two days after seeding, hiPSC were stimulated with increasing doses Activin A (130-097-611, Miltenyi Biotec) and CHIR99021 (100-1386, Axon) in N2B27. After 2 days of stimulation, a gentle enzymatic digestion with TrypLE was performed and cells were then seeded on Matrigel coated plates without Rock inhibitor. For mRNA transfection experiments, 1500 ng of mRNA encoding for NOTO or GFP were transfected with lipofectamine RNAiMAX (13778-150, Life technologies) in cell suspension at day 2. Transfection of mRNA NOTO or GFP at day 3 and day 4 was performed in monolayer. After transfection, cells were maintained in N2B27 supplemented in 3 μ M or 6 μ M CHIR and with or without 50ng/ml FGF2 (100-18B,

Peprtech) until Day 7. For the maintenance of notochord cell population, SHH (130-095-721, Miltenyi Biotec) and FGF2 were added from day 5 to day 7.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted with the Nucleospin II RNA Kit (740955, Macherey nagel) and reverse transcribed using the SuperScript III First Strand synthesis kit (11752, Life technologies) on 1µg of total RNA. Quantitative RT-PCR experiments were performed using TaqMan technology.

Immunostainings

Cultivated cells were fixed with PFA 4% for 15 min, permeabilized with 0.5% Triton for 15 min at RT and blocked in 3% bovine serum albumin in PBS for 30 min. Fixed cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies for FOXA2 (1/400 dilution, 8186, Cell Signaling Technologies), T (0.5µg/ml, AF2085, R&D systems), NOTO (1/1000 dilution, NBP1-91009, R&D systems) and then 1h at room temperature with secondary antibodies Alexa 594-conjugated donkey anti rabbit for FOXA2 and NOTO (1/1000, A21207, Life technologies) and with Alexa 488-conjugated donkey anti goat for T immunostainings (1/1000, A11055, Life technologies). Nuclei were then counterstained with Hoechst (2µg/ml, H3569, Life technologies) before imaging with a confocal microscope (Nikon). FOXA2/BRACHYURY double positive cells were counted by using FIJI software.

3' Digital Gene Expression (DGE)

The 3'-DGE libraries were prepared from 20ng of total RNA according to the Single Cell RNA Barcoding and Sequencing method originally developed for single cell RNA-seq (SCRB-seq) (Soumillon et al., 2014) and adapted to extracted total RNA.

Briefly, Poly(A)+ mRNA from extracted total RNA are converted to cDNA decorated with universal adapters, sample-specific barcodes and unique molecular identifiers (UMIs) using a template-switching reverse transcriptase. Decorated cDNA from multiple samples are then pooled, amplified and prepared for multiplexed sequencing using a modified transposon-based fragmentation approach that enriches for 3' ends and preserves strand information. Read pairs were used for analysis if all sixteen bases of the first read had quality scores of at least 10 and the first six bases corresponded exactly to a designed well-barcode. All second sequence reads were aligned to a reference database consisting of all human RefSeq mRNA sequences (hg19) and the ERCC RNA spike-in reference sequences using bwa version 0.7.4 4 with non-default parameter “-l 24”. Reads mapped to multiple genes were excluded from further analysis. Digital gene expression (DGE) profiles were then generated by counting, for each microplate well and RefSeq gene, the number of unique UMIs associated with alignments to that gene in that well.

Immunoprecipitation assays

Cells were lysed in TNTE buffer (20mM Tris/HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1% TritonX-100, 1mM EDTA) containing standard protease and phosphatase inhibitors. Immunoprecipitations were carried out using 500µg proteins and 0.8µg/IP anti-BRACHYURY and 0.3µg/IP anti-NOTO antibodies overnight at 4°C. An incubation with 20µl Protein A/G ultralink resin (53132, Thermofisher scientific) for 3h at 4°C was then performed.

Precipitates were washed 5 times with 500µl of TNTE buffer. For immunoblot analysis, beads were incubated for 5 min at 95°C with Laemmli buffer. Thirty percent of immunoprecipitated proteins and 5% of total proteins (input) were migrated in polyacrylamide gels, transferred on PVDF membranes and probed with specific

antibodies for FOXA2 (1/1000, 8186, Cell Signaling Technology), diluted in 5% dry fat milk/TBS-T overnight at 4°C.

Figure legends:

Figure 1: Wnt and Nodal signaling pathways induces hiPSC differentiation towards mesendoderm progenitors.

(A.-D.) Modulation of Wnt signaling pathway by CHIR99021 (CHIR) on hiPSC differentiation towards mesendoderm lineage. (A.) Graphical diagram of differentiation protocol. (B.) Analysis of expression of Wnt and Nodal target genes (*LEF1*, *LEFTY1* and *NODAL*), primitive streak (*T*, *MIXL1* and *EOMES*) and mesendoderm markers (*FOXA2*, *GSC* and *CER1*) by RT-qPCR (n=2). (C.) Immunostainings of T, FOXA2 single positive cells and T/FOXA2 double positive cells at day 2 and quantification by cell counting (D., n=2).

(E.-H.) Modulation of Wnt and Nodal signaling pathways by CHIR and Activin A (ActA) on hiPSC differentiation towards mesendoderm lineage. Human iPSC were cultivated in the presence of 2, 5 or 10ng/ml ActA + 3µM CHIR for 48h and 2ng/ml ActA +3µM CHIR for 24h (E.) Graphical diagram of the differentiation protocol. (F.) Analysis of expression of Wnt and Nodal target genes (*LEF1*, *LEFTY1* and *NODAL*), primitive streak (*T*, *MIXL1* and *EOMES*) and mesendoderm markers (*FOXA2*, *GSC* and *CER1*) by RT-qPCR (n=3). ¥ : this condition corresponds to 24 h of stimulation 2ng/ml ActA + 3µM CHIR (white histogram) and then, 24 h of withdraw (hatched histogram). (G.) Immunostainings of T, FOXA2 single positive cells and T/FOXA2 double positive cells at day 2 and quantification by cell counting (D., n=2). Scale bar: 100µm

Figure 2: Wnt and FGF signaling pathway influence endoderm and mesoderm bifurcation from hiPSC-derived mesendoderm progenitors.

(A.-C.) Effects of sustained Wnt signaling activation on the differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors. (A.) Graphical diagram of the differentiation protocol. (B) Analysis of anterior axial mesoderm (*T*, *FOXA2* and *GSC*), definitive endoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) and mesoderm (*MIXL1*, *TBX6* and *FOXF1*) expression by hiPSC-derived mesendoderm progenitors cultivated in the presence of 3 μ M or in the presence of 6 μ M CHIR (C.) by RT-qPCR (n=2). (D.-I.) Effects of sustained Wnt and FGF signaling activation on the differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors. (D.) Graphical diagram of the differentiation protocol. (E.) Analysis of anterior axial mesoderm, definitive endoderm and mesoderm marker expression by RT-qPCR (n=2). (F.) Immunostainings of T, FOXA2 single positive cells and T/FOXA2 double positive cells in the presence of 3 μ M CHIR with and without 50ng/ml FGF2 during the last 3 days. (G.) Analysis of anterior axial mesoderm (*T*, *FOXA2* and *GSC*), definitive endoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) and mesoderm (*MIXL1*, *TBX6* and *FOXF1*) expression by RT-qPCR (n=2). (H.) Immunostainings of T, FOXA2 single positive cells and T/FOXA2 double positive cells in the presence of 6 μ M CHIR with and without 50ng/ml FGF2 during the last 3 days. Scale bar: 50 μ m. (I.) Digital Gene expression of axial mesoderm, mesoderm, endoderm, pluripotency and Wnt, Nodal and FGF target genes in hiPSC and differentiated cells at day 5 (n=1).

Figure 3: NOTO overexpression triggers hiPSC-derived mesendoderm progenitors differentiation towards notochordal lineage.

(A.-D.) Notochord differentiation of hiPSC-derived mesendoderm progenitors through mRNA NOTO transfection and sustained Wnt signaling activity (A.) Graphical diagram of the differentiation protocol. (B.) Analysis of axial mesoderm (*T*, *FOXA2*, *SHH* and *FOXJ1*), definitive endoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) and mesoderm (*MIXL1*, *TBX6* and *FOXF1*) expression in the presence of 3 μ M CHIR or in the presence of 6 μ M CHIR (C.) by RT-qPCR (n=3). (D.) Immunostainings of T, FOXA2 single positive cells and T/FOXA2 double positive cells at day 2, day 3 and day 5. Scale bar: 50 μ m. (E.) Digital Gene expression of axial mesoderm, mesoderm, endoderm, pluripotency and Wnt, Nodal and FGF target genes in hiPSC, hiPSC-derived mesendoderm progenitors and differentiated cells at day 5 (n=1). (F.) Analysis of FOXA2, T and NOTO physical interactions by co-immunoprecipitation assay. Human iPSC, hiPSC-derived mesendoderm progenitors day 1 and day 2, GFP and NOTO transfected hiPSC-derived mesendoderm progenitors at day 3 and day 5 cultivated in the presence of 3 μ M CHIR and FGF2 were analyzed (n=1).

Figure 4: Wnt signaling activity but not SHH and FGF maintain stable notochord-like cell population in culture.

(A) Graphical diagram of the differentiation protocol. (B.) Analysis of axial mesoderm (*T*, *FOXA2*, *SHH* and *FOXJ1*), definitive endoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) and mesoderm (*MIXL1*, *TBX6* and *FOXF1*) expression in the presence of 3 μ M CHIR alone, 3 μ M CHIR + SHH and 3 μ M CHIR + FGF2 by RT-qPCR (n=2). (C.) Immunostainings of T, FOXA2 single positive cells and T/FOXA2 double positive cells at day 2, day 3, day 5 and day 7. Scale bar: 50 μ m.

Figure S1: Wnt, Nodal and FGF signaling pathways induce hiPSC differentiation towards mesendoderm lineage.

(A.) Analysis of the expression of pluripotency markers *NANOG*, *POU5F1* and *SOX2* in hiPSC stimulated with 1, 3 and 6 μ M CHIR by RT-qPCR (n=2). (B.) Immunostainings of T, FOXA2 single positive cells and T/FOXA2 double positive cells in hiPSC stimulated with 1, 3 or 6 μ M CHIR at day 1. (C.) Analysis of the expression of *NODAL*, PS (*T*, *MIXL1* and *EOMES*) and mesendoderm (*FOXA2* and *GSC*) makers in hiPSC stimulated with 3, 4, 5 or 6 μ M CHIR by RT-qPCR (n=2). (D.) Analysis of the expression of pluripotency markers (*NANOG*, *POU5F1* and *SOX2*) in hiPSC stimulated with 2, 5, 10ng/ml ActA+3 μ M CHIR for 48 h and with 2ng/ml ActA+3 μ M CHIR for 24 h by RT-qPCR (n=2). (E.) Immunostainings of T, FOXA2 single positive cells and T/FOXA2 double positive cells on stimulated with 2, 5 or 10ng/ml ActA+3 μ M CHIR for 48 h and with 2ng/ml ActA+ 3 μ M CHIR for 24 h at day 1. (F.-H.) Effects of FGF signaling activation by using FGF2 on hiPSC-derived mesendoderm progenitors. (F.) Analysis of the expression of *SPRY1*, *NODAL*, PS (*T*, *MIXL1* and *EOMES*) and mesendoderm (*FOXA2* and *GSC*) makers in hiPSC stimulated with 3 μ M CHIR and increasing doses of FGF2 (25-100ng/ml) by RT-qPCR (n=1). (G.) Analysis of the expression of *SPRY1*, *NODAL*, PS (*T*, *MIXL1* and *EOMES*) and mesendoderm (*FOXA2* and *GSC*) makers in hiPSC stimulated with 6 μ M CHIR and increasing doses of FGF2 (25-100ng/ml) by RT-qPCR (n=1). (H) Analysis of the expression of *SPRY1*, *NODAL*, PS (*T*, *MIXL1* and *EOMES*) and mesendoderm (*FOXA2* and *GSC*) makers in hiPSC stimulated with 2ng/ml ActA+3 μ M CHIR and increasing doses of FGF2 (25-100ng/ml) by RT-qPCR (n=1).

Figure S2: Cell-type-specific response to NOTO overexpression

(A.-D.) Characterization of endoderm and mesendoderm progenitors. (A.) Graphical diagram of the differentiation protocol. (B.) Analysis of *LEF1*, *NODAL*, mesendoderm (*FOXA2*, and *T*), definitive endoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) and mesoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) markers expression by RT-qPCR (n=6). (C.) Immunostainings of T, *FOXA2* single positive cells and T/*FOXA2* double positive cells of hiPSC-derived endoderm and mesendoderm progenitors at day 3 and quantification by cell counting (D.). Scale bar: 100µm. (E.-H.) Effect of NOTO overexpression on endoderm and mesendoderm progenitor fate. (E.) Graphical diagram of differentiation protocol. Analysis of axial mesoderm (*FOXA2*, *T* and *SHH*), definitive endoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) and mesoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) markers expression in NOTO transfected hiPSC-derived endoderm (F) and mesendoderm (G) progenitors by RT-qPCR (n=4). (H.) Immunostainings of T/*NOTO* double positive cells visualized by epifluorescence microscopy. Scale bar: 50µm (I.) Digital Gene expression of axial mesoderm, mesoderm, endoderm, pluripotency and Wnt, Nodal and FGF target genes in hiPSC, GFP and NOTO transfected hiPSC-derived endoderm and mesendoderm progenitors at day 3 (n=1).

Figure S3: Effects of FGF signaling activation on notochordal differentiation.

(A.) Graphical diagram of the differentiation protocol. (B.) Analysis of axial mesoderm (*T*, *FOXA2*, *SHH* and *FOXJ1*), definitive endoderm (*CER1*, *SOX17* and *SHH*) and mesoderm (*MIXL1*, *TBX6* and *FOXF1*) expression in hiPSC-derived mesendoderm progenitors transfected with mRNA NOTO with a sustained 3µM CHIR treatment or a sustained 6µM CHIR treatment (C.) with FGF2 (n=2). (D.) Immunostainings of T, *FOXA2* single positive cells and T/*FOXA2* double positive

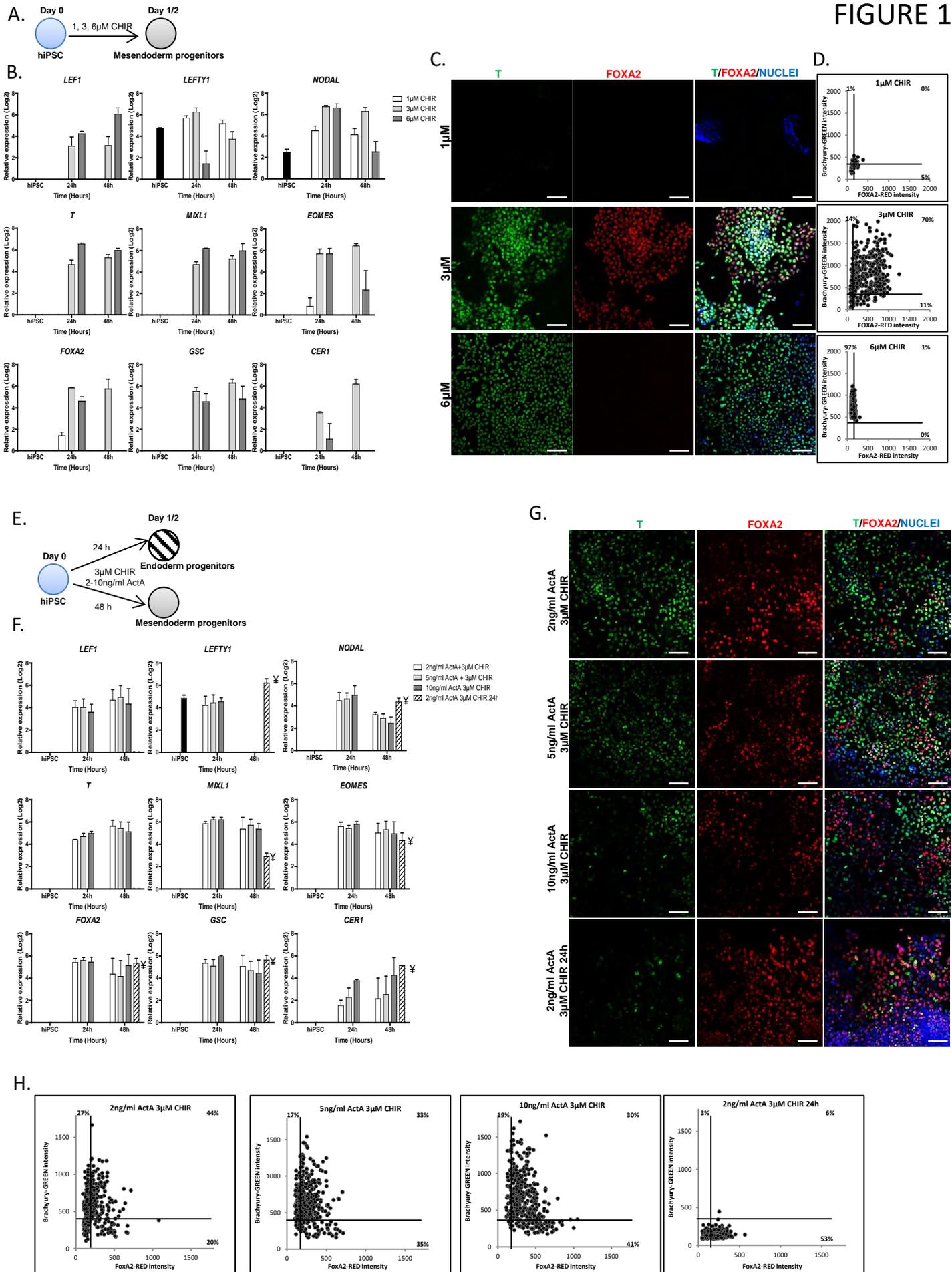
cells by hiPSC-derived mesendoderm progenitors transfected with mRNA NOTO cultured with 3 μ M CHIR (D.) or 6 μ M CHIR (E.) with FGF2. (F.) Digital Gene expression of axial mesendoderm, mesoderm, endoderm, pluripotency and Wnt, Nodal and FGF target genes, hiPSC-derived mesendoderm progenitors and differentiated cells at day 5.

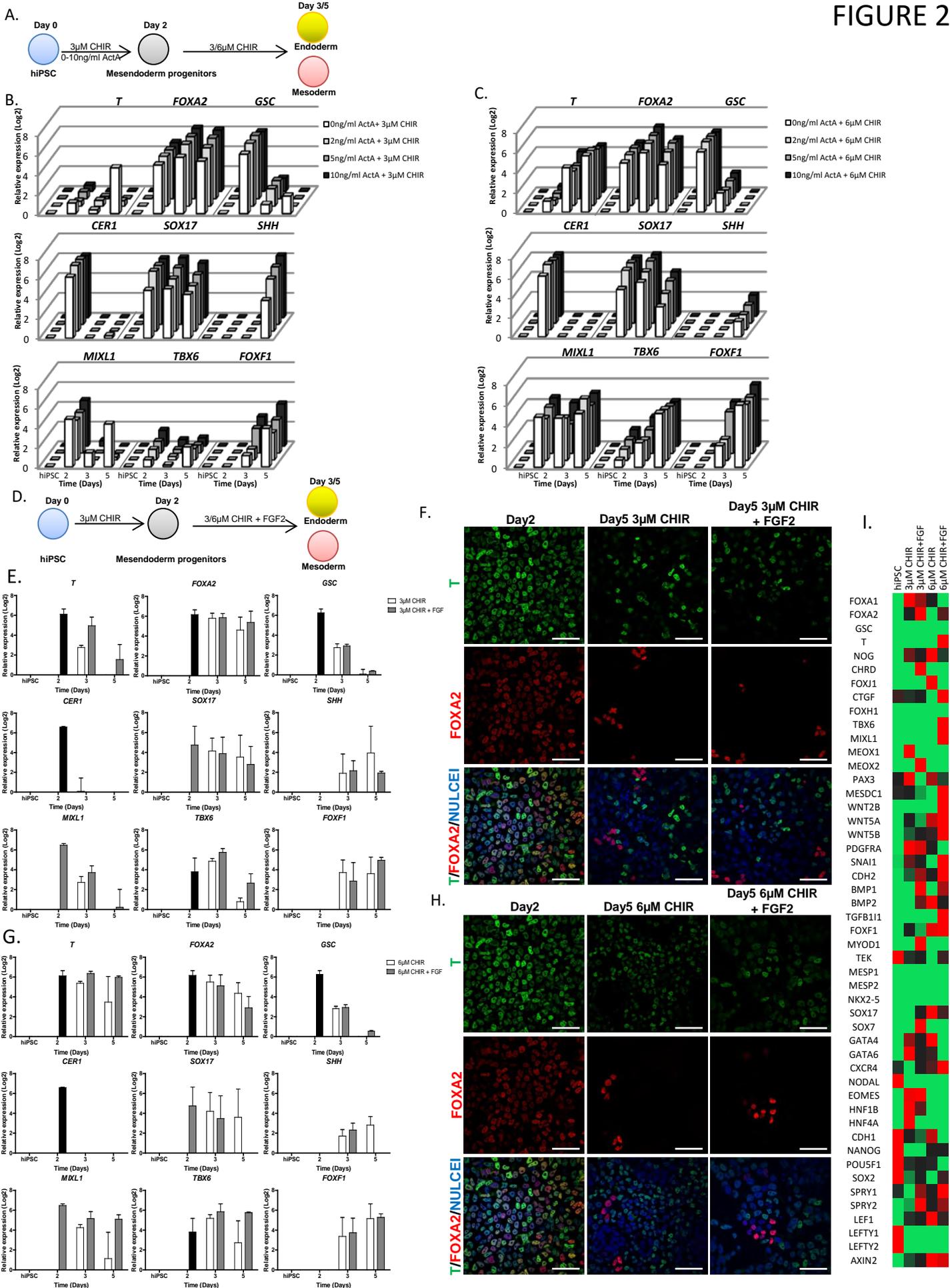
References

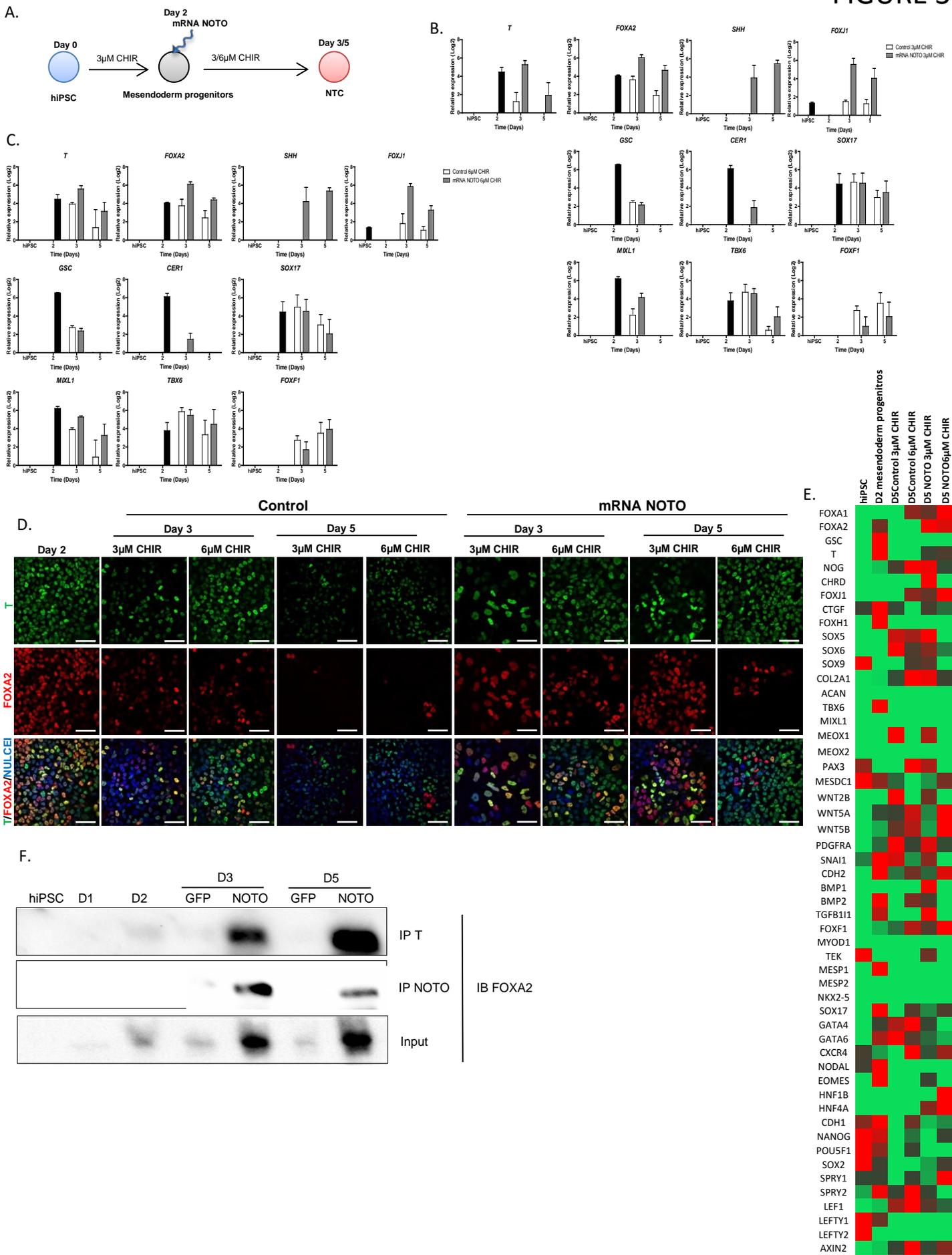
1. Bomer, N., et al., *Underlying molecular mechanisms of DIO2 susceptibility in symptomatic osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2014.
2. Buttitta, L., et al., *Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction*. Development, 2003. **130**(25): p. 6233-43.
3. McMahon, J.A., et al., *Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite*. Genes Dev, 1998. **12**(10): p. 1438-52.
4. Stafford, D.A., et al., *Cooperative activity of noggin and gremlin 1 in axial skeleton development*. Development, 2011. **138**(5): p. 1005-14.
5. Jurand, A., *Some aspects of the development of the notochord in mouse embryos*. J Embryol Exp Morphol, 1974. **32**(1): p. 1-33.
6. Lawson, L. and B.D. Harfe, *Notochord to Nucleus Pulposus Transition*. Curr Osteoporos Rep, 2015. **13**(5): p. 336-41.
7. Choi, K.S. and B.D. Harfe, *Hedgehog signaling is required for formation of the notochord sheath and patterning of nuclei pulposi within the intervertebral discs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9484-9.
8. McCann, M.R., et al., *Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse: implications for intervertebral disc development*. Dis Model Mech, 2011. **5**(1): p. 73-82.
9. 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.
10. Tran, C.M., et al., *Regulation of CCN2/connective tissue growth factor expression in the nucleus pulposus of the intervertebral disc: role of Smad and activator protein 1 signaling*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(7): p. 1983-92.
11. Tran, C.M., I.M. Shapiro, and M.V. Risbud, *Molecular regulation of CCN2 in the intervertebral disc: Lessons learned from other connective tissues*. Matrix Biol, 2013.
12. Lim, J. and J.P. Thiery, *Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development*. Development, 2012. **139**(19): p. 3471-86.
13. Ciruna, B.G. and J. Rossant, *Expression of the T-box gene Eomesodermin during early mouse development*. Mech Dev, 1999. **81**(1-2): p. 199-203.
14. Pearce, J.J. and M.J. Evans, *Mml, a mouse Mix-like gene expressed in the primitive streak*. Mech Dev, 1999. **87**(1-2): p. 189-92.
15. Rivera-Perez, J.A. and T. Magnuson, *Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3*. Dev Biol, 2005. **288**(2): p. 363-71.
16. Kinder, S.J., et al., *The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm*. Development, 2001. **128**(18): p. 3623-34.
17. Yamanaka, Y., et al., *Live imaging and genetic analysis of mouse notochord formation reveals regional morphogenetic mechanisms*. Dev Cell, 2007. **13**(6): p. 884-96.
18. Abdelkhalek, H.B., et al., *The mouse homeobox gene Not is required for caudal notochord development and affected by the truncate mutation*. Genes Dev, 2004. **18**(14): p. 1725-36.
19. Bachiller, D., et al., *The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development*. Nature, 2000. **403**(6770): p. 658-61.

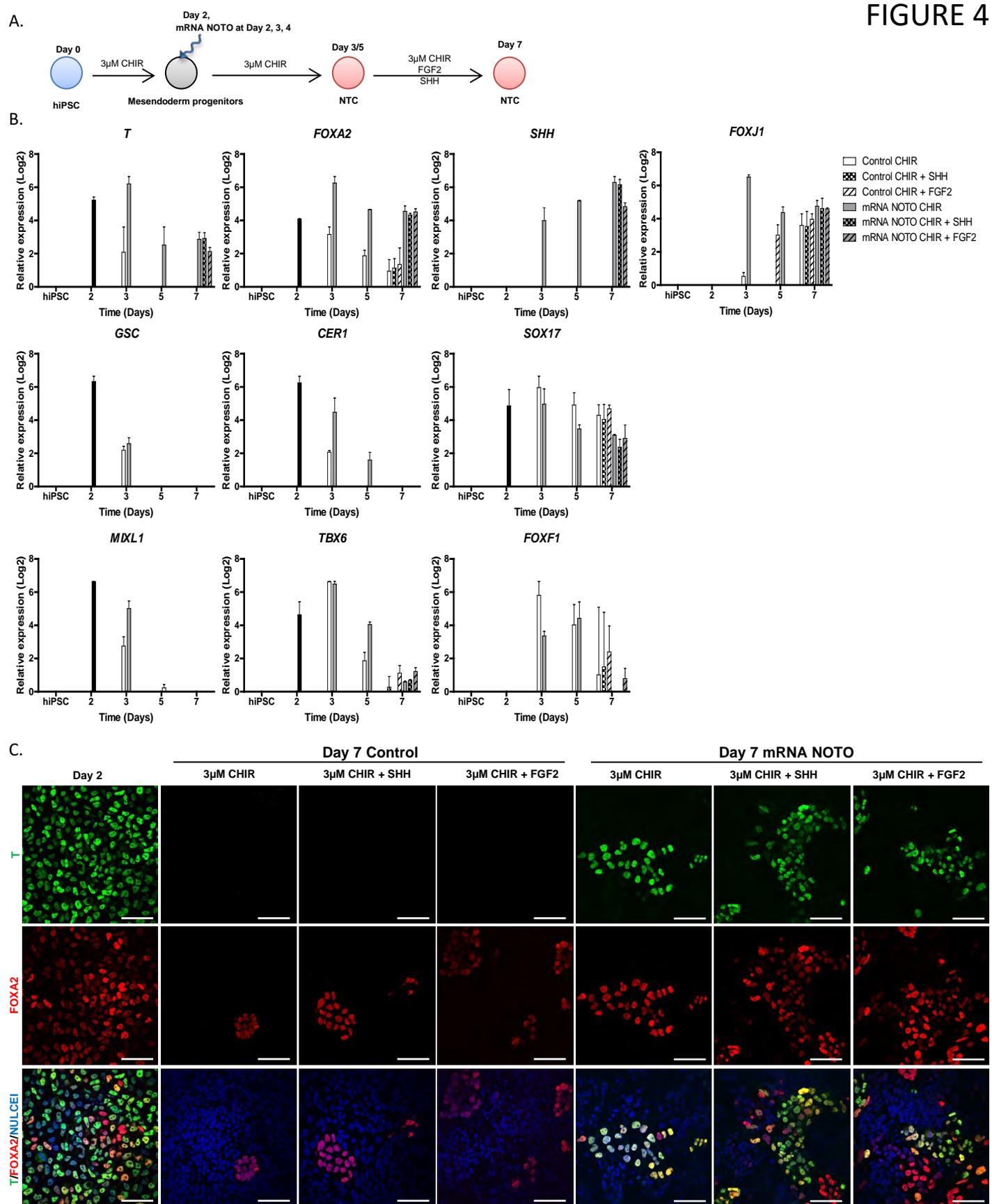
20. Barrionuevo, F., et al., *Sox9 is required for notochord maintenance in mice*. Dev Biol, 2006. **295**(1): p. 128-40.
21. Bueno, D., et al., *Spatial and temporal relationships between Shh, Fgf4, and Fgf8 gene expression at diverse signalling centers during mouse development*. Dev Dyn, 1996. **207**(3): p. 291-9.
22. Maier, J.A., Y. Lo, and B.D. Harfe, *Foxa1 and Foxa2 are required for formation of the intervertebral discs*. PLoS One, 2014. **8**(1): p. e55528.
23. Wilkinson, D.G., S. Bhatt, and B.G. Herrmann, *Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation*. Nature, 1990. **343**(6259): p. 657-9.
24. Tam, P.P. and R.S. Beddington, *The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis*. Development, 1987. **99**(1): p. 109-26.
25. Blum, M., et al., *Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo*. Differentiation, 2007. **75**(2): p. 133-46.
26. Plouhinec, J.L., et al., *Identification of the mammalian Not gene via a phylogenomic approach*. Gene Expr Patterns, 2004. **5**(1): p. 11-22.
27. Beckers, A., et al., *The mouse homeobox gene Noto regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15765-70.
28. Talbot, W.S., et al., *A homeobox gene essential for zebrafish notochord development*. Nature, 1995. **378**(6553): p. 150-7.
29. Conlon, F.L., et al., *A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse*. Development, 1994. **120**(7): p. 1919-28.
30. Ishikawa, T.O., et al., *Requirement for tumor suppressor Apc in the morphogenesis of anterior and ventral mouse embryo*. Dev Biol, 2003. **253**(2): p. 230-46.
31. Lickert, H., et al., *Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm*. Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 171-81.
32. Merrill, B.J., et al., *Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo*. Development, 2004. **131**(2): p. 263-74.
33. Norris, D.P., et al., *The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo*. Development, 2002. **129**(14): p. 3455-68.
34. Vincent, S.D., et al., *Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals*. Genes Dev, 2003. **17**(13): p. 1646-62.
35. Zhou, X., et al., *Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation*. Nature, 1993. **361**(6412): p. 543-7.
36. Ukita, K., et al., *Wnt signaling maintains the notochord fate for progenitor cells and supports the posterior extension of the notochord*. Mech Dev, 2009. **126**(10): p. 791-803.
37. Sun, X., et al., *Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo*. Genes Dev, 1999. **13**(14): p. 1834-46.
38. Winzi, M.K., et al., *Isolation and characterization of node/notochord-like cells from mouse embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(11): p. 1817-27.
39. Chen, J., et al., *Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) into Nucleus Pulposus-Like Cells*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75548.
40. Liu, Y., M.N. Rahaman, and B.S. Bal, *Modulating notochordal differentiation of human induced pluripotent stem cells using natural nucleus pulposus tissue matrix*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100885.
41. Funo, N.S., et al., *beta-Catenin Regulates Primitive Streak Induction through Collaborative Interactions with SMAD2/SMAD3 and OCT4*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(6): p. 639-52.
42. Rudloff, S. and R. Kemler, *Differential requirements for beta-catenin during mouse development*. Development, 2012. **139**(20): p. 3711-21.
43. Costello, I., et al., *Lhx1 functions together with Otx2, Foxa2, and Ldb1 to govern anterior mesendoderm, node, and midline development*. Genes Dev, 2015. **29**(20): p. 2108-22.
44. Wang, P., et al., *A molecular signature for purified definitive endoderm guides differentiation and isolation of endoderm from mouse and human embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(12): p. 2273-87.

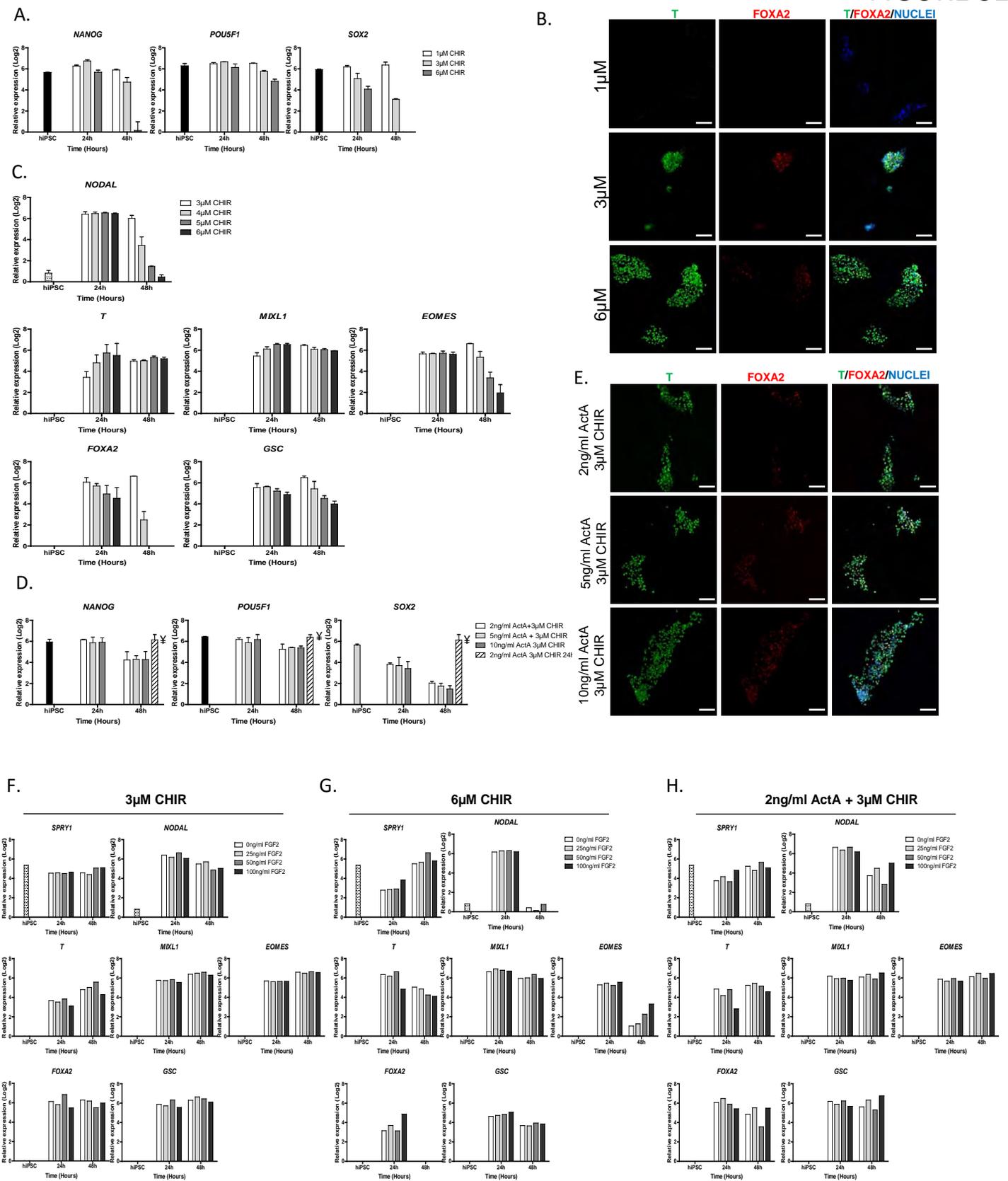
45. Ciruna, B. and J. Rossant, *FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak*. Dev Cell, 2001. **1**(1): p. 37-49.
46. Willems, E. and L. Leyns, *Patterning of mouse embryonic stem cell-derived pan-mesoderm by Activin A/Nodal and Bmp4 signaling requires Fibroblast Growth Factor activity*. Differentiation, 2008. **76**(7): p. 745-59.
47. Cheng, X., et al., *Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 371-84.
48. 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.
49. Sulik, K., et al., *Morphogenesis of the murine node and notochordal plate*. Dev Dyn, 1994. **201**(3): p. 260-78.
50. Zizic Mitrecic, M., et al., *The mouse gene Noto is expressed in the tail bud and essential for its morphogenesis*. Cells Tissues Organs, 2010. **192**(2): p. 85-92.
51. Boulet, A.M. and M.R. Capecchi, *Signaling by FGF4 and FGF8 is required for axial elongation of the mouse embryo*. Dev Biol, 2012. **371**(2): p. 235-45.
52. Chal, J., et al., *Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(9): p. 962-9.
53. Pera, M.F., et al., *Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 7): p. 1269-80.
54. Loh, K.M., et al., *Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(2): p. 237-52.
55. Toivonen, S., et al., *Activin A and Wnt-dependent specification of human definitive endoderm cells*. Exp Cell Res, 2013. **319**(17): p. 2535-44.
56. Vallier, L., et al., *Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(11): p. 2655-66.
57. Yu, J.S., et al., *PI3K/mTORC2 regulates TGF-beta/Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7212.
58. Bernardo, A.S., et al., *BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(2): p. 144-55.
59. Lam, A.Q., et al., *Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(6): p. 1211-25.
60. Herrmann, B.G., *Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos*. Development, 1991. **113**(3): p. 913-7.
61. Pereira, L.A., et al., *Brachyury and related Tbx proteins interact with the Mixl1 homeodomain protein and negatively regulate Mixl1 transcriptional activity*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28394.
62. Wolfe, A.D. and K.M. Downs, *Mixl1 localizes to putative axial stem cell reservoirs and their posterior descendants in the mouse embryo*. Gene Expr Patterns, 2014. **15**(1): p. 8-20.
63. Tamplin, O.J., et al., *Microarray analysis of Foxa2 mutant mouse embryos reveals novel gene expression and inductive roles for the gastrula organizer and its derivatives*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 511.

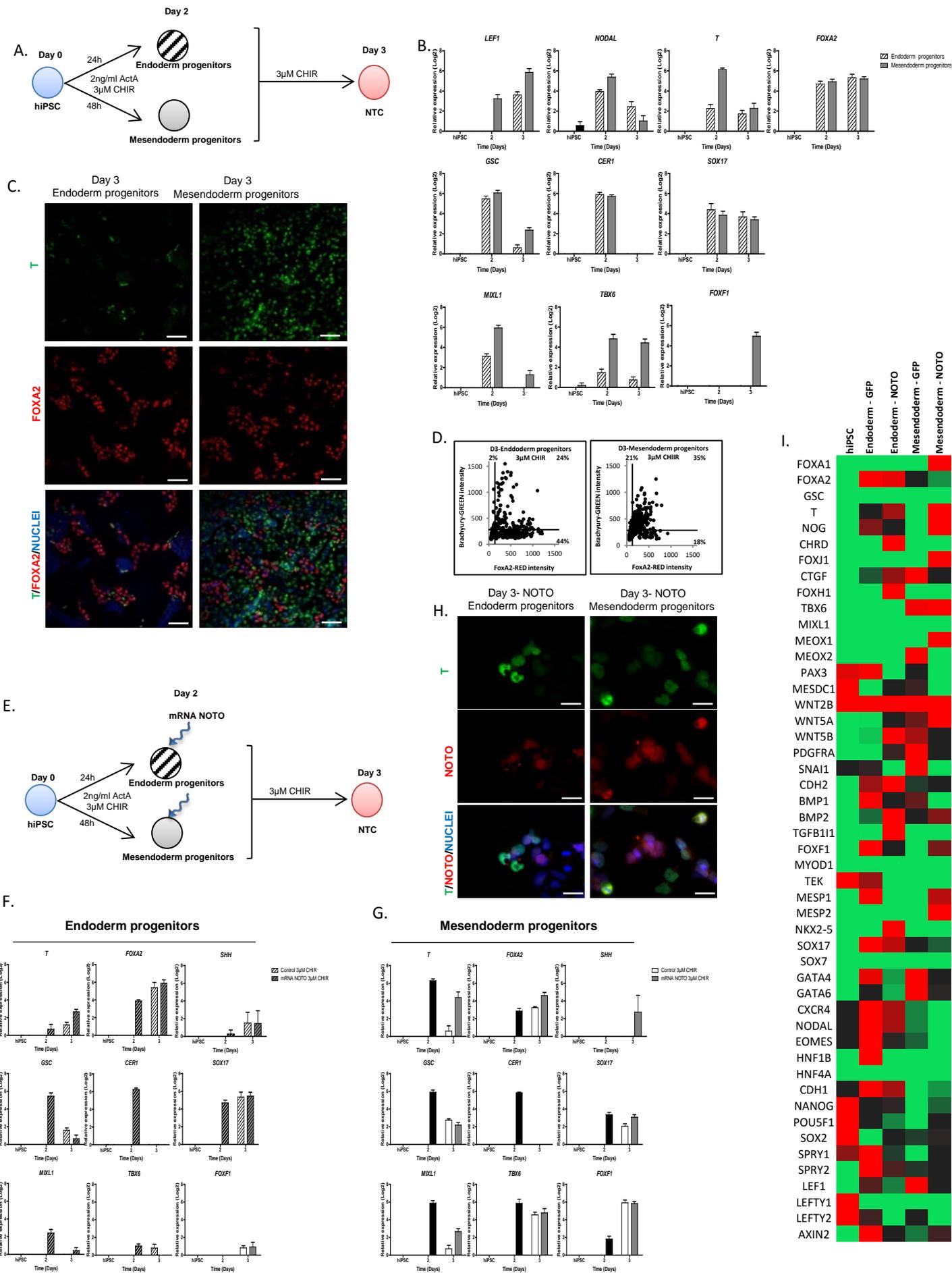


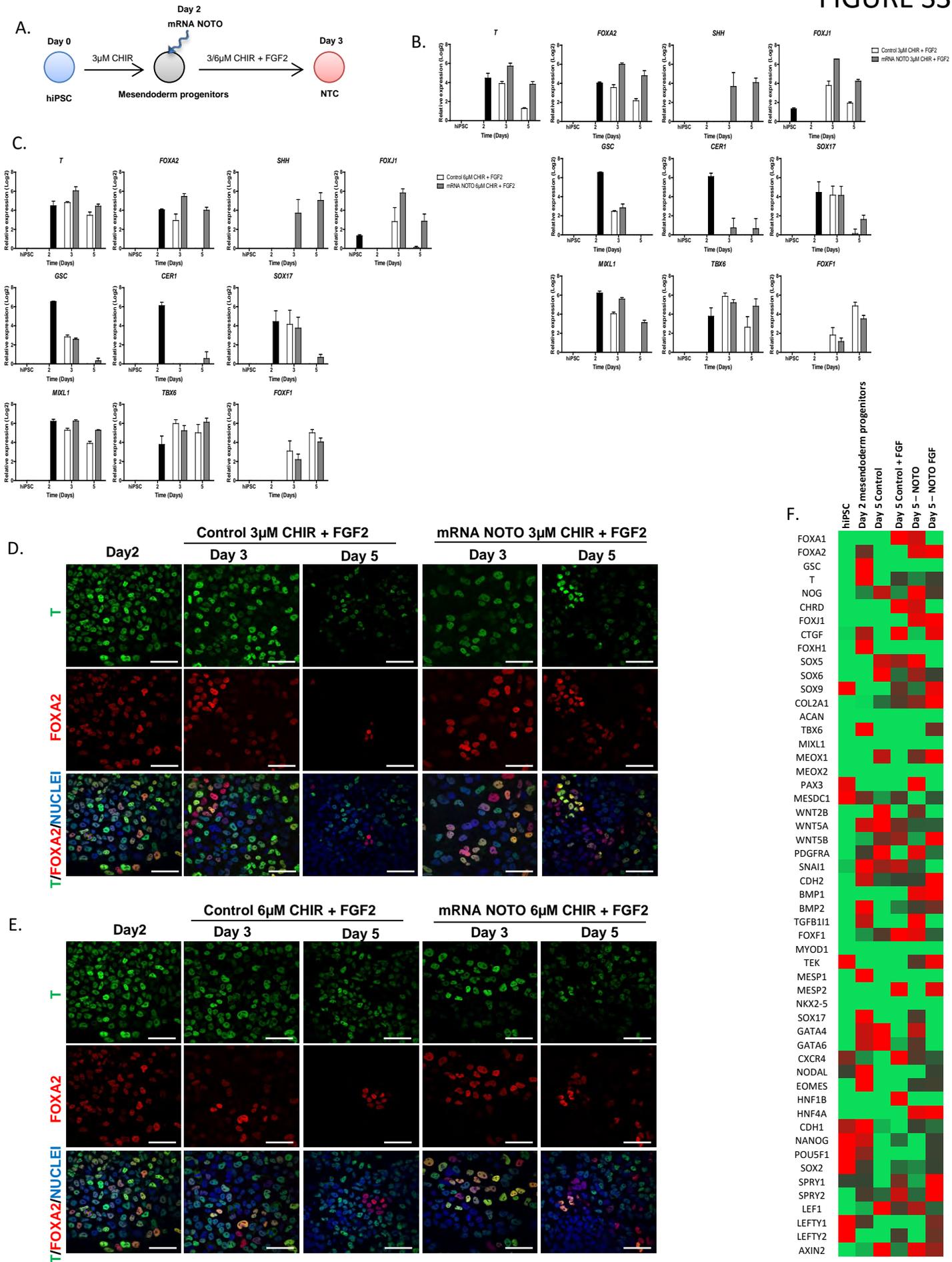












C- Discussion

Ces travaux pionniers dans l'établissement d'un protocole de différenciation notochordale à partir d'iPSC humaines ont mis en évidence la complexité de générer des cellules du lignage nœud/notochorde en reproduisant les signaux activateurs responsables de la formation de ce lignage *in vivo*. En adéquation avec la littérature, nos données ont montré que la différenciation des iPSC en présence de Activin A et de CHIR99120 (CHIR) conduit à la formation de progéniteurs de mésendoderme [469, 490]. Aucune donnée ne renseigne sur l'expression et le rôle du facteur de transcription *NOTO* et des facteurs inhibiteurs *CHORDIN* et *NOGGIN* dans la notochorde humaine. Une collaboration est actuellement en cours entre le laboratoire INSERM UMRS791 et le Dr Brian Cox à Toronto au Canada afin de décrire l'expression de ces facteurs dans la notochorde humaine. L'expression de *SHH* dans la notochorde humaine a été rapportée (26 et 37 jours après conception). En effet, des mutations dans le gène *SHH* ont été identifiées et entraînent des défauts de développement du tube neural. Ces mutations causent des holoproencéphalies, microcéphalies, retards mentaux ou encore des défauts de développement de la face comme des fentes palatines [553].

Au regard de l'importance des facteurs *Noto*, *Chordin*, *Noggin* et *Shh* dans la formation de la notochorde chez l'embryon de souris, le suivi de l'expression de ces marqueurs *in vitro* peut guider l'établissement de protocole de différenciation des iPSC humaines en CNT. Les nombreuses conditions croisées faisant varier les concentrations d' Activin A, de CHIR et de FGF2 n'ont pas permis de mettre en évidence l'émergence d'une population de type organisateur « EGO-MGO-nœud », illustré par l'absence d'expression de *NOTO*. Lors de la différenciation de ces

progéniteurs en présence de CHIR seul ou associé à FGF2, l'expression de GSC diminue dès le jour 3 indiquant que la population de progéniteurs de mésendoderme ne s'est pas différenciée en mésoderme axial antérieur. L'expression de *NOTO* n'est pas détectée dans ces conditions indiquant que ces progéniteurs de mésendoderme ne se sont pas non plus différenciés en mésoderme axial postérieur/notochorde. L'absence d'expression de *NOTO*, dans les conditions où 45 à 80% de cellules doubles positives FOXA2/T sont observées, suggère que son expression pourrait être inhibée dans ce système. Nous nous attendions à observer des cellules *NOTO* positives dans ces conditions optimales mimant la formation de la ligne primitive antérieure, même en faible pourcentage par rapport aux autres lignages. Afin de s'affranchir d'un potentiel problème lié à une reprogrammation incomplète des cellules somatiques en iPSC, nous avons transposé le protocole de différenciation en progéniteur de mésendoderme (2ng/mL d'Activin A et 3µM CHIR) aux cellules ES (lignée H9) (données non présentées). La différenciation de ces progéniteurs a ensuite été réalisée en présence de CHIR. Nos résultats montrent que l'expression de *NOTO* n'est pas détectée dans les cellules ES différenciées. Cette expérience a montré que les cellules ES et les iPSC ont un profil de différenciation similaire dans ces conditions de différenciation (2ng/ml d'Activin A et 3µM CHIR pendant 2 jours puis 3/6µM CHIR pendant 3 jours). La reprogrammation ne semble donc pas être la cause de l'incapacité des iPSC à se différencier vers ce lignage. Au regard de l'absence d'expression des marqueurs du lignage nœud/notochorde dans nos conditions de différenciation, nous avons testé le protocole de différenciation notochordale publié en 2011 à partir de cellules ES murines [491]. Cette étude a montré qu'environ 10% de CNT peuvent être générées en inhibant les voies de signalisation Wnt, acide rétinoïque, BMP et en activant la voie FGF. Nous avons

donc transposé ce protocole aux cellules ES humaines (lignée H9, données non présentées). Les résultats obtenus n'ont pas montré d'engagement dans la voie nœud/notochorde des cellules ES humaines. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à l'absence d'expression de *NOTO* dans l'ensemble de ces conditions. Un fort niveau de méthylation de l'ADN au niveau de la région de son promoteur maintenant la chromatine très compactée pourrait expliquer l'absence d'expression [554]. Un ou plusieurs répresseurs de sa transcription pourraient être également présents sur le promoteur de *NOTO*. Enfin, des ARN non codants pourraient inhiber son expression (microARN, small interfering RNA, ARN long non codant) [555]. Cependant, aucune information n'est aujourd'hui disponible sur la méthylation du promoteur de *NOTO* ou sur les ARN non codants exprimés par les CNT.

L'absence de cellules *NOTO* positives sous l'influence de l'activation des voies de signalisation pourrait également être due aux conditions de culture. En effet, durant la formation du nœud et de la notochorde, les cellules subissent des contraintes mécaniques liées aux mouvements de migration et de convergence extension [34, 47]. L'utilisation de patrons définis (empreintes géométriques réalisées sur le fond des puits de culture) permettrait peut-être la différenciation des CNT sous influence d'Activin A et de CHIR. Une étude récente rapporte en effet la différenciation en ectoderme, mésoderme et endoderme de cellules ES humaines organisée dans l'espace grâce à ces patrons [556]. Une organisation spatiale a été créée avec la formation d'ectoderme au centre, d'endoderme à l'extérieur et de mésoderme entre l'ectoderme et l'endoderme, rappelant la structure de l'embryon de souris au stade gastrula. Cette technique pourrait permettre de différencier les cellules dans un système *in vitro* plus proche de celui de l'embryon et créer des contraintes

mécaniques potentiellement nécessaires à la formation de la notochorde. Cependant, il est fort probable que la population générée soit hétérogène.

De plus, les CNT ne sont pas arrangées en feuillet dans l'embryon mais sont contenues dans la gaine péri-notochordale. Ce qui implique qu'un système de différenciation en 3 dimensions serait peut-être plus efficace qu'une différenciation en monocouche. L'utilisation d'hydrogel de polysaccharides tels que ceux développés au laboratoire pourrait permettre la différenciation des progéniteurs de mésendoderme en CNT ainsi que le maintien de cette population [557]. Cette stratégie apparaît en effet particulièrement prometteuse car elle permet d'envisager de différencier les cellules iPSC en reproduisant à la fois la structure tridimensionnelle de la gaine et sa composition riche en polysaccharides.

Un des objectifs de cette étude était d'analyser le potentiel rôle du facteur de transcription NOTO dans la différenciation notochordale chez l'homme (modèle *in vitro*). Dans ce contexte, les progéniteurs de mésendoderme ont été transfectés avec des ARN messagers codant pour NOTO pendant 3 jours. L'utilisation d'ARN messagers évite l'intégration du gène d'intérêt au génome et permet une surexpression transitoire de la protéine. Dans le cas du facteur de transcription NOTO, son expression chute après E12.5 chez la souris [42, 558]. L'utilisation d'ARNm permet donc de contrôler et respecter la fenêtre d'expression de ce facteur. Nos données ont démontré que l'expression de *NOTO* est requise pour la différenciation des progéniteurs de mésendoderme en CNT. En effet, l'expression des facteurs *FOXA2*, *T*, *SHH*, *FOXJ1* et *MIXL1* est augmentée dès 24h après transfection de NOTO et est maintenue jusqu'au jour 5. La présence de NOTO maintient la population double positive FOXA2/T jusqu'à 7 jours. En absence de

NOTO, les cellules deviennent soit FOXA2 positives, soit T positives, démontrant leur engagement dans les voies de l'endoderme et du mésoderme respectivement. Afin de préciser le rôle de NOTO dans le maintien de l'identité « mésendoderme », des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées. Nos données montrent, que la surexpression de NOTO maintient les interactions physiques entre FOXA2 et T, qui sont observées dans les progéniteurs de mésendoderme. Ainsi, un des rôles de NOTO pourrait être d'assurer le maintien des complexes FOXA2/T/NOTO, de réguler l'expression de gènes spécifique de la notochorde ou encore de prévenir la différenciation des progéniteurs de mésendoderme en endoderme ou mésoderme. Des analyses complémentaires de CHIP sequencing doivent être réalisées pour confirmer cette hypothèse.

Des mécanismes similaires ont été décrits notamment dans la régulation de la pluripotence. Des interactions physiques entre NANOG, OCT4 et SOX2 créent des boucles de rétrocontrôles assurant la régulation de leur propre expression [472, 475]. Il a été également rapporté une interaction physique entre OCT4 et Forkhead box D3 (FOXD3), facteur notamment impliqué dans la régulation de l'expression de *FOXA1* et *FOXA2*. Ce complexe protéique OCT4/FOXD3 réprime l'expression de *FOXA1* et *FOXA2 in vitro* suggérant que cette interaction maintient le statut pluripotent des cellules [559]. La diminution de l'expression de *OCT4* lève cette inhibition et assure l'expression de *FOXA1* et *FOXA2*. Bien qu'il n'ait pas été prouvé chez l'embryon, ce mécanisme illustre la balance entre pluripotence et différenciation régulée par des interactions physiques entre les facteurs de transcription.

La population de CNT générée après 5 jours de différenciation *in vitro* en présence de CHIR est stable et l'ajout de SHH ou FGF ne semble pas requis. Ces données suggèrent que la transfection des ARNm synthétiques codant pour NOTO pendant

72h et le maintien des cellules en présence de CHIR, reproduit les mécanismes activés lors de la formation de la notochorde chez l'embryon.

Afin d'analyser *in vivo* la fonctionnalité des CNT dérivées d'iPSC, leur greffe latéralement au niveau du tube neural dans des embryons de souris E9.5 est envisagée. L'induction ectopique de l'expression de *FoxA2* et *Shh*, marqueurs du plancher du tube neural, au niveau des cellules greffées démontrerait la fonctionnalité des CNT dérivées d'iPSC. La différenciation des somites en sclérotome attesterait également leur fonctionnalité. Des greffes de notochordes et l'injection de CNT dérivées de cellules ES murines dans des embryons de poulet ont démontré la formation de corps vertébraux autour des notochordes greffée et la formation d'un second plancher du tube neural [491, 560].

Dans ce contexte, nous avons généré des ARNm codant pour NOTO couplé à la GFP permettant à la fois de trier les cellules NOTO positives mais également de visualiser les cellules. Nous avons généré des ARNm bicistroniques dont la séquence codante pour NOTO et GFP est séparée par un peptide de clivage de type P2A [561]. Le clivage de ces peptides est réalisé par les ribosomes lors de la traduction de l'ARNm. L'avantage majeur de l'utilisation de cette technique comparée à l'insertion de séquences IRES (internal ribosome entry site) est leur petite taille (une cinquantaine de nucléotides comparé à environ 500 pour un IRES) [562]. De plus, les deux cadres de lecture NOTO et GFP sont lus par le même ribosome produisant une quantité de protéines synthétisées équivalente [563]. Cependant le clivage de ce peptide ajoute une chaîne de 12 à 22 acides aminés à l'extrémité C-terminale de la première protéine [564].

PARTIE II : Contribution à la médecine régénératrice du DIV
Différenciation des cellules souches pluripotentes induites humaines en CNT

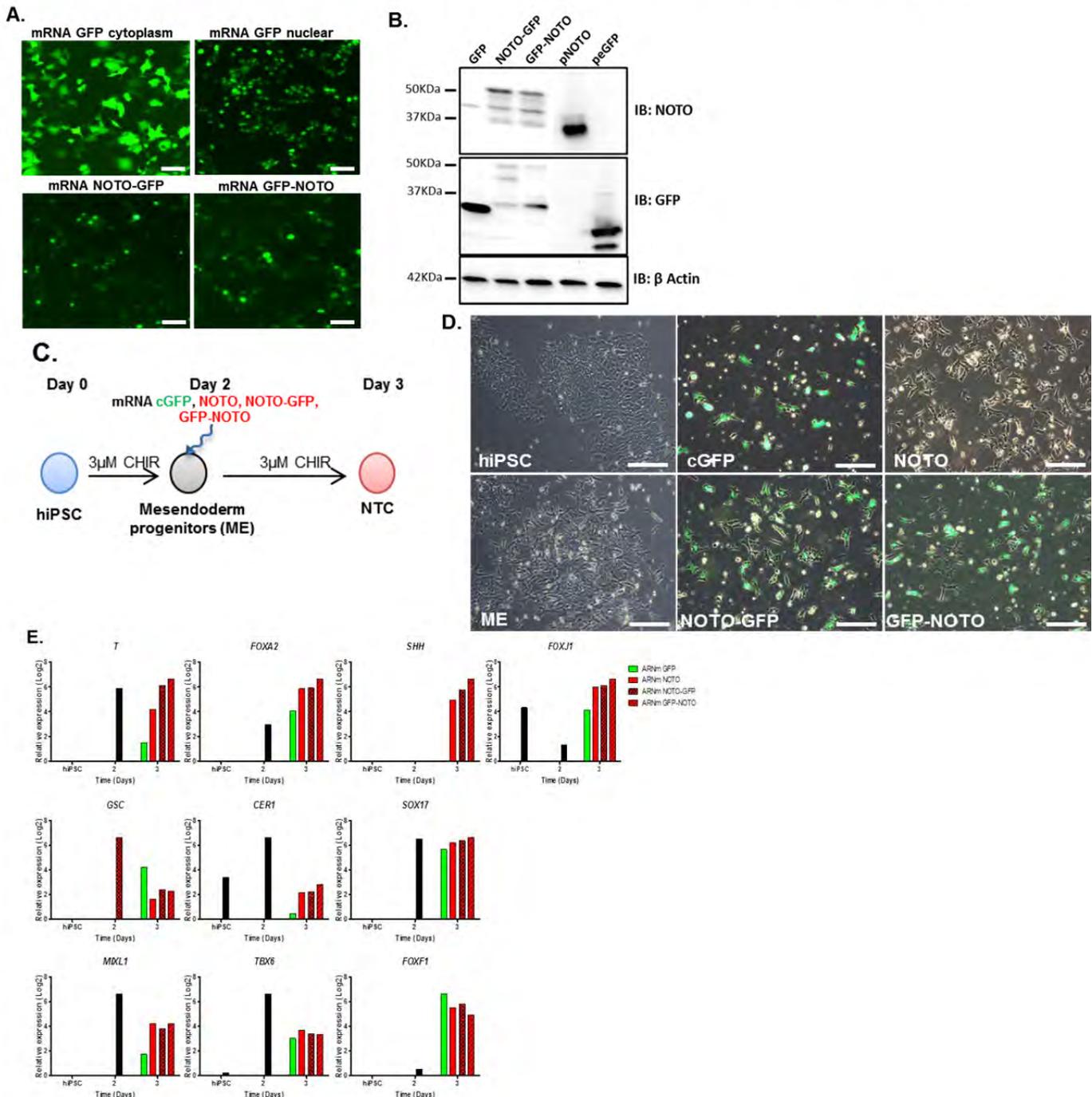


Figure 27 : Validation des ARNm NOTO-GFP et GFP-NOTO. (A.) Images obtenues en microscope à épifluorescence après transfection d'ARNm codant pour la GFP cytoplasmique (cGFP), pour la GFP nucléaire (GFP comprenant un signal d'adressage au noyau), pour NOTO-GFP et pour GFP-NOTO. Barre d'échelle : 200µm. (B.) Analyse par western blot de la production des protéines correspondantes NOTO et GFP. La présence de protéines à 50KDa reflète un défaut de clivage du peptide entre NOTO et GFP. (C.) Schéma de l'expérimentation de validation des ARNm NOTO-GFP et GFP-NOTO. hiPSC : cellules souches pluripotentes induites humaines, ME : progéniteurs de mésendoderme, NTC : cellules notochordales. (D.) Images obtenues en microscopie optique à contraste de phase et épifluorescence. Les images des cellules transfectées avec les ARNm NOTO-GFP et GFP-NOTO montrent une localisation nucléaire de la GFP confirmant les défauts de clivage du peptide entre NOTO et GFP. Barre d'échelle : 400µm. (E.) Analyses de l'expression des marqueurs T, FOXA2, SHH, FOXJ1, GSC, CER1, SOX17, MIXL1, TBX6 et FOXF1 par RT-qPCR. Ces résultats montrent que la transfection des ARNm NOTO-GFP et GFP-NOTO entraîne une réponse similaire des cellules transfectées avec les ARNm NOTO, malgré une faible efficacité de clivage.

Pour s'affranchir des éventuelles modifications de son activité transcriptionnelle, nous avons généré des ARNm GFP-NOTO en plus des ARNm NOTO-GFP. La caractérisation des constructions NOTO-GFP et GFP-NOTO ainsi que leur effet dans la différenciation notochordale des iPSC est illustrée sur la Figure 27.

L'ensemble de cette étude rapporte la possibilité de générer des CNT embryonnaires à partir d'iPSC humaines. La formation d'un complexe protéique composé de FOXA2, T et NOTO a été rapportée et serait à l'origine de l'acquisition de la signature notochordale par les progéniteurs de mésendoderme. Ainsi, l'étape de la formation du nœud a été contournée dans ce protocole de différenciation notochordale. Le caractère embryonnaire et non mature des CNT générées dans cette étude rend leur utilisation en médecine régénératrice du DIV impossible pour le moment. Cependant, grâce à l'établissement de ce modèle *in vitro*, nos recherches sur les processus de maturation et différenciation de la notochorde humaine sont donc envisageables. Ce modèle permettra de comprendre le développement embryonnaire du NP mais également le développement du squelette axial chez l'homme. En effet, la co-culture de CNT embryonnaires avec des cellules mésenchymateuses pourrait permettre d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de la différenciation des somites, de l'ossification endochondrale vertébral et de la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules de l'AF. De plus, l'identification des facteurs sécrétés par des CNT embryonnaires et matures chez l'homme permettrait à la fois de comprendre comment est formé le NP, comment est instauré le dialogue moléculaire et quelles sont les régulations et les réponses cellulaires activées par ce dialogue. Enfin, grâce à ce modèle, nous pouvons également envisager de comprendre les mécanismes à l'origine de la formation des

chordomes chez l'homme et peut-être identifier des cibles thérapeutiques pertinentes.

V- Différenciation nucléopulpogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines

A- Rationnel de l'étude

Bien que les CNT aient un rôle primordial dans l'homéostasie du NP, les NPCytes sont considérés comme les cellules effectrices et ont une capacité de production de MEC très importante. Cette activité sécrétoire est à l'origine de la mise en place de la MEC du NP adaptée à la gestion des contraintes mécaniques. Ainsi, pouvoir disposer de ce second type cellulaire apparaît pertinent pour la restauration du dialogue moléculaire et la régénérescence du NP. Bien que des études cliniques aient déjà utilisé des NPCytes provenant de disques herniés, les capacités de ces cellules à restaurer la fonction du NP n'a pas été rapportée [417, 418]. Le faible nombre de NPCytes isolé à partir de ces disques herniés nécessite une phase d'amplification *in vitro* qui entraîne leur dédifférenciation en fibroblastes [420, 424]. De plus, la capacité de prolifération des NPCytes est faible [565]. Dans ces études cliniques, le phénotype des cellules du NP amplifiées *in vitro* n'a par ailleurs pas été caractérisé. Nous n'avons donc aucune certitude quant au phénotype des cellules injectées et donc quant au potentiel régénérateur de celles-ci.

La différenciation des cellules souches/stromales en NPCytes (différenciation nucléopulpogénique) apparaît donc la stratégie la plus adaptée afin de produire des cellules régénératrices du NP. En effet, Les cellules souches/stromales mésenchymateuses présentent une grande capacité de différenciation et leur utilisation est d'ores et déjà rapportée dans des études cliniques, ce qui en fait des cellules candidates idéales pour la production de NPCytes.

Tableau IV: Marqueurs connus exprimés par les cellules notochordales matures, les nucléopulpecytes et les chondrocytes articulaires sains chez l'homme. + : marqueur exprimé, - : marqueur non exprimé, Ø: absence de distinction entre les CNT et les NPCytes lors des analyses transcriptomiques ND : non déterminé dans la littérature. L'expression de T n'a jamais été formellement démontrée dans les CNT matures chez l'homme. Mais l'expression de T dans les CNT animales et dans les chordomes humains suggèrent une expression maintenue de T après la naissance chez l'homme.

	Gènes	CNT	NPCytes	Chondrocytes Articulaires	Références
Cellulaire	T	+ (animal)	Ø	-	[7, 262, 566]
	CTGF	+	Ø	+	[567, 568]
	CK8/18/19	+	-	-	[7, 566, 569]
	SOX9	Ø	+	+	[7, 566, 570, 571]
	FOXF1	Ø	+	-	[7]
	PAX1	Ø	+	-	[7]
	CA12	Ø	+	-	[7, 566, 572]
	OVOS2	Ø	+	-	[7]
	CD24	Ø	+	-	[7, 263, 265, 569]
	GLUT1	Ø	+	+	[573, 574]
	CDH2	Ø	+	+	[7]
	Matrice extracellulaire	ACAN/ COL2A1	Ø	>20	>3
INTEGRIN A3, A5, B1		+	+	+	[577-580]
PRG4		Ø	+	+	[581]

Alors que les études préliminaires de différenciation nucléopulpogénique ont été réalisées à partir de CSM de moelle osseuse [513, 514], nous nous sommes tournés vers l'utilisation de cellules stromales adipeuses (CSA) pour générer les NPCytes. Ce choix repose sur le nombre de cellules souches environ 100 fois plus important dans le tissu adipeux que dans la moelle osseuse, sur la non-invasivité du prélèvement ainsi que sur leur faible propension à se différencier en cellules hypertrophiques [505, 506]. De par la similarité entre les chondrocytes articulaires et les NPCytes, la différenciation des CSA dans les voies chondrogénique et nucléopulpogénique n'est pas simple à discriminer. Cependant, grâce aux études portant sur la définition des marqueurs spécifiques des NPCytes humains, nous disposons aujourd'hui d'un panel de marqueurs spécifiques, permettant de discriminer les différenciations chondrogénique et nucléopulpogénique à partir de cellules souches/stromales mésenchymateuses. En revanche, la séparation des CNT matures et NPCytes préalablement aux analyses transcriptomiques n'a pas été réalisée dans ces études. Il est donc difficile dans certains cas d'être formel sur l'expression des marqueurs uniquement par les NPCytes ou partagée avec les CNT matures. L'ensemble des marqueurs discriminant les cellules du NP humaines (CNT matures et NPCytes) et les chondrocytes articulaires humains est résumé dans le Tableau IV.

La définition des modalités de différenciation des CSA en NPCytes ne repose pas sur les mécanismes décrits chez l'embryon mais sur les propriétés des CSM à se différencier en cellules capables de sécréter de l'agrécan et du collagène de type II (cellules chondrogéniques). L'utilisation du TGF- β 1 et l'application d'une faible tension en oxygène (5% d'oxygène) lors de la différenciation de CSA a été démontrée indispensable à leur différenciation en cellules exprimant et produisant de

l'agrécan et du collagène de type II [582-584]. Cette activité de synthèse étant commune aux chondrocytes et aux NPCytes, l'analyse de marqueurs spécifiques du NP est essentielle pour discriminer la différenciation chondrogénique de la différenciation nucléopulpogénique. Basés sur une analyse de la littérature, nous avons considéré l'expression des marqueurs *PAX1*, *OVOS2* et *CD24* pour analyser la différenciation nucléopulpogénique des CSA. Nous avons également analysé l'expression des marqueurs *COL2A1* et *ACAN*, communs aux chondrocytes et aux NPCytes. En effet, ce sont les seuls marqueurs indiquant la potentielle fonction des cellules générées. La protéine CA12 étant impliquée dans la réaction de production de bicarbonate à partir de dioxyde de carbone [585], son expression peut être affectée par des modifications de la tension en oxygène au cours de la différenciation, sans refléter l'engagement des cellules dans la voie d'intérêt. Nous n'avons pas, par ailleurs, analysé l'expression des marqueurs partagés par les chondrocytes articulaires et les NPCytes (*PRG4*, *CDH2*, *SOX9* et *GLUT1*).

Afin de différencier les CSA humaines dans la voie nucléopulpogénique, nous nous sommes tournés vers l'utilisation du facteur TGF- β 1 compte tenu de son effet inducteur de l'expression de *COL2A1* et *ACAN* à partir des CSA humaines, et sur celle du facteur GDF5. En effet, les effets positifs du GDF5 observés sur l'activité anabolique des cellules du NP [289, 343, 586] ainsi que les études rapportant l'expression de *KRT19*, *CA12* et *FOXF1* par les CSM de moelle osseuse différenciées en présence de GDF5 [513, 514] suggèrent que ce facteur pourrait avoir un effet positif sur la différenciation des CSA en NPCytes. De plus, l'utilisation du GDF5 dans des études cliniques pour restaurer la fonction du NP renforce cette hypothèse de travail.

Compte tenu de l'ensemble de ces données, nous avons investigué et caractérisé les effets du TGF- β 1 et du GDF5 dans la différenciation nucléopulpogénique des CSA. L'ensemble des données a fait l'objet d'une publication dans le journal Stem Cells. ***Article IV GDF5 and TGF- β 1 act synergistically to drive the differentiation of human adipose stromal cells towards nucleus pulposus-like cells.***

P. Colombier, J. Clouet, C. Boyer, M. Ruel, G. Bonin, J. Lesoeur, A. Moreau, BH. Fella, L. Lescaudron, A. Camus, J. Guicheux. Stem cells

B- Article IV

ARTICLE IV :

GDF5 and TGF- β 1 act synergistically to drive the differentiation human adipose stromal cells towards nucleus pulposus-like cells.

Colombier P, Clouet J, Boyer C, Ruel M, Bonin G, Lesoeur J, Moreau A, Fellah BH, Lescaudron L, Camus A, Guicheux J.

Stem cells, 2015

Résumé :

La dégénérescence discale affecte précocement la partie centrale du disque intervertébral (DV) appelée le *Nucleus pulposus* (NP). La dégénérescence discale est à l'origine de 40% des lombalgies et est caractérisée par une disparition des cellules résidentes. Ainsi, supplémenter le NP en cellules régénératrices semble être une stratégie thérapeutique prometteuse et représente à l'heure actuelle un réel défi. Les objectifs de cette étude ont été de développer et d'évaluer l'efficacité d'un protocole de différenciation basé sur l'utilisation de facteurs de croissance sur l'engagement des cellules stromales adipeuses humaines (CSA) dans la voie nucléopulpogénique. De plus, l'implication des voies de signalisation Smad a été étudiée. Nous avons démontré dans cette étude que les facteurs TGF- β 1 et GDF5 agissent de façon synergique pour la différenciation nucléopulpogénique des CSA humaines. La comparaison des profils d'expression des cellules générées à partir de CSA humaines avec des cellules de NP humaines saines a démontré la spécificité de l'engagement des CSA dans la voie nucléopulpogénique. De plus, ces cellules sécrètent une matrice extracellulaire riche en agrécan et en collagène de type II, comparable aux cellules natives. Nous avons également démontré que ces cellules survivent, maintiennent leur phénotype spécialisé ainsi que leur activité sécrétoire après transplantation sous cutanée chez des souris *nude*. Enfin, nous avons démontré que l'activation de la voie Smad2/3 contrôle l'acquisition de l'identité de type « NP » tandis que la voie Smad1/5/8 est impliquée dans l'acquisition de la morphologie semblable aux NPCytes natifs. Ces avancées offrent de nouvelles perspectives pour la médecine régénératrice du DIV basée sur la restauration des fonctions NP.

TGF- β 1 and GDF5 Act Synergistically to Drive the Differentiation of Human Adipose Stromal Cells toward *Nucleus Pulposus*-like Cells

PAULINE COLOMBIER,^{a,b} JOHANN CLOUET,^{a,b,c,d} CÉCILE BOYER,^{a,b} MAËVA RUEL,^{a,b} GAËLLE BONIN,^{a,b} JULIE LESOEUR,^{a,b} ANNE MOREAU,^{e,f} BORHANE-HAKIM FELLAH,^{a,b,g} PIERRE WEISS,^{a,b,h} LAURENT LESCAUDRON,^{a,b,i} ANNE CAMUS,^{a,b} JÉRÔME GUICHEUX^{a,b,h}

Key Words. Intervertebral disc • Regenerative medicine • Stem cells • Smad-driven nucleopulpo-genic differentiation

^aINSERM UMRS 791, Laboratoire d'Ingénierie Osteo Articulaires et Dentaire (LIOAD), Nantes, France; ^bUniversité de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, France; ^cUniversité de Nantes, UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Nantes, France; ^dCHU Nantes, Pharmacie Centrale, PHU 11, Nantes, France; ^eUniversité de Nantes, UFR Médecine, Nantes, France; ^fCHU Nantes, Service d'Anatomopathologie, Nantes, France; ^gCRIP, Centre de Recherche et d'Investigations Précliniques, ONIRIS, Nantes, France; ^hCHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, France; ⁱUniversité de Nantes, UFR Sciences et Techniques, Nantes, France

Correspondence: Jérôme Guicheux, Ph.D., INSERM UMRS 791, LIOAD, UFR Odontologie, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France. Telephone: 33-240-412-919; Fax: 33-240-083-712; e-mail: jerome.guicheux@inserm.fr; Anne Camus, Ph.D., INSERM UMRS 791, LIOAD, UFR Odontologie, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France. Telephone: 33-240-412-943; Fax: 33-240-083-712; e-mail: anne.camus@univ-nantes.fr

Received December 17, 2014; accepted for publication October 9, 2015; first published online in STEM CELLS EXPRESS December 11, 2015.

© AlphaMed Press 1066-5099/2015/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.2249>

ABSTRACT

Degenerative disc disease (DDD) primarily affects the central part of the intervertebral disc namely the nucleus pulposus (NP). DDD explains about 40% of low back pain and is characterized by massive cellular alterations that ultimately result in the disappearance of resident NP cells. Thus, repopulating the NP with regenerative cells is a promising therapeutic approach and remains a great challenge. The objectives of this study were to evaluate the potential of growth factor-driven protocols to commit human adipose stromal cells (hASCs) toward NP-like cell phenotype and the involvement of Smad proteins in this differentiation process. Here, we demonstrate that the transforming growth factor- β 1 and the growth differentiation factor 5 synergistically drive the nucleopulpo-genic differentiation process. The commitment of the hASCs was robust and highly specific as attested by the expression of NP-related genes characteristic of young healthy human NP cells. In addition, the engineered NP-like cells secreted an abundant aggrecan and type II collagen rich extracellular matrix comparable with that of native NP. Furthermore, we demonstrate that these *in vitro* engineered cells survived, maintained their specialized phenotype and secretory activity after *in vivo* transplantation in nude mice subcutis. Finally, we provide evidence suggesting that the Smad 2/3 pathway mainly governed the acquisition of the NP cell molecular identity while the Smad1/5/8 pathway controlled the NP cell morphology. This study offers valuable insights for the development of biologically-inspired treatments for DDD by generating adapted and exhaustively characterized autologous regenerative cells. STEM CELLS 2015; 00:000–000

SIGNIFICANCE STATEMENT

In the present manuscript, we investigated whether human adipose stromal cells (hASCs) can be a clinically relevant source of stem cells for the generation of phenotypically stable and biologically active NPCyte-like cells. We successfully generated NPCyte-like cells from hASCs using a reproducible, robust and accurate growth factor-based induction protocol. We also demonstrated by experimental organogenesis in nude mice subcutis, that NPCyte-like cells seeded in an instructive hydrogel survived, maintained their specialized phenotype and presented secretory activities *in vivo*. In addition to highlighting the robustness and reproducibility of our protocol, we also document the temporal role of Smad pathways towards NP commitment by using specific chemical inhibitors. These data strengthen the specificity of the NP cell commitment by demonstrating new insights into the role of Smad proteins.

INTRODUCTION

The nucleus pulposus (NP) is the central part of the intervertebral disc (IVD) and plays a key role in the management of biomechanical overload of the spine. Recent lineage tracing studies in the mouse have shown that NP cells are derived from the embryonic notochord [1, 2]. At birth, two cell types populate the NP:

notochord cells (NTCs) and nucleopulpo-cytes (NPCytes). A natural growth and maturation process occurs during childhood that is marked by the progressive depletion of NTCs. This disappearance of NTCs is concomitant with the appearance of the resident mature NPCytes [3, 4]. The NPCyte phenotype has been elucidated and a comprehensive molecular signature including *PAX1*, *OVOS2*, *CD24*, *CA12*, *ACAN*,

and *COL2A1* markers has been provided to accurately distinguish the human NPCyte phenotype from that of articular chondrocytes [5]. The NPCytes are considered the executive cells of the NP responsible for the production of a highly hydrated extracellular matrix (ECM). This ECM is mainly composed of type II collagen and aggrecan, a proteoglycan with numerous chains of anchored sulfated glycosaminoglycans (SGAG). With aging, NPCytes progressively become less proliferative, more subject to apoptotic cell death and less prompt to produce ECM [6, 7]. This alteration of NPCytes survival and activity is considered one of the primary events that initiate an irreversible degenerative cascade in the NP ultimately leading to the loss of IVD biomechanical properties. This degenerative cascade is marked by the production of inflammatory cytokines by NPCytes that enhances ECM-degrading enzyme activity [8–10]. This degenerative disc disease (DDD) is recognized as being the first cause of low back pain (LBP), which triggers major disabilities worldwide [11]. Current treatments of discogenic LBP are only symptomatic and do not address etiological issues. The recent improvement of our fundamental knowledge on IVD degeneration, however, enables us to develop biologically inspired therapies to address DDD earlier in the degenerative cascade. In this context, the supplementation of the NP with regenerative cells has already been investigated. Clinical studies with intradiscal injections of undifferentiated autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) have revealed benefits for both pain relief and IVD hydration [12–14]. In vitro cell commitment before transplantation has thereafter been proposed to improve stem cell regenerative potential. Among the relevant strategies, one may reside in the development of a safe growth factor-driven differentiation protocol to produce regenerative NPCyte-like cells. BM-MSCs have been widely contemplated for the regeneration of skeletal tissues [15]. In contrast, only a limited number of studies have examined the use of BM-MSCs to generate NPCyte-like cells [16, 17]. Adipose tissue is an accessible source of multipotent stromal cells that can differentiate into a wide range of cell types [18–20]. Results from two independent studies have suggested that human adipose stromal cells (hASCs) could be more suitable than BM-MSCs to generate NPCyte-like cells [5, 21]. To address the clinical issue of disc degeneration, the development of a reproducible protocol that differentiates hASCs toward cells with a defined NPCyte identity and biological activity remains however a prerequisite.

Analysis of transforming growth factor β (TGF- β) receptor II knockout mice has highlighted that this signaling pathway plays a role in the development of IVD [22]. TGF- β 1 has also been shown to stimulate the anabolic activities of human NPCytes by up-regulating the expression of *COL2A1* and *ACAN* genes [23]. In addition, TGF- β 1 has been shown to trigger the expression of *ACAN* and *COL2A1* by hASCs in vitro upon low oxygen concentration [24, 25]. The growth differentiation factor 5 (GDF5) belongs to the bone morphogenetic protein (BMP) family of the TGF- β superfamily and has been shown to be involved in IVD growth and homeostasis [26, 27]. It has also been demonstrated that GDF5 is expressed in human NP cells (hNP cells) and stimulates their anabolic activities by increasing type II collagen and aggrecan synthesis [28]. In addition, two clinical trials investigating the therapeutic effect of a single intradiscal injection of GDF5 are currently ongoing

(<https://clinicaltrials.gov>, cases NCT01182337 and NCT01124006). Finally, two studies have suggested a potential effect of GDF5 in the differentiation of BM-MSCs toward the NP cell lineage [16, 17]. Considering the respective role of the growth factors TGF- β 1 and GDF5 in IVD biology and in human MSC differentiation, we postulate that they could cooperatively support the generation of NPCytes-like cells from hASC. Thus, the first goal of this study was to examine the effects of the combination of TGF- β 1 and GDF5 factors on the hASC fate decision and nucleopulogenic differentiation. Second, we addressed the in vivo biological activity of the engineered NPCytes by assessing their behavior after transplantation in nude mice subcutis. Finally, we aimed to gain new insights into the differentiation mechanisms by deciphering the respective role of Smad2/3-mediated TGF- β 1 and Smad1/5/8-mediated GDF5 signaling.

MATERIALS AND METHODS

In Vitro Experiments

hASC Isolation and Culture. hASCs were isolated from lipoaspirates obtained from nine different patients (aged 26–67 years with an average body mass index of 25.7 ± 1.33) who had given their informed consent. Lipoaspirates were treated as described previously [29, 30] and the phenotype of collected cells was characterized at passage 2 by flow cytometry using anti-CD105, -CD73, -CD90, -CD45, and -CD34 antibodies. Cells were positive for CD105, -73, and -90 and negative for CD34 and -45 as previously reported [30]. For all the subsequent experiments, hASCs were used at passage 2.

Human NP Cells Isolation. Native hNP cells were isolated from four healthy NPs of a 12-years-old patient. Briefly, NP tissue was dissected and enzymatically digested by hyaluronidase (0.05%, H4272, Sigma-Aldrich/Saint-Louis/Missouri/www.sigmaaldrich.com) at 37°C for 15 minutes, then by trypsin (0.2%, T9935, Sigma-Aldrich) for 30 minutes and by type II collagenase (0.2%, C5138, Sigma-Aldrich) for 1 hour as previously reported [31]. Isolated cells were immediately homogenized in lysis buffer before total RNA isolation.

hASC Differentiation. For hASC differentiation, 5×10^5 cells were seeded in 15 ml polypropylene tubes, centrifuged at 250g for 5 minutes and placed in a humid chamber at 37°C with 21% O₂ for 48 hours in the presence of amplification medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 1% Penicillin/Streptomycin (P/S). After 48 hours, hASC pellets were formed and immediately lysed or fixed for reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and histological analyses (day 0 condition), respectively, or cultivated without FCS upon 5% oxygen concentration during the indicated differentiation times. Distinct experimental conditions were examined. The control group was cultivated in the presence of a basic medium (BM) composed of DMEM supplemented in 1% P/S, sodium L-ascorbate (50 nM, A4034, Sigma-Aldrich), and human insulin-transferrin-sodium selenite (6.25 μ g/ml, 6.25 μ g/ml, 6.25 ng/ml, I1884-1VL, Sigma-Aldrich). For the BM TGF- β 1 condition, the BM was supplemented with recombinant human TGF- β 1 (10 ng/ml,

100-21, Peprotech/Rocky Hill/New Jersey/www.peprotech.com), while in the BM GDF5 condition, the BM was supplemented with recombinant human GDF5 (100 ng/ml, 120-01, Peprotech). The BM TGF- β 1+GDF5 medium was composed of BM supplemented with both growth factors at the same concentration. The latter conditions were also supplemented with dexamethasone (DEX; 10^{-8} M, D4902, Sigma-Aldrich) and referred to as chondrogenic medium (CHM) for BM TGF- β 1 DEX or nucleopulpo-genic medium (NPM) for BM TGF- β 1+GDF5 DEX. For the inhibition of Smad2/3 and Smad1/5/8 phosphorylation, hASCs were cultivated in the NPM supplemented with SB505124 or dorsomorphin (5 μ M, S4696 and P5499, respectively, Sigma-Aldrich). SB505124 blocks the kinase domains of ALK4, -5, and -7, thereby preventing Smad2/3 phosphorylation and dorsomorphin blocks the kinase domains of ALK1, -2, -3, and -6, thereby preventing Smad1/5/8 phosphorylation.

Gene Expression Analyses. Ten pellets (5×10^5 cells/pellet) per condition were homogenized in lysis buffer and total RNA was prepared using the Nucleospin RNA isolation kit (Macherey Nagel/Hoerd/ France/www.mn-net.com). Five hundred nanograms of total RNA were retrotranscribed (SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Life Technologies/Carlsbad/California/www.lifetechnologies.com). PCR analysis of the target genes was performed on 15 ng of cDNA using TaqMan gene expression assays and on 2 ng of cDNA using custom TaqMan low-density arrays (Applied Biosystems/Foster City/California/www.appliedbiosystems.com). NCBI reference sequences and TaqMan references of the analyzed genes are summarized in the Supporting Information Table 1. Relative quantification was determined using the Livak method ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Cq}$) and represented using a base 2 logarithm. For the assessment of the specificity of the chondrogenic and nucleopulpo-genic commitment (Fig. 4), the level of gene expression was quantified using the Livak method ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Cq}$ with $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{CHM}$ or $NPM - \Delta Cq_{BM}$) and represented using a base 10 logarithm. Peptidyl-prolyl Isomerase A (*PPIA*) gene was used as an internal reference for normalization.

Histology and Immunohistochemistry. Alcian blue staining was performed on whole pellets by incubating them overnight with alcian blue (0.1%, Sigma-Aldrich) in HCl (0.1M, Sigma-Aldrich). Pellets were considered as spheres, and their volume was calculated using the following formula: $volume = 4/3\pi r^3$ with r = radius of pellet.

Pellets of cultured hASCs, explants collected from nude mice subcutis or the NP of a 11-year-old patient were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS, Life Technologies). Four micrometer paraffin sections of pellets and explants were prepared and stained with alcian blue and Masson's trichrome, as described previously [32]. For each patient, alcian blue stained surface was quantified by using Fiji software over four areas per pellet for a total surface equivalent of 0.8 mm^2 . Cellular density was determined by counting counterstained nuclei over two areas per pellet for a total surface equivalent of 0.4 mm^2 .

Immunohistochemical reactions against type II collagen and aggrecan were conducted as previously published [30]. In the immunochemical reactions, antigen retrievals were per-

formed using 0.01 M citrate buffer for 20 minutes at 95°C for OVOSTATIN 2 and PAX1, 1 mM EDTA pH 9.0 for 20 minutes at 95°C for CD24, and 0.01 M citrate buffer for 2 hours at room temperature for P-Smad2, P-Smad1/5/8. Sections were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies for OVOSTATIN 2 (1:400 dilution, Ab110548, Abcam/Cambridge/United Kingdom/www.abcam.com), PAX1 (1:300 dilution, NBP1-19767, Novus Biologicals/Littleton/Colorado/www.novusbio.com), P-Smad2 (1:200 dilution, 3101, Cell Signaling Technology/Danvers/Massachusetts/www.cellsignal.com), P-Smad1/5/8 (1:200 dilution, 9511, Cell Signaling Technology), and CD24 (1:20 dilution, LS-C87659, LSbio/Seattle/Washington/www.lsbio.com). Biotinylated goat anti-rabbit and goat anti-mouse secondary antibodies (1:300 dilution, E0432 and E0433 respectively, Dako/Les Ulis/France/www.dako.com) were used. Staining was performed using a diaminobenzidine chromogen. For each differentiation condition, the positive P-Smad2 and P-Smad1/5/8 staining fraction was calculated over two areas per pellet for a total surface equivalent of 0.4 mm^2 per patient.

Western Blotting. Confluent hASCs were placed in a humid chamber at 37°C with 21% O_2 for 12 hours in the presence of DMEM supplemented in 1% P/S and 0.5% fetal bovine serum and then stimulated with TGF- β 1 (10 ng/ml) or GDF5 (100 ng/ml) alone or in combination. As positive controls, hASCs were stimulated during 30 minutes with BMP2 (100 ng/ml, PHC7145, Invitrogen/Carlsbad/California/www.thermofisher.com) for P-Smad1/5/8, 2 hours with Activin A (100 ng/ml, 120-14, Peprotech) for P-Smad2, 30 minutes with inorganic phosphate (10 mM) for P-Erk and UV treatment for P-p38 and P-jnk. Following stimulation with either reagent, cells were lysed by adding RIPA buffer (50 mM TrisHCl pH8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Na}$, and 0.1% $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich). Thirty micrograms of total proteins were resolved in PROTEAN TGX polyacrylamide gels and proteins were transferred to a PVDF membrane (Biorad/Hercules/California/www.bio-rad.com). Primary antibodies for P-Smad2, P-Smad1/5/8, P-Erk P-p38, and P-jnk (1:1,000 dilution, 9511, 3101, 9101, 9211, and 9251, respectively, Cell Signaling Technology) were detected using goat anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibodies (1:2,000 dilution, 7074, Cell Signaling Technology). Primary antibodies for β -Actin (1:5,000 dilution, A5316, Sigma-Aldrich) were detected using goat anti-mouse HR-conjugated secondary antibodies (1:80,000 dilution, A9917, Sigma-Aldrich). The blots were visualized by enhanced chemiluminescence development using the ChemiDoc MP System (Biorad).

Statistical Analyses. Data are represented by compiling the results for each patient. Statistical significance was assessed by the non-parametric Kruskal-Wallis test. Significance was determined with a p -value ≤ 0.05 . The high number of parameters ($n = 3$) and the low number of patient ($n = 3$) prevented us to perform statistical analysis for NPCytes marker expression study (Fig. 2) and for the P-Smad quantification analysis (Fig. 6).

In Vivo Experiments

Mice. In vivo transplantations were performed using female nude mice at 5 weeks of age. The animal experiments were approved by the European Community guidelines for the care, accommodation, and use of laboratory animals (01310.02).

Preparation of Si-HPMC. Silanized hydroxypropylmethylcellulose (Si-HPMC) powder was synthesized by grafting 14.24% GPTMS onto E4M-Methocel (Dow Chemical Compagny supplied by Colorcon/Dartford/United Kingdom/www.colorcon.com) in heterogeneous process as described previously [33]. Si-HPMC powder (3% w/v) was solubilized in 0.2 M NaOH under constant stirring for 48 hours. To allow the formation of a reticulated hydrogel, the solution was mixed with 0.5 volume of 0.26 M HEPES buffer. The final product was a viscous liquid at pH 7.4, which allowed cell incorporation. Cell/Si-HPMC hydrogel mixture cross-linking occurred within 30 minutes, as described previously [34].

NPCytes-Like Cell Isolation. After 21 days of differentiation, hASCs pellets were rinsed with PBS before enzymatic digestion with the crude type 1A collagenase (0.5 mg/ml) for 1.5 hours at 37 °C under gentle agitation. The digest product was filtered through a 70- μ m nylon mesh filter and then centrifuged at 250g for 5 minutes. A total of 2×10^6 cells were collected in 20 μ l of PBS.

Cell/Si-HPMC Hydrogel Mixture Transplantation. General anesthesia was obtained in an induction chamber with isoflurane (2%) delivered in O₂ and prolonged through an individual mask. Cells were mixed with Si-HPMC at 4×10^6 cells per milliliter and two subcutaneous injections (250 μ l) were performed on the lateral back of the mice. A group of five animals was used for the BM condition and two groups of eight animals were used for the CHM and NPM conditions. After 6 weeks of implantation, mice were euthanized by an overdose of CO₂. Implants were collected and histology and immunohistochemistry analysis were performed as described above.

RESULTS

TGF- β 1 and GDF5 Combination for the Nucleopulogenic Differentiation of hASCs

To address whether a combination of TGF- β 1 and GDF5 favors the nucleopulogenic differentiation of hASCs, we compared the ability of ASCs isolated from two patients to differentiate in the presence of defined culture media. After 28 days of differentiation in 5% oxygen concentration, the presence of sGAG was analyzed in hASC pellets obtained in distinct media. Basic medium (BM) composed of sodium l-ascorbate and human insulin-transferrin-sodium selenite did not induce sGAG production by hASCs. The results also showed that the culture of hASCs in BM enriched with TGF- β 1 or with GDF5 alone or in combination induced a slight sGAG synthesis. DEX is a glucocorticoid that is known to promote the growth factor-induced chondrogenesis of MSCs in vitro [35]. Its potential effect on nucleopulogenic differentiation of hASCs

was analyzed. hASCs cultivated in the BM enriched with either TGF- β 1 or GDF5 alone, supplemented or not with DEX, produced a comparable level of sGAG. In contrast, pellets of hASCs cultivated in the presence of the BM containing both TGF- β 1 and GDF5 and supplemented with DEX produced the highest amount of sGAG. A strong peripheral sGAG accumulation was observed in these hASC pellets after 28 days of differentiation (Fig. 1A).

These observations were confirmed on hASC pellet sections stained with alcian blue (Fig. 1B). The combination of both TGF- β 1 and GDF5 in the presence of DEX directed hASC differentiation toward highly sGAG secreting cells. In addition, we noted an obvious change in cell morphology in this condition (Fig. 1B). Cells were large and anchored within a capsule.

To decipher the effect of TGF- β 1 and GDF5 on hASCs differentiation, cells from two patients were then cultured in four different conditions including BM, BM TGF- β 1 DEX, BM GDF5 DEX, and BM TGF- β 1+GDF5 DEX. In addition to the quantification of sGAG accumulation, we monitored the expression of specific NPCyete transcripts including *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1* (Fig. 1C, 1D). The quantification of the alcian blue staining in the BM or in the BM GDF5 DEX condition revealed that less than 0.01 mm² of pellet section was alcian blue positive (Fig. 1C). In addition, low levels of NPCyete-related transcripts were detected in both conditions (Fig. 1D). In the BM TGF- β 1 DEX condition, the quantification of sGAG accumulation showed that 0.025 mm² of pellet section was stained with alcian blue. An increased expression of the two chondrogenic markers *COL2A1* and *ACAN* was observed as previously reported [32]. The expression of *CD24* transcript was also induced. In contrast, in the BM TGF- β 1+GDF5 DEX condition, the quantification revealed that 0.045 mm² of pellet section was stained. Moreover, the expression of the five NPCyete-related markers was strongly increased. These results clearly indicated a synergistic effect of the combination of TGF- β 1 and GDF5 on hASCs nucleopulogenic differentiation.

According to this first set of experiments, this differentiation medium will hereafter be referred to as nucleopulogenic medium (NPM) for all the subsequent experiments and compared with the BM enriched with TGF- β 1 and DEX referred to as standard CHM.

To further distinguish and characterize the nucleopulogenic differentiation of hASCs, a time course analysis of the differentiation of hASCs was thus performed in the three conditions: BM, CHM and NPM (Fig. 2). The culture of hASCs in the BM did not show sGAG synthesis and the level of NPCyete-related transcripts remained comparable with D0 (Fig. 2A, 2B). In the CHM condition, the differentiating cells produced a substantial level of sGAG from day 14 accompanied with the increased expression of *ACAN* (at day 7) and *COL2A1* (at day 14). Differentiated cells exhibited the previously described cell morphology from day 21. It was also noted that *CD24* and *OVOS2* transcripts were induced from day 14, whereas *PAX1* expression was stable. Interestingly, in the NPM condition, sGAG synthesis was detected as early as day 7 and a high accumulation was observed from day 14. In addition, differentiating cells expressed high levels of *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, and *OVOS2* from day 14 and *PAX1* from day 21. Together these results demonstrated that the culture of

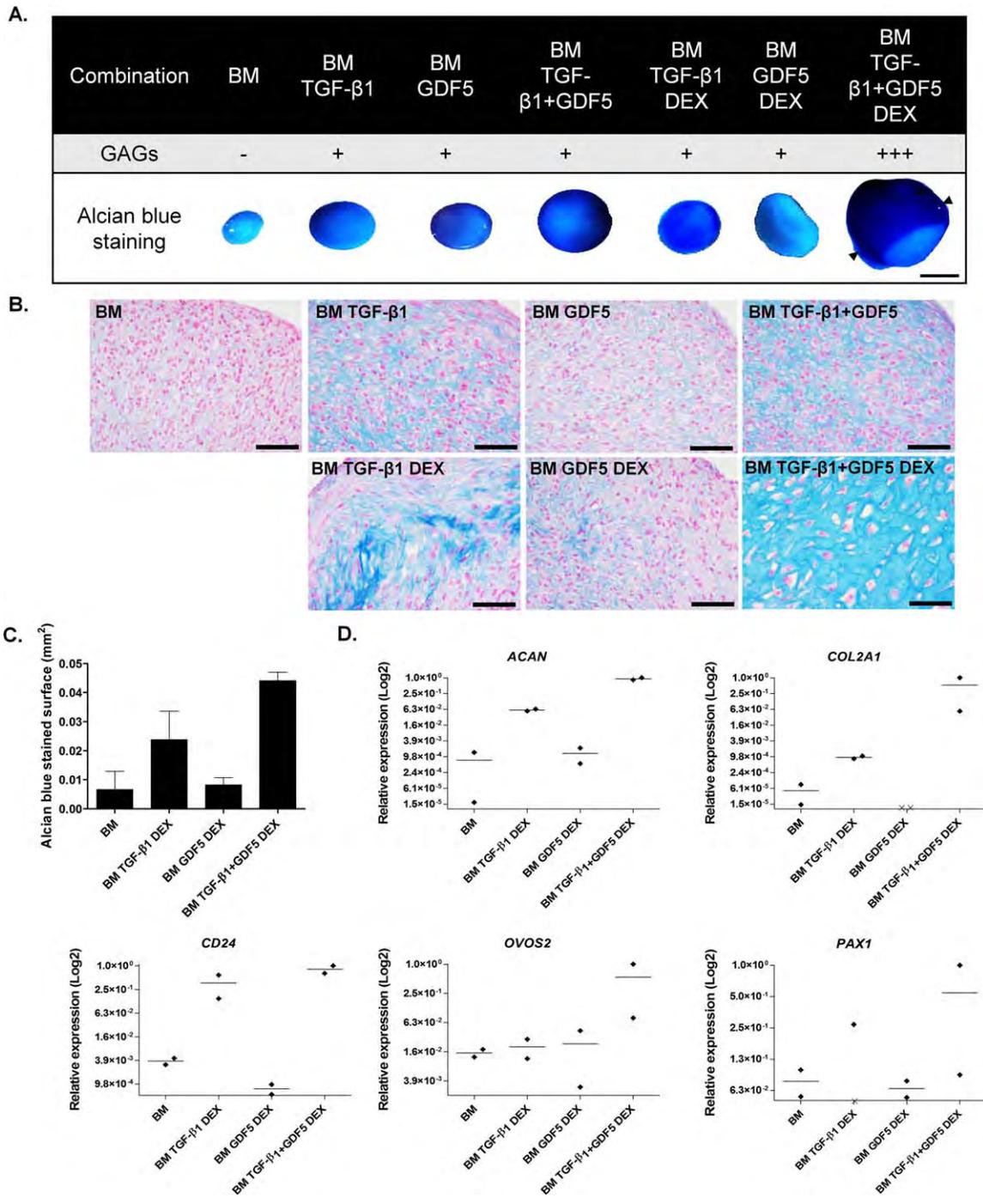


Figure 1. Human adipose stromal cell (hASC) differentiation in various combinations of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), growth differentiation factor 5 (GDF5), and dexamethasone (DEX). hASCs derived from patients 1 and 2 were cultivated in the presence of the basic medium enriched with TGF- β 1, GDF5, and DEX (one representative patient) for 28 days. **(A)**: Whole pellets were stained with alcian blue. Black arrowheads indicate the peripheral crown of hASC pellets cultivated with TGF- β 1, GDF5, and DEX. Scale bar = 1 mm. **(B)**: Pellets were histologically prepared and sectioned for alcian blue staining. Scale bar = 100 μ m. hASCs derived from patients 2 and 3 were cultivated in the presence of the BM, the BM TGF- β 1 DEX, BM GDF5 DEX, and the BM TGF- β 1+GDF5 DEX for 28 days. **(C)**: The surface stained for alcian blue was quantified in hASCs pellets. **(D)**: The expression of *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1* was analyzed by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction. Black crosses on the x-axis represent a Cq value > 38 cycles. Abbreviations: BM, basic medium; DEX, dexamethasone; GAG, glycosaminoglycan; GDF5, growth differentiation factor 5; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

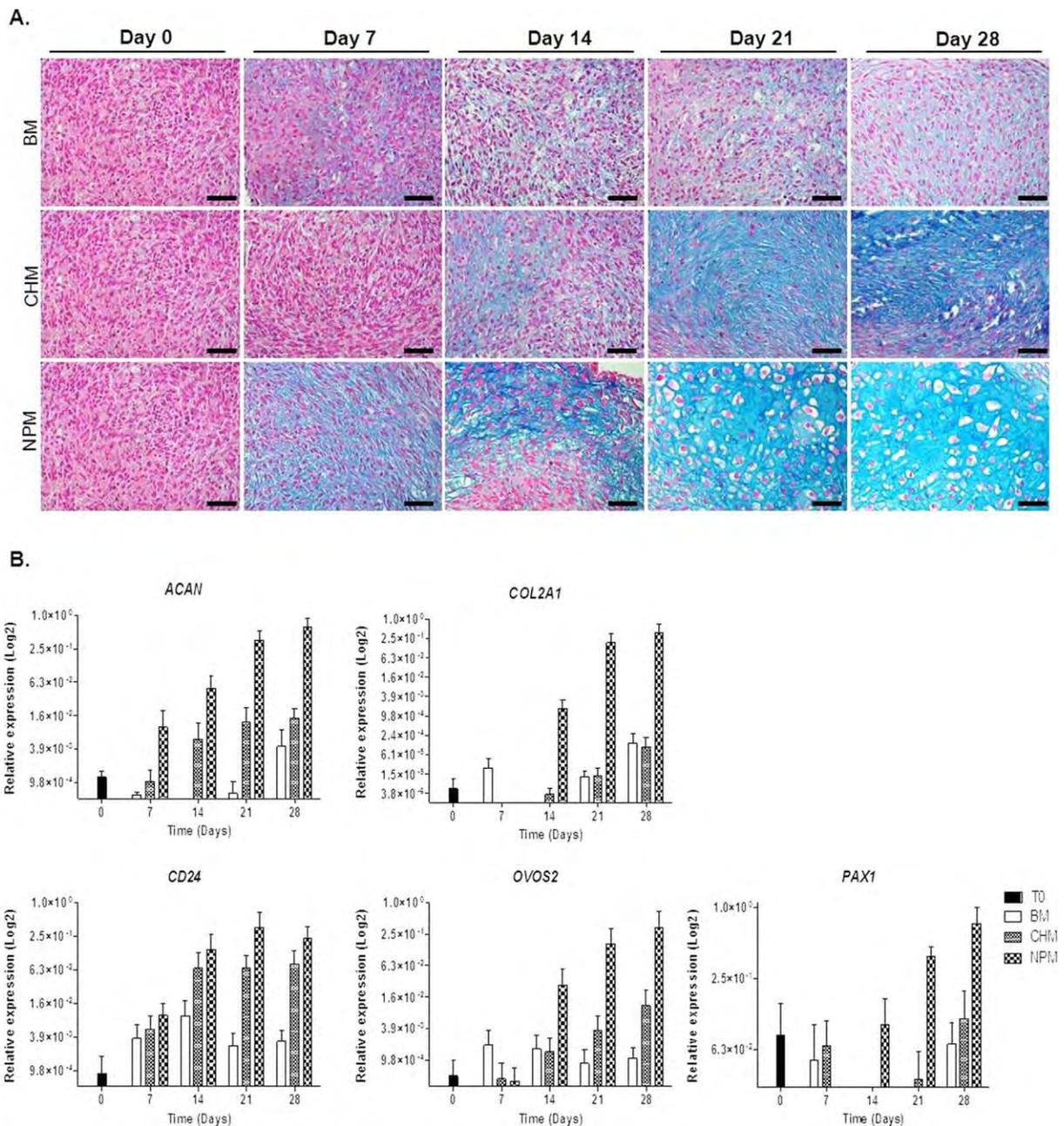


Figure 2. Time course analysis of the chondrogenic and nucleopulpopogenic differentiation of human adipose stromal cells (hASCs). hASC pellets from patients 2, 3, and 4 were cultivated in the presence of basic medium, chondrogenic medium, and nucleopulpopogenic medium for the times indicated. **(A):** Pellets were histologically prepared and sectioned for alcian blue staining. Scale bar = 100 μ m. **(B):** The expression of *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1* was analyzed using the Taqman low-density array. Abbreviations: BM, basic medium; CHM, chondrogenic medium; NPM, nucleopulpopogenic medium; TO, time of pellet formation.

hASCs in the NPM condition induced a cell differentiation process distinguishable from the chondrogenic condition.

Reproducible and Specific Generation of NP-Like Cells from hASCs

To further characterize the robustness of nucleopulpopogenic differentiation, we analyzed the reproducibility and the specificity of the nucleopulpopogenic differentiation protocol. hASCs from patient 4, 5, 6, and 7 were cultivated for 28 days in the presence of the BM, CHM, and NPM (Fig. 3). We observed that the culture of hASCs in the presence of BM did not

induce the expression of *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1*, while the expression of *ACAN* and *COL2A1* was significantly increased in the CHM condition. A significant increase in *CD24* expression was also noted in the CHM condition, as recently reported [36]. Confirming the results obtained with the first patients, hASCs cultivated in the NPM condition expressed significantly higher levels of *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1* transcripts even though inter-individual variability was found (Fig. 3A). Interestingly, the level of NPCytes-related markers expression in hASCs cultivated in the NPM condition was found similar to the expression levels measured

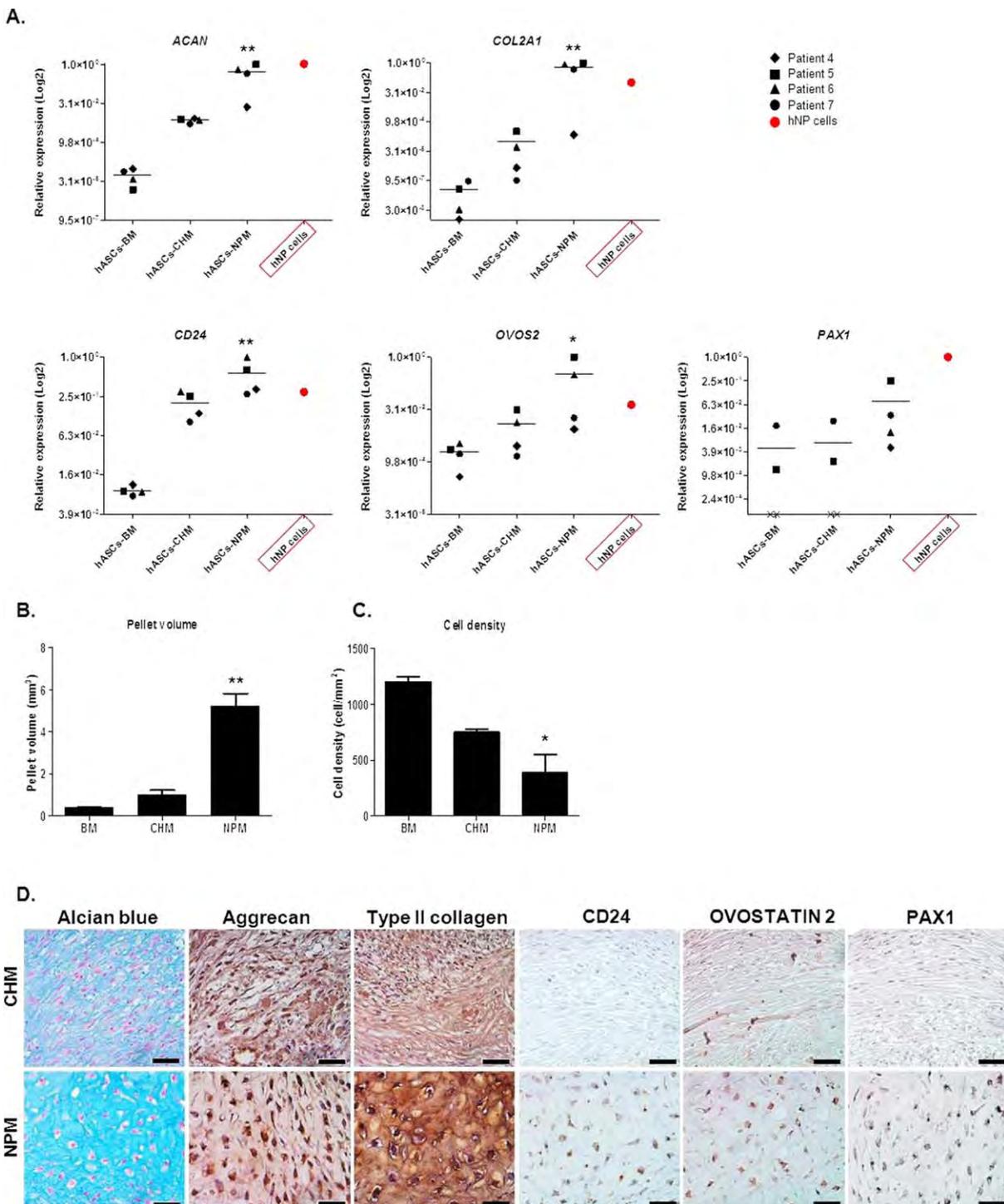


Figure 3. Reproducibility of the nucleopulpopogenic differentiation of human adipose stromal cells (hASCs). hASC pellets from patients 4, 5, 6, and 7 were cultivated in the presence of basic medium (hASC-BM), chondrogenic medium (hASC-CHM), and nucleopulpopogenic medium (hASC-NPM) for 28 days. **(A):** The expression of *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1* was analyzed in the three hASC-cultivated conditions and in native human nucleus pulposus cells (represented by a red circle) using the Taqman low-density array. *, $p \leq 0.05$ versus BM and **, $p \leq 0.01$ versus BM. Relative expression was represented when Cq value < 38 cycles. **(B):** The volume of the BM-, CHM-, and NPM-derived hASC pellets was measured. **, $p \leq 0.01$ versus BM. **(C):** The cell density was measured in BM-, CHM-, and NPM-derived hASC pellets. *, $p \leq 0.05$ versus BM. **(D):** Pellets were histologically prepared, stained with alcian blue, and immunostained for aggrecan, type II collagen, CD24, OVOSTATIN 2, and PAX1. Scale bar = 100 μm . Abbreviations: BM, basic medium; CHM, chondrogenic medium; hASC, human adipose stromal cell; hNP, human nucleus pulposus; NPM, nucleopulpopogenic medium.

in native hNP cells isolated from healthy hNPs. hASC pellets cultivated with NPM were 10 times larger than pellets cultivated in the BM (Fig. 3B), while cellular density was lower in

the NPM condition compared with the BM (Fig. 3C). High ECM accumulation likely accounts for the increase in pellet volume in the NPM condition. The phenotype of the BM-,

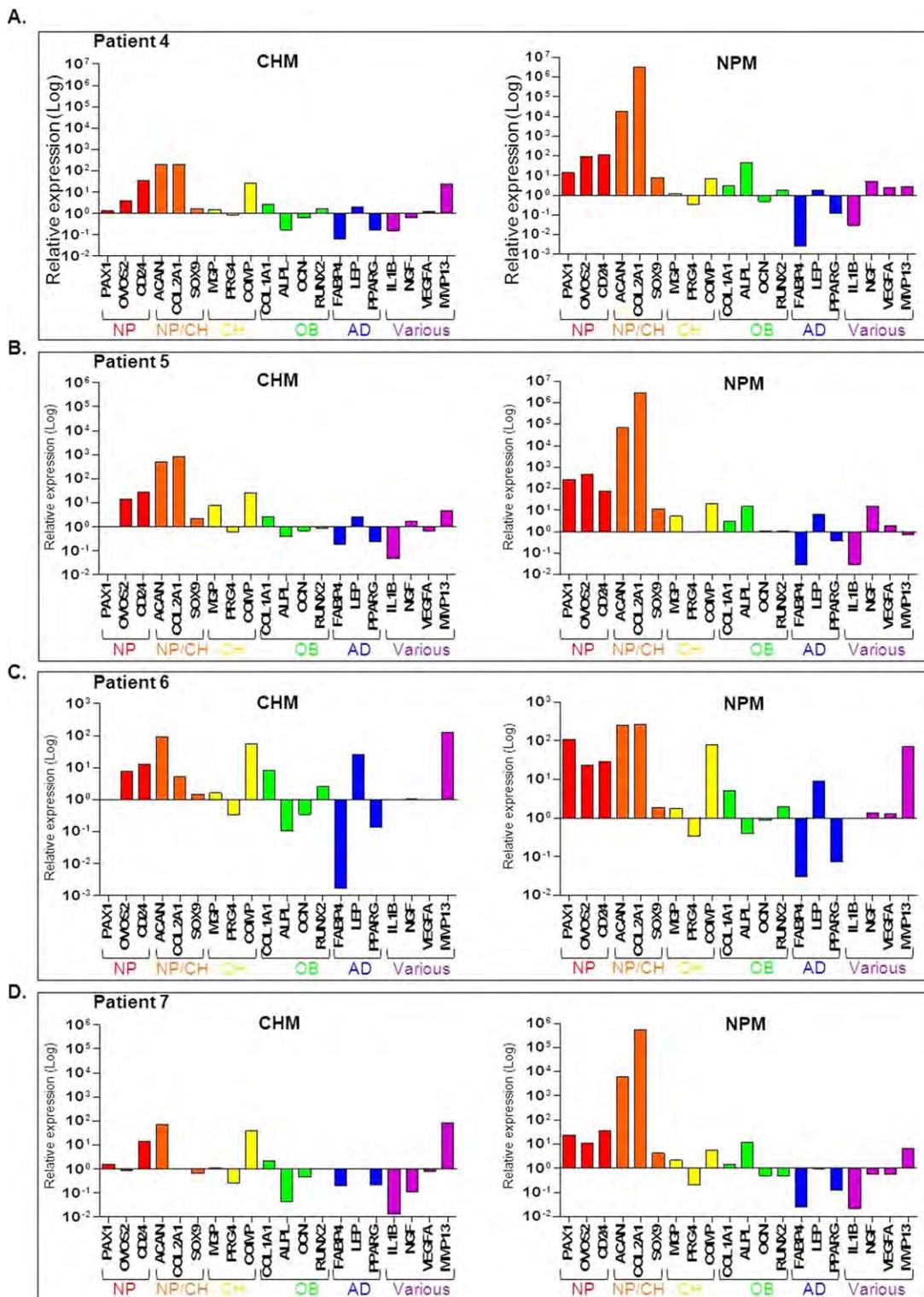


Figure 4. Specificity of the nucleopulpogenic differentiation of human adipose stromal cells (hASCs). hASC pellets from four patients were cultivated in the presence of chondrogenic medium or nucleopulpogenic medium for 28 days [(A) patient 4, (B) patient 5, (C) patient 6, and (D) patient 7]. The expression of nucleopulpogenic, chondrogenic, osteogenic, adipogenic, and various markers were analyzed using the Taqman low-density array. Abbreviations: AD, adipogenic; CH, chondrogenic; CHM, chondrogenic medium; NP, nucleopulpogenic; NPM, nucleopulpogenic medium; OB, osteogenic.

CHM-, and NPM-cultivated hASCs was thus further analyzed by histological analyses and immunostainings. The results showed a greater accumulation of sGAG, aggrecan, and type

II collagen proteins in NPM pellets compared with CHM pellets. While a moderate level of expression of *CD24* transcripts was found in the CHM condition, the corresponding protein

was never detected. The CD24, OVOSTATIN 2, and PAX1 proteins were detected exclusively in the hASC pellets cultivated in the NPM (Fig. 3D).

We then confirmed the specificity of the hASC nucleopulpo-genic commitment by analyzing the expression of chondrocyte-, osteoblast-, and adipocyte-related markers as well as other markers associated with degenerative and inflammatory processes (Fig. 4). Our results showed that the expression pattern of hASCs cultured in the CHM condition is comparable between patients 4, 5, and 6 with a high level of expression of chondrogenic markers (*ACAN*, *COL2A1*, *MGP*, and *COMP*) accompanied by a low level of expression of osteoblastic and adipogenic markers. Chondrogenic differentiation was less efficient in the case of patient 7 as shown by the low levels of *COL2A1* and *MGP* transcripts. Pellets of hASCs cultured in the NPM condition expressed high levels of the NPCyte-related transcripts (*ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1*) and low levels of chondrogenic and adipogenic related markers. We noted a relatively high expression of the osteoblastic marker *ALPL* in three out of four patients accompanied by a similar expression of *OCN* and *RUNX2* compared with their expression in the CHM condition. Except for the *ALPL* transcript, the expression profile of these differentiated cells was found consistent with the expression profile of native hNP cells (Supporting Information Fig. S1).

Taking into account that GDF5 may also act as a chondro-genic factor on mesenchymal stromal cells [37], we examined the expression levels of the two chondrocyte-related markers, *MGP* and *COMP* [38, 39]. The expression of *COL1A1*, which is associated with pathological fibrosis was also analysed [40]. The results showed that the culture of hASCs with the NPM did not induce a higher level of *MGP*, *COMP*, and *COL1A1* expression compared with the CHM condition (Supporting Information Fig. S2A, S2B). Finally, we analyzed the expression of *MMP13* gene involved in matrix degradation during NP degeneration and osteoarthritis [41, 42]. As described in the literature, *MMP13* transcript was detected in hASCs differentiated in CHM, contrasting with the lower level of transcript found in hASCs differentiated in NPM (Supporting Information Fig. S2C).

In conclusion, we observed that hASCs isolated from all patients cultured in the NPM condition were efficiently differentiated toward the NPCyte lineage. Despite the robustness of the differentiation, inter-individual variability in the biological response exists, as illustrated by the over all expression pattern observed for patient 7 (Fig. 4D) and the *COL1A1* expression observed for patient 6 (Supporting Information Fig. S2C).

In Vivo Assessment of NPCyte-Like Cells Biological Behavior

To address whether NPCytes-like cells can survive, maintain their specialized phenotype, and ECM secretory activity in vivo, we performed cell transplantation experiments in nude mice subcutis. Based on the aforementioned in vitro experiments, we aimed to transplant cells cultivated for 21 days in BM, CHM, or NPM in association with a silanized hydroxypropylmethylcellulose (si-HPMC) hydrogel as a scaffolding biomaterial. Previous studies demonstrated that this biomaterial efficiently carried hASCs in nude mice subcutis, in rabbit cartilage defects, and in rat infarcted myocardium [25, 43]. Before

cell transplantation, the expression of chondrogenic and nucleopulpo-genic markers was assessed to ensure the commitment of hASCs toward specific lineages (Fig. 5A). After 6 weeks of implantation, explants from hASCs cultured in the BM failed to exhibit alcian blue or Masson's trichrome staining demonstrating the lack of sGAG and collagen-enriched matrix formation (Fig. 5B). Further analyses of the biological behavior of transplanted cells will not be shown for the BM condition. Preconditioning of hASCs in CHM and NPM led to the survival of differentiated cells 6 weeks after transplantation and the secretion of sGAG and collagen containing ECM (Fig. 5B). Remarkably, we noted diffused alcian blue staining surrounding cells preconditioned in NPM, as found in the native hNP. These data indicated that cells were able to secrete sGAG through si-HPMC hydrogel. Type II collagen was found to be secreted by hASCs preconditioned in both CHM and NPM, whereas OVOSTATIN 2 and PAX1 proteins were distinctly produced by cells preconditioned in the NPM (Fig. 5C) consistent with the native hNP cells abilities.

These data showed that the in vivo transplanted NPCytes-like cells within the hydrogel of si-HPMC survive, have a secretory activity and maintain their specialized phenotype after 6 weeks.

Role of R-Smads Pathways in the Nucleopulpo-genic Differentiation of hASCs

To gain further knowledge on the mechanisms underlying nucleopulpo-genic differentiation, we assessed the respective role of TGF- β 1 and GDF5 signaling pathways. We first showed that Smad1/5/8 and Smad2 were the main downstream effectors activated in hASC upon TGF- β 1+GDF5 stimulation (Fig. 6A). Second, to gain further insight into the role of Smad pathways during the chondrogenic and nucleopulpo-genic differentiation of hASCs, we evaluated the total number of cells with a positive immunostaining for the phosphorylated Smad2 and Smad1/5/8 proteins. At the end of the pellet formation period (day 0, Pellet formation), positive cells for phosphorylated Smad1/5/8 and Smad2 proteins were observed (Fig. 6B). Early during the induction period, the total number of positive cells for Smad1/5/8 and Smad2 phosphorylation was found to be similar in both differentiation conditions (day 7). At day 14, both Smad1/5/8 and Smad2 proteins were found phosphorylated mainly in the CHM condition (Fig. 6B, 6C). During the last 2 weeks of induction, positive cells for phosphorylated Smad2 proteins was observed to be similarly in the two differentiation conditions, positive cells for phosphorylated Smad1/5/8 proteins was found to be higher in the NPM condition (Fig. 6C). In summary, these results indicated that Smad2 phosphorylation was detected all along the nucleopulpo-genic differentiation process while a clear increase in Smad1/5/8 phosphorylation was observed during the maturation phase. This increase was never observed in the CHM condition. To further decipher the respective role of the Smad1/5/8 and Smad2/3 pathways in the nucleopulpo-genic differentiation of hASCs, we analyzed the effect of two specific chemical inhibitors, respectively dorsomorphin and SB505124. We evaluated the nucleopulpo-genic differentiation of hASCs isolated from three patients and cultivated for 28 days in BM, CHM, and NPM supplemented with dorsomorphin or SB505124 (Fig. 7). The results showed that *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, and *OVOS2* expression was not significantly altered in

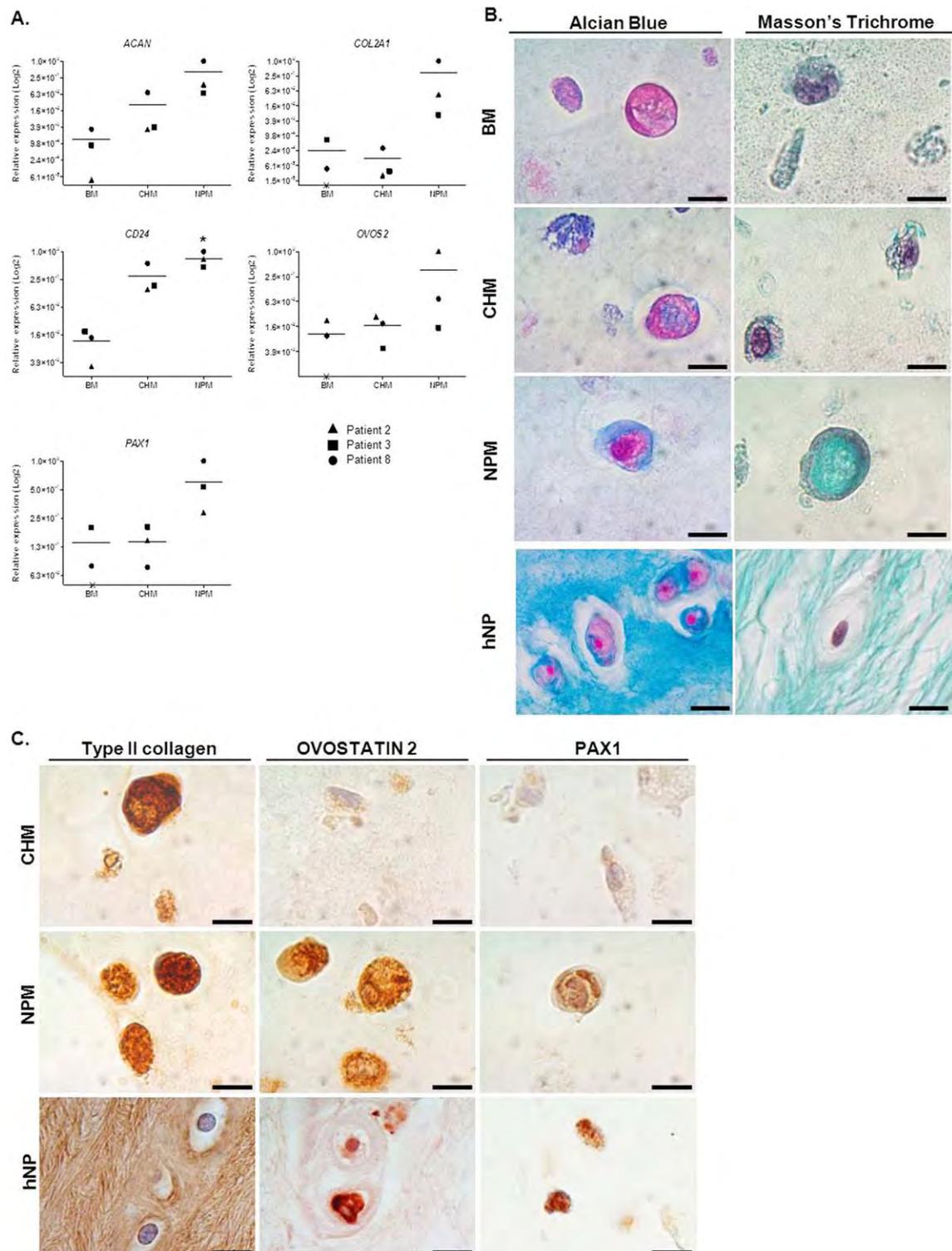


Figure 5. In vivo biological behavior of human adipose stromal cell (hASC)-derived nucleopulpopocytes. hASC pellets from patients 2, 3, and 8 were cultivated in the presence of basic medium, chondrogenic medium, and nucleopulpopogenic medium for 21 days before their association with the si-HPMC hydrogel and their transplantation in nude mice subcutis for 6 weeks. **(A):** The expression of *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1* was assessed before transplantation by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction. Black crosses on the x-axis represent a Cq value > 38 cycles. **(B):** Explanted samples and a human nucleus pulposus (hNP) were histologically prepared and sectioned for alcian blue and Masson's trichrome staining. **(C):** Explanted samples and a hNP were histologically prepared and sectioned for type II collagen, OVOSTATIN 2, and PAX1 immunostainings. Scale bar = 10 μ m. Abbreviations: BM, basic medium; CHM, chondrogenic medium; NPM, nucleopulpopogenic medium; hNP, human nucleus pulposus.

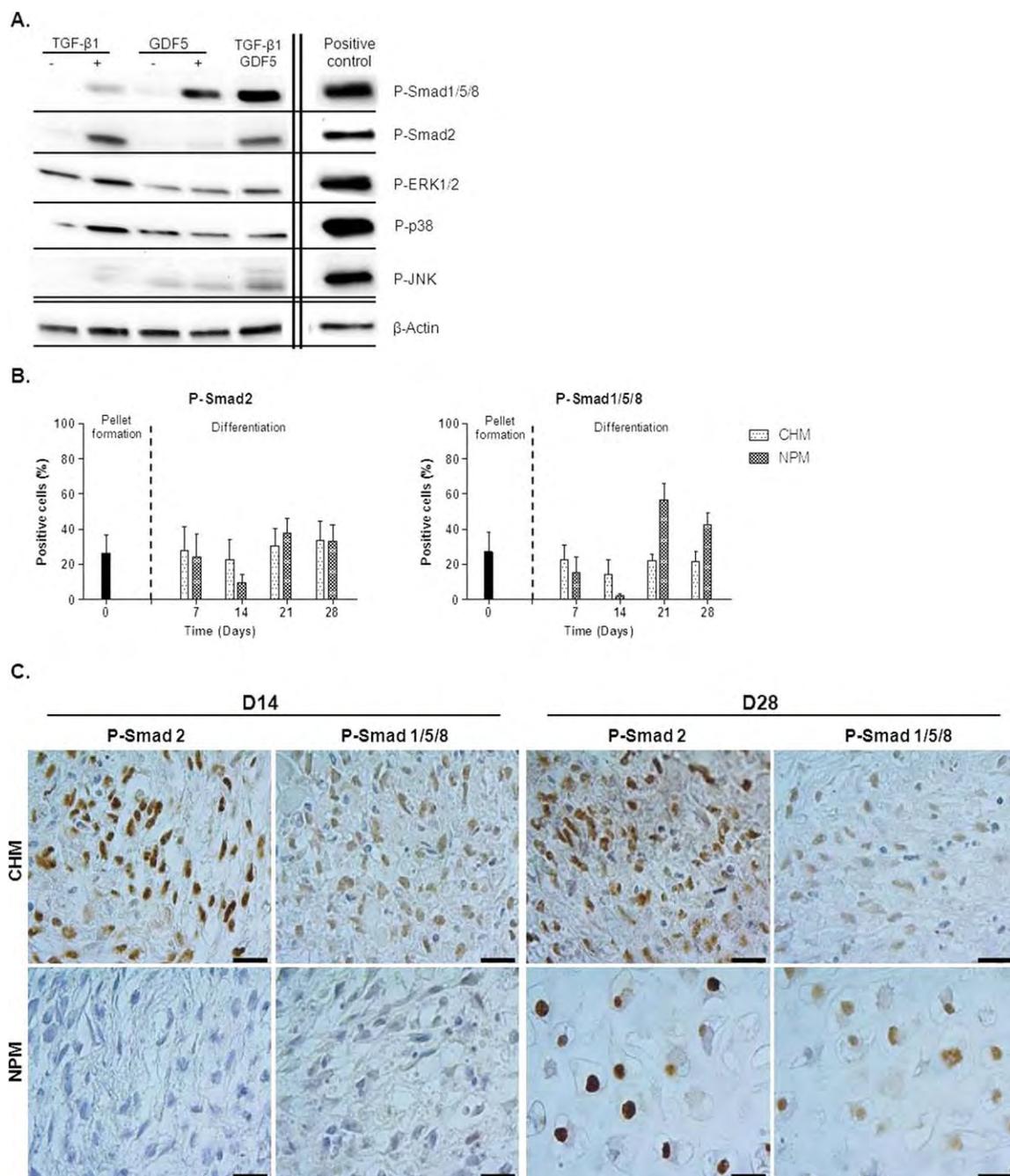


Figure 6. Smad proteins phosphorylation during differentiation of human adipose stromal cells (hASCs). Undifferentiated hASCs were stimulated for 30 minutes with transforming growth factor- β 1 and growth differentiation factor 5 alone or in combination. **(A)**: The phosphorylation of Smad1/5/8, Smad2, Erk, p38, and jnk proteins was analyzed using Western blot. **(B)**: The percentage of phosphorylated Smad2- and Smad1/5/8-positive cells was calculated during hASC chondrogenesis and nucleopulpopogenesis. The dotted line represents the induction time of hASCs differentiation. Error bars indicate SEM between the three patients. **(C)**: hASCs derived from patients 2, 3, and 4 were cultivated in chondrogenic medium and nucleopulpopogenic medium conditions for 28 days and the pellets prepared and sectioned for phospho-Smad1/5/8 and phospho-Smad2 immunostainings at days 14 and 28. Scale bar = 20 μ m. Abbreviations: CHM, chondrogenic medium; GDF5, growth differentiation factor 5; NPM, nucleopulpopogenic medium; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

the NPM supplemented with dorsomorphin condition. In contrast, SB505124 supplementation of NPM led to a significant reduction in *ACAN*, *CD24*, and *OVOS2* expression (Fig. 7A). We thus performed histological analyses of hASC pellets after 28 days of differentiation in BM, CHM and NPM supplemented

with dorsomorphin or SB505124 (Fig. 7B). Alcian blue and Masson's trichrome staining revealed that sGAG accumulation was drastically reduced, while collagen deposition was detected at a higher level in the NPM supplemented with dorsomorphin condition compared with NPM alone. In addition, we observed

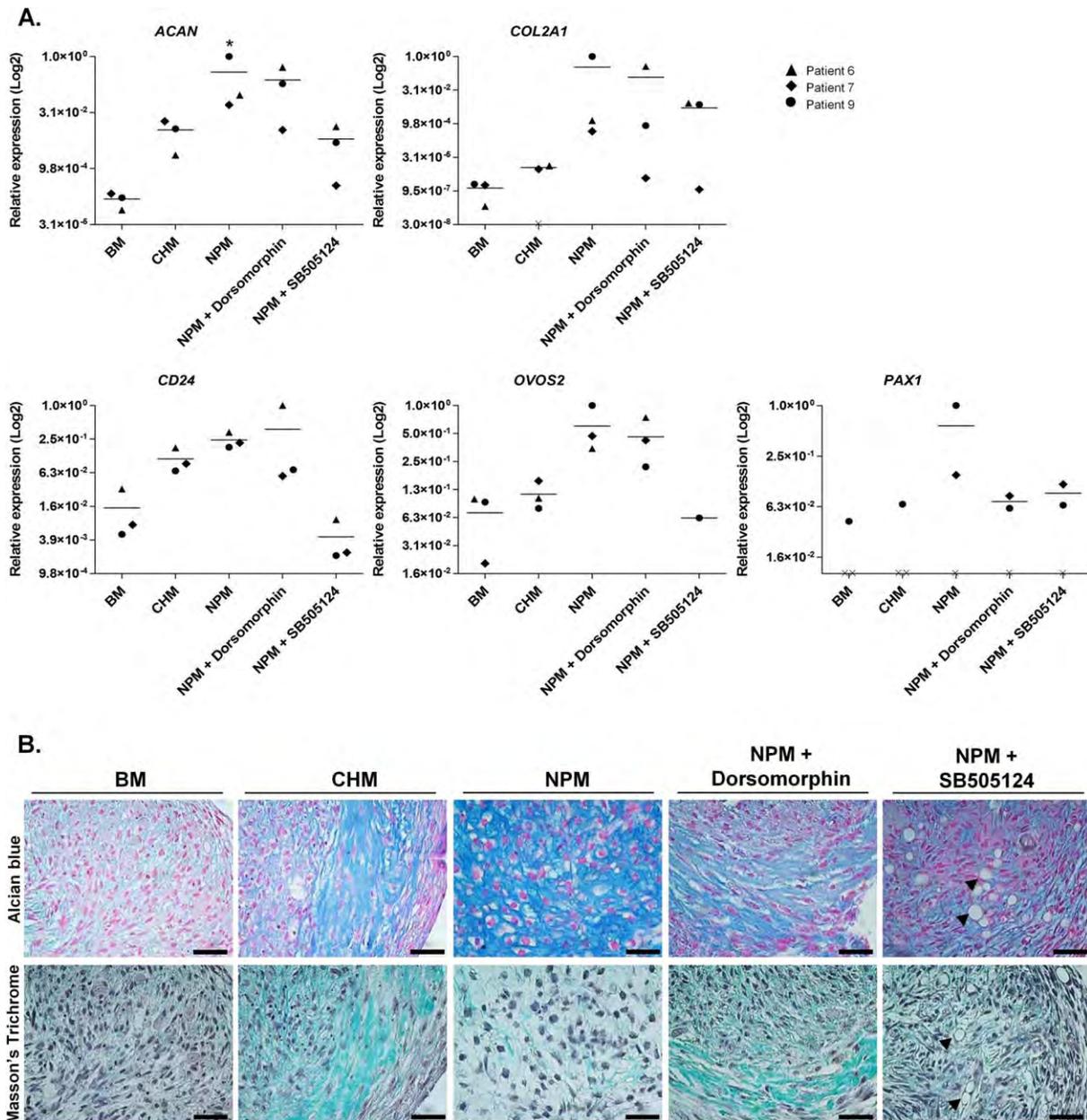


Figure 7. Role of Smad2/3 and Smad1/5/8 pathways during nucleopulpopogenesis of human adipose stromal cells (hASCs). hASCs derived from patients 6, 7, and 9 were cultivated in the presence of basic medium (BM), chondrogenic medium, and nucleopulpopogenic medium supplemented with dorsomorphin or SB505124 for 28 days. **(A):** The expression of *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1* was analyzed using the Taqman low-density array. *, $p \leq 0.05$ versus BM. Relative expression was represented when Cq value < 38 cycles. **(B):** Pellets were histologically prepared and sectioned for alcian blue and Masson's trichrome staining. Scale bar = 100 μ m. Black arrowheads indicate adipocyte-like cells. Scale bar = 100 μ m. Abbreviations: BM, basic medium; CHM, chondrogenic medium; NPM, nucleopulpopogenic medium.

a change in cell shape in the presence of dorsomorphin. Indeed, cell morphology appeared similar to the morphology of CHM-cultivated hASCs. In the NPM supplemented with the SB505124 condition, sGAG and collagens were found at barely detectable levels and larger cells resembling adipocytes were observed. The detection of a high level of the adipocyte-related transcripts *PPAR γ* and *FABP4* confirmed the widespread differentiation toward adipocytes in the NPM supplemented with the SB505124 condition (Supporting Information Fig. S3). Taken together, these results indicated that the Smad2/3 and Smad1/

5/8 signaling pathways are essential for hASC differentiation toward the NPCyte-like phenotype.

DISCUSSION

This study demonstrates for the first time that the use of TGF- β 1 associated with GDF5 in the presence of DEX synergistically induces the differentiation of hASCs toward NPCyte-like cells. We assessed the success of the differentiation of hASCs

toward NPCyte-like cells using markers with physiologic importance in accordance with the emergent consensus guidelines to define a “healthy NP cell phenotype” proposed by Risbud et al. [44]. hASCs acquired the molecular signature of healthy NPCytes by expressing *ACAN*, *COL2A1*, *CD24*, *OVOS2*, and *PAX1*. As previously reported in BM-MSCs, the terminal chondrogenic differentiation is characterized by an increased expression of *ALPL*, *RUNX2*, and *MMP13* [45]. Interestingly, hASCs-derived NPCytes, that expressed high levels of *ALPL* transcripts, also expressed low levels of *RUNX2* and *MMP13* strongly suggesting that those hASCs-derived NPCytes are different from terminally differentiated chondrogenic cells. We also found that from 21 days of differentiation, cells displayed a particular morphology. They were larger and anchored within a capsule, a cellular arrangement resembling that of native NPCytes [46]. Furthermore, at 28 days, differentiated cells produced an aggrecan- and type II collagen-rich ECM comparable with that of native NP. The nucleopulpopogenic differentiation was successful in nine patients and the data suggest that neither age nor body mass index affects this process. The generation of NPCyte-like cells from all the patients, which express similar level of NPCytes-related transcripts to young native hNP cells, highlights the robustness of our differentiation protocol. In addition, the low expression level of genes associated with chondrogenic, osteogenic, or adipogenic differentiation by NPCyte-like cells attests to the specificity of the hASC commitment. The development and validation of this growth factor-driven differentiation protocol is an improvement in the control of the differentiation process when compared with co-culture protocols [47–49]. In addition, the use of clinical grade growth factors enables us to consider this differentiation protocol for clinical translation.

A previous study reported that the intradiscal injections of undifferentiated MSCs in rabbits led to the formation of osteophytes, probably because injected MSCs experienced an osteo-chondrogenic differentiation process within the degenerated NP [50]. The *in vitro* preconditioning of cells in nucleopulpopogenic conditions may prove to overcome this drawback. The propensity of these committed cells to produce an abundant and functional ECM, resembling that of the NP, remains to be examined *in vivo*. Taking the first step forward, we evaluated the biological activity of NPCyte-like cells after transplantation in nude mice subcutis by analyzing their fate and behavior in this environment with poor nutrient supply, as they may experience after intradiscal transplantation. We demonstrated that *in vitro* preconditioned hASCs in NPM (a) survived after *in vivo* transplantation within si-HPMC hydrogel, (b) exhibited a specific secretory activity, and (c) maintained their specialized phenotype.

These results clearly demonstrate that the differentiation of hASCs toward NPCyte-like cells only occurred in the presence of TGF- β 1 associated with GDF5 and DEX. This differentiation process may be driven by different mechanisms. The notochord-derived NPCytes originate from a type of mesoderm distinct from the type generating the ASCs. Thus, the generation of NPCyte-like cells may require a reprogramming step to bring the hASCs to a more undifferentiated state. However, no change in the level of expression of the pluripotency markers *NANOG*, *POU5F1* and *SOX2* was observed during the course of nucleopulpopogenic differentiation (RT-qPCR, data not shown). This suggests that the hASCs in the NPM condition did not

gain a greater capacity to differentiate toward the nucleopulpopogenic lineage but rather the combination of TGF- β 1 and GDF5 directly enhanced the acquisition of NPCyte-like phenotype. The data herein also showed that Smad1/5/8 and Smad2 were the main effectors activated upon TGF- β 1 and GDF5 stimulation. We postulated that the nucleopulpopogenic commitment is due to the differential activation of their signaling pathways. DEX is a glucocorticoid with the ability to form a complex with its intracellular receptor and has been shown to enhance the TGF- β 1 mediated expression of *ACAN* and *COL2A1* transcripts during chondrogenesis. A local accumulation of sGAG in induced BM-MSCs pellets has also been reported [51]. Consistent with these observations, our data showed a substantial and localized sGAG synthesis by hASCs cultivated in BM TGF- β 1 DEX compared with a slight and homogenous sGAG synthesis occurring without DEX. An interaction between the glucocorticoid receptors and the Smad proteins has also been reported to exert a transcriptional activity [52] and could contribute to explaining the effect of DEX on hASCs chondrogenesis and nucleopulpopogenesis. Alternatively, potential physical interaction between TGF- β 1 and GDF5 and formation of a heterocomplex may explain their synergistic effect on hASC commitment toward the nucleopulpopogenic lineage. Preliminary experiments using surface plasmon resonance showed that these TGF- β superfamily members are able to interact together with a moderate affinity ($K_d = 10^{-7}$ M, data not shown). The impact of the TGF- β 1/GDF5 physical interaction on the hASCs biological response remains to be further characterized.

In accordance with the data obtained from developmental studies and *in vitro* analysis of chondrogenesis [45, 53, 54], our results showed that the chondrogenic differentiation of hASCs is initiated by both pathways and regulated by the Smad2 pathway, which is active throughout the differentiation process. Knowledge of the role played by the Smad pathways in NP formation during embryogenesis is limited. During post-natal maturation, it has been demonstrated that both pathways are associated with ECM synthesis. Studies in the mouse showed evidence of an upregulation of Smad2/3 phosphorylation during NP growth from birth to 6 months and the activation of the Smad1/5/8 pathway, during the NP maturation phase, from birth to 2 months [55, 56]. This study has demonstrated for the first time that during the course of nucleopulpopogenic differentiation of hASCs, positive cells for phosphorylated Smad1/5/8 and Smad2 proteins are found at the initiation phase of induction. A drop in phosphorylation of both protein complexes follows the initiation phase. Positive cells for phosphorylated Smad1/5/8 and Smad2 proteins were found in the second phase of the differentiation process with positive cells for phosphorylated Smad1/5/8 reaching their highest level. Whether this could be dependent upon a tuned expression of TGF- β 1 and GDF5 receptors is under investigation. To gain further knowledge on the respective roles of Smad1/5/8 and Smad2/3 signaling in nucleopulpopogenic differentiation, we examined the consequences of the inhibition of these pathways. We observed that following the inhibition of Smad1/5/8 phosphorylation, cells loosed their typical morphology even though they maintained their NPCyte-like molecular expression pattern. In contrast, the inhibition of Smad2/3 phosphorylation led to a complete abrogation of the nucleopulpopogenic differentiation of hASCs. Thus, these data indicate that the Smad2/3 pathway is essential for

the acquisition of NPCyte molecular identity in the early phases of differentiation. They also showed that the Smad1/5/8 pathway is required for the maturation phase with the acquisition of NPCyte-like morphology.

CONCLUSION

This study provides evidence of a promising and innovative autologous regenerative cell source and has established a robust protocol for in vitro differentiation toward the nucleopulpopogenic lineage. We generated NPCyte-like cells in vitro that display a molecular and morphological phenotype similar to the native phenotype. These engineered NPCyte-like cells produce an aggrecan- and type II collagen-rich ECM in vitro and maintain their biological activity after 6 weeks of in vivo transplantation in nude mice subcutis. These data fulfilled the necessary condition to move on to the next step of proof of concept: using NPCyte-like cells associated with si-HPMC hydrogel to test their therapeutic efficacy in a relevant animal model of disc degeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. F. Lejeune and B. Le Fourn (Clinique Brétéché, Nantes) for harvesting human lipoaspirates and L. Nothrup for her careful reading and editing of the manuscript. This work was supported by INSERM and grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM pionnier de la recherche "Bioingénierie"), the AO Foundation (S-12-14G), the

Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée (FARMA ET3-683), the région Pays de la Loire (BIOREGOS II and BIODIV "nouvelle équipe-nouvelle thématique" program), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR générique 2014 REMEDIV), and doctoral grant from the AXA Research Fund (to P.C.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.C.: conception and design, collection and assembly data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript; J.C.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, final approval of manuscript; C.B., L.L., and P.W.: data analysis and interpretation, final approval of manuscript; M.R., G.B., J.L., and B.H.F. collection and assembly data; A.M.: data analysis and interpretation; A.C.: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript; J.G.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript. A.C. and J.G. contributed equally to this article.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Choi KS, Cohn MJ, Harfe BD. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: Implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev Dyn* 2008;237:3953-3958.
- McCann MR, Tamplin OJ, Rossant J et al. Tracing notochord-derived cells using a Notocore mouse: Implications for intervertebral disc development. *Dis Model Mech* 2011;5:73-82.
- Colombier P, Camus A, Lescaudron L et al. Intervertebral disc regeneration: A great challenge for tissue engineers. *Trends Biotechnol* 2014;32:433-435.
- Roberts S, Evans H, Trivedi J et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:10-14.
- Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA et al. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum* 2010;62:3695-3705.
- Erwin WM, Ashman K, O'Donnell P et al. Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2006;54:3859-3867.
- Erwin WM, Islam D, Inman RD et al. Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: Implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R215.
- Hoyland JA, Le Maitre C, Freemont AJ. Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc. *Rheumatology* 2008;47:809-814.
- Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R732-745.
- Mavrogenatou E, Angelopoulou MT, Dimitris K. The catabolic effect of TNFalpha on bovine nucleus pulposus intervertebral disc cells and the restraining role of glucosamine sulfate in the TNFalpha-mediated up-regulation of MMP-3. *J Orthop Res* 2014. 32:1701-1707.
- Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet* 1999;354:581-585.
- Haufe SM, Mork AR. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs. *Stem Cells Dev* 2006;15:136-137.
- Orozco L, Soler R, Morera C et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: A pilot study. *Transplantation* 2011;92:822-828.
- Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K et al. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: A report of two case studies. *Spine* 2010;35:475-480.
- Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 2013;45: 54.
- Gantenbein-Ritter B, Benneker LM, Alini M et al. Differential response of human bone marrow stromal cells to either TGF-beta(1) or rhGDF-5. *Eur Spine J* 2011;20:962-971.
- Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A et al. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *Eur Cell Mater* 2011;21:533-547.
- Bonora-Centelles A, Jover R, Mirabet V et al. Sequential hepatogenic transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells: Relevance of different extracellular signaling molecules, transcription factors involved, and expression of new key marker genes. *Cell Transplant* 2009;18:1319-1340.
- Chavez-Munoz C, Nguyen KT, Xu W et al. Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: Engineering a stratified epidermis. *PLoS One* 2013;8:e80587.
- Lee J, Baek JH, Choi KS et al. Cyclin-dependent kinase 4 signaling acts as a molecular switch between syngenic differentiation and neural transdifferentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Cycle* 2013;12:442-451.
- Clarke LE, McConnell JC, Sherratt MJ et al. Growth differentiation factor 6 and transforming growth factor-beta differentially mediate mesenchymal stem cell differentiation, composition and micromechanical properties of nucleus pulposus constructs. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R67.
- Baffi MO, Moran MA, Serra R. Tgfb2 regulates the maintenance of boundaries in the axial skeleton. *Dev Biol* 2006;296:363-374.
- Park JY, Yoon YS, Park HS et al. Molecular response of human cervical and lumbar nucleus pulposus cells from degenerated

discs following cytokine treatment. *Genet Mol Res* 2013;12:838-851.

- 24** Merceron C, Portron S, Vignes-Colombeix C et al. Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: Potential application to cartilage regenerative medicine. *Stem Cells* 2012;30:471-480.
- 25** Portron S, Merceron C, Gauthier O et al. Effects of in vitro low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their in vivo chondrogenic potential: Application in cartilage tissue repair. *PLoS One* 2013;8:e62368.
- 26** Chujo T, An HS, Akeda K 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;31:2909-2917.
- 27** Li X, Leo BM, Beck G et al. Collagen and proteoglycan abnormalities in the GDF-5-deficient mice and molecular changes when treating disk cells with recombinant growth factor. *Spine* 2004;29:2229-2234.
- 28** Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression of cartilage-derived morphogenetic protein in human intervertebral discs and its effect on matrix synthesis in degenerate human nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R137.
- 29** Estes BT, Diekman BO, Gimble JM et al. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* 2010;5:1294-1311.
- 30** Merceron C, Vinatier C, Portron S et al. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 2010;298:355-364.
- 31** Poiraudau S, Monteiro I, Anract P et al. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells. Comparison with cartilage cells from the same animals. *Spine* 1999;24:837-844.
- 32** Merceron C, Portron S, Masson M et al. The effect of two and three dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplantation* 2011;20:1575-1588.
- 33** Vinatier C, Magne D, Weiss P et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005;26:6643-6651.
- 34** 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;102:1259-1267.
- 35** Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:763-769.
- 36** Babadagli ME, Tezcan B, Yilmaz ST et al. Matrilin-3 as a putative effector of C-type natriuretic peptide signaling during TGF-beta induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep* 2014;41:5549-5555.
- 37** Yang X, Shang H, Katz A et al. A modified aggregate culture for chondrogenesis of human adipose-derived stem cells genetically modified with growth and differentiation factor 5. *Biores Open Access* 2013;2:258-265.
- 38** Clouet J, Grimandi GI, Pot-Vaucel M et al. Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes. *Rheumatology* 2009;48:1447-1450.
- 39** Rutges J, Creemers LB, Dhert W 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;18:416-423.
- 40** Pretheeban T, Lemos DR, Paylor B et al. Role of stem/progenitor cells in reparative disorders. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5:20.
- 41** Bomer N, den Hollander W, Ramos YF et al. Underlying molecular mechanisms of DIO2 susceptibility in symptomatic osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;71:1254-1258.
- 42** Wang M, Tang D, Shu B et al. Conditional activation of beta-catenin signaling in mice leads to severe defects in intervertebral disc tissue. *Arthritis Rheum* 2012;64:2611-2623.
- 43** Mathieu E, Lamirault G, Toquet C et al. Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS One* 2012;7:e51991.
- 44** Risbud MV, Schoepflin ZR, Mwale F et al. Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: Recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 Annual ORS Meeting. *J Orthop Res* 2014;33:283-293.
- 45** Hellingman CA, Davidson EN, Koevoet W et al. Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: Inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1157-1167.
- 46** Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus. *Anat Rec* 1982;204:307-314.
- 47** Lu ZF, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI et al. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: Configuration effect. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359:991-996.
- 48** Richardson SM, Walker RV, Parker S et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006;24:707-716.
- 49** Sun Z, Liu ZH, Zhao XH et al. Impact of direct cell co-cultures on human adipose-derived stromal cells and nucleus pulposus cells. *J Orthop Res* 2013;31:1804-1813.
- 50** Vadala G, Sowa G, Hubert M et al. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: Cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; 6:348-355.
- 51** Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ et al. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 2006;24:1487-1495.
- 52** Smoak KA, Cidowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* 2004;125:697-706.
- 53** Baffi MO, Slattery E, Sohn P et al. Conditional deletion of the TGF-beta type II receptor in Col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones. *Dev Biol* 2004;276:124-142.
- 54** Retting KN, Song B, Yoon BS et al. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development* 2009;136:1093-1104.
- 55** Dahia CL, Mahoney EJ, Durrani AA et al. Intercellular signaling pathways active during intervertebral disc growth, differentiation, and aging. *Spine* 2009;34:456-462.
- 56** Tran CM, Smith HE, Symes A et al. Transforming growth factor beta controls CCN3 expression in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *Arthritis Rheum* 2011;63:3022-3031.



See www.StemCells.com for supporting information available online.

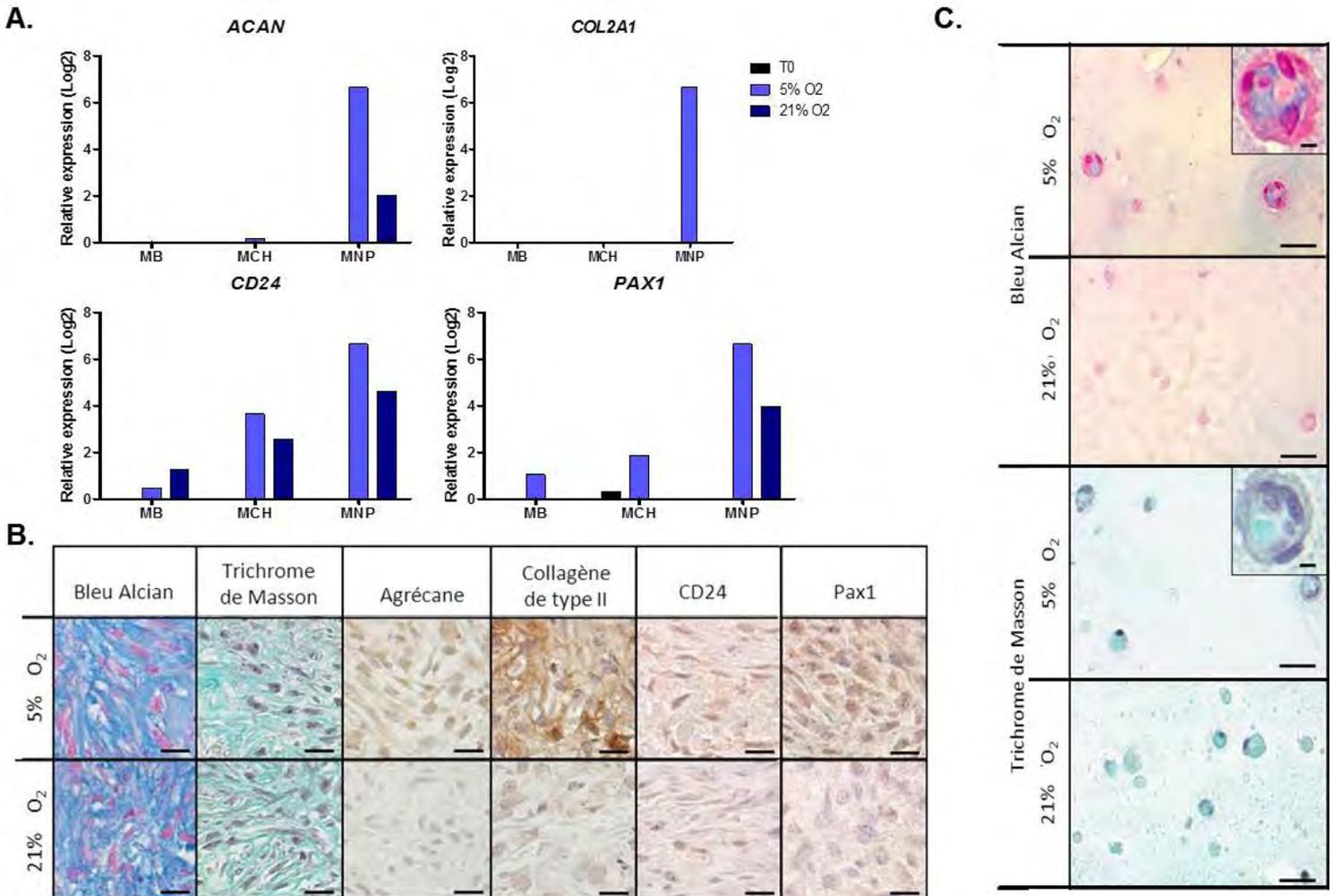


Figure 28 : Effet de la tension en oxygène sur la différenciation des cellules stromales adipeuses (CSA) humaines en nucléopulpcytes (NPCytes). Les CSA humaines d'un patient ont été cultivées pendant 28 jours en 3 dimensions en présence d'un milieu basal (MB), d'un milieu chondrogénique (MCH) et du milieu nucléopulogénique (MNP) et de 5% ou 21% d'O₂. (A.) L'analyse de l'expression d'ACAN, COL2A1, CD24 et PAX1 a été réalisée par RT-qPCR. (B.) La présence de glycosaminoglycanes sulfatés (GAG) et de collagènes a été mise en évidence par une coloration au bleu alcian et au trichrome de Masson respectivement. La présence des protéines agrécane, collagène de type II, CD24 et PAX1 a été révélée par immunohistochimie. (C.) Les CSA préalablement différenciées en présence du milieu MNP en présence de 5% et 21% d'O₂ ont été associées à un hydrogel d'HPMC-Si (Hydroxypropylmethyl cellulose silanisée) puis injectées en site sous cutané chez la souris nude. Après 6 semaines d'implantation, la présence de nodules composés de cellules sécrétant des GAG et des collagènes a été mise en évidence par coloration au bleu alcian et au trichrome de Masson. Barre d'échelle : 50µm

C- Discussion

Un protocole reproductible de différenciation de CSA humaines en NPCytes a été établi dans cette étude. Les CSA isolées de 9 patients ont été différenciées efficacement indépendamment de leur âge et de leur poids. L'action synergique des facteurs TGF- β 1 et GDF5 et la culture des CSA en 3 dimensions (sous forme de culots cellulaires) en présence d'une faible tension en oxygène a permis leur différenciation en NPCytes. La figure 28 illustre l'influence de la tension en oxygène sur la différenciation nucléopulpogénique des CSA et leur capacité à produire des PG et collagènes *in vivo*. Etant donné que la différenciation des CSA en NPCytes n'est pas un processus physiologique démontré *in vivo*, la caractérisation exhaustive du phénotype des cellules générées a été réalisée. La comparaison de l'expression des marqueurs par les CSA différenciées en présence du milieu nucléopulpogénique à celle des NPCytes humains sains a révélé, de façon intéressante, des profils d'expression similaires. De plus, la spécificité de l'engagement nucléopulpogénique a été démontrée par l'absence d'augmentation d'expression des marqueurs relatifs à la différenciation ostéo-, adipo- et chondrogénique des CSA.

Nous nous sommes également intéressés aux rôles des facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF5 au cours de la différenciation. Nous avons démontré que l'expression des marqueurs nucléopulpogéniques et la sécrétion de la MEC par les CSA différenciées n'a lieu qu'en présence des deux facteurs TGF- β 1 et GDF5, attestant de leur action synergique. Les voies de signalisation des facteurs TGF- β 1 et du GDF5 se distinguent dans deux phases différentes de la différenciation. L'activation de la voie Smad2/3 en réponse au TGF- β 1 est essentielle à l'induction de l'expression des marqueurs de NPCytes tandis que la voie Smad1/5/8 activée par le GDF5 est plus particulièrement responsable de l'acquisition de la morphologie

semblable aux NPCytes natifs. La compréhension des mécanismes moléculaires de cette différenciation est cruciale afin d'en contrôler les différentes étapes et d'envisager l'utilisation des NPCytes comme cellules régénératrices du NP.

Parallèlement à nos travaux, une équipe s'est intéressée à l'utilisation du TGF- β 3 et de l'IGF-1 pour la différenciation de CSM en NPCytes. Ils ont également rapporté un effet synergique de ces facteurs et l'importance de la voie de signalisation ERK dans cette différenciation. Cependant, l'analyse du phénotype des cellules différenciées a reposé uniquement sur des marqueurs communs avec les chondrocytes (*ACAN*, *COL2A1*, *SOX9* et *COL1A1*) [587]. C'est le cas également d'une étude rapportant les effets de la combinaison du TGF- β et de la protéine BMP3. Cette étude est basée sur l'analyse de la cytokératine 19, marqueur des cellules du NP, et sur des marqueurs partagés par les NPCytes et les chondrocytes. Les auteurs rapportent l'importance de la voie de signalisation Smad3 dans cette différenciation [588]. Ces études récentes hétérogènes en termes de résultats ont été principalement basées sur l'analyse de marqueurs communs entre les chondrocytes et les NPCytes. Elles ne sont pas en accord avec les recommandations publiées par le « Spine Research Interest Group » sur les marqueurs à analyser tels que CA12, PAX1, OVOS2 et CD24, afin de démontrer la présence de NPCytes sains [589].

Après transplantation sous-cutanée chez la souris *nude* avec un hydrogel injectable, les NPCytes générés à partir des CSA conservent leur phénotype spécialisé et leur activité sécrétoire. Bien que ce modèle soit éloigné de la physiopathologie discale humaine, il permet d'évaluer la capacité des cellules à survivre dans un environnement pauvre en oxygène et en nutriments. Il est largement utilisé en ingénierie tissulaire de par sa simplicité d'utilisation et la réponse rapide aux questions de survie et de maintien du phénotype qu'il apporte. Ce modèle a

également permis de s'assurer de la compatibilité de l'hydrogel utilisé (Hydroxypropylmethyl cellulose silanisée) avec les CSA différenciées en NPCytes. En effet, cet hydrogel avait jusqu'à lors permis la transplantation de chondrocytes *in vivo* [422, 423, 590] mais son utilisation pour la transplantation *in vivo* de NPCytes n'avait jamais été étudiée. L'ensemble de nos données ont démontré la capacité des NPCytes dérivés de CSA à être transplantés, à survivre et à produire de la MEC semblable à celle du NP dans un environnement pauvre en oxygène et en nutriments. Ces données encourageantes en termes de survie et d'activité sécrétrice *in vivo* permettent d'envisager l'utilisation de NPCytes dérivés de CSA à moyen terme en médecine régénératrice du DIV chez l'homme. Cependant, leur différenciation en 3 dimensions impliquant une étape d'isolement par digestion enzymatique avant transplantation, l'efficacité des collagénases de grade clinique doit être analysée. Une alternative à cette étape de digestion enzymatique serait la différenciation des CSA en monocouche. Cette possibilité a fait l'objet d'une étude préliminaire rapportant une très faible efficacité de différenciation (données non présentées). Des résultats similaires ont été observés pour la différenciation chondrogénique des CSA en monocouche. Cependant, après transplantation chez la souris *nude*, la synthèse d'une MEC de type cartilagineuse par ces cellules a été observée [582]. La capacité des CSA différenciées en présence de TGF- β 1 et GDF5 en monocouche à produire une MEC de type NP après transplantions chez la souris *nude* est donc en cours d'investigation au sein du laboratoire (thèse de Melle Nina Henry, Dir Jérôme Guicheux et Jean Le Bideau, INSERM UMRS-791 et IMN, 2013-2016).

La production de NPCytes dérivés de CSA similaires aux NPCytes natifs ouvre de nouvelles perspectives. En effet, ce modèle peut être utilisé afin d'approfondir nos

connaissances fondamentales relatives au dialogue moléculaire avec les CNT. Les CNT matures et NPCytes sains étant retrouvés uniquement dans les NP jeunes, l'accessibilité de ces cellules est très limitée. Ce modèle permettra donc de découvrir de nouveaux facteurs sécrétés par les CNT matures et les NPCytes chez l'homme. Les effets de ces facteurs sur l'activité des cellules (prolifération, production de MEC) pourront être analysés. En plus de la compréhension des mécanismes conduisant à la mise en place du NP, ce modèle permettrait également d'analyser les réponses des CNT matures et NPCytes dans un contexte mimant la dégénérescence discale (cytokines pro-inflammatoires, diminution des nutriments, augmentation des contraintes mécaniques). Enfin, ce modèle cellulaire pourrait permettre également de cribler de nombreuses molécules et de définir leur potentiel thérapeutique.

VI- Conclusions/Perspectives

Le développement de nouvelles thérapies ciblant les causes de la dégénérescence discale est aujourd'hui possible au regard de l'amélioration des connaissances de la physiopathologie discale. La régulation fine du dialogue moléculaire entre les CNT matures et les NPCytes joue un rôle majeur dans la mise en place de la MEC du NP adulte. La disparition complète des CNT matures dès l'âge de la maturité squelettique entraîne très probablement la rupture de ce dialogue. De manière intéressante, cette rupture est concomitante avec l'apparition des premiers signes de dégénérescence discale.

Bien que des injections intradiscales de GDF5 et de CSM fassent aujourd'hui l'objet d'études cliniques, ces stratégies ne peuvent pas restaurer le dialogue entre CNT matures et NPCytes et entraîneront probablement des processus de réparation plus que de régénérescence. A l'instar des tissus cartilagineux, les processus de réparation spontanée du NP entraîne la formation d'un tissu fibreux qui ne présente malheureusement pas les mêmes propriétés d'absorption et de résistance aux contraintes mécaniques que le NP sains (Thèse du Dr Olivier Hamel, Directeur P. Weiss, INSERM UMRS791-LIOAD, 2006-2012). Dans ce contexte et afin de promouvoir des mécanismes de régénérescence plutôt que de réparation, nous proposons de développer une stratégie thérapeutique basée sur l'injection de NPCytes et de CNT matures dérivées de cellules souches humaines. L'injection de ces deux types cellulaires permettra de restaurer le dialogue moléculaire à l'origine du maintien de l'homéostasie du NP et de retarder ou reverser la dégénérescence du NP. Cette stratégie thérapeutique replacée dans le contexte des thérapies actuellement proposées aux patients lombalgiques et a fait l'objet d'une revue dans

le journal Médecine Science **Article V : Regenerative medicine of intervertebral disc: from physiopathology to clinical application. N. Henry, P. Colombier, L. Lescaudron, O. Hamel, J. Le Bideau, J. Guicheux, J. Clouet. Médecine Science, 2014.**

ARTICLE V

Regenerative medicine of intervertebral disc: from physiopathology to clinical application.

N. Henry, P. Colombier, L. Lescaudron, O. Hamel, J. Le Bideau, J. Guicheux, J. Clouet.

Médecine Sciences, 2014

Résumé

Une large proportion des lombalgies est expliquée par la dégénérescence du disque intervertébral (DIV). Cette dégénérescence est notamment caractérisée par la disparition progressive des cellules du noyau pulpeux (nucleus pulposus, NP), partie centrale du DIV. Compte tenu de l'absence de réparation spontanée du DIV, la supplémentation du NP par des cellules fonctionnelles constitue une stratégie prometteuse pour limiter la progression, voire contrecarrer le processus de dégénérescence du DIV. Après un rappel de la physiopathologie discale, les différentes stratégies de médecine régénératrice du DIV (thérapie cellulaire, ingénierie tissulaire), ainsi que les résultats des études précliniques et cliniques, seront discutés.

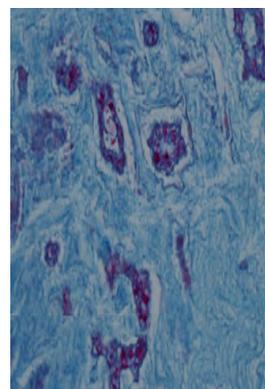
► Une large proportion des lombalgies sont expliquées par la dégénérescence du disque intervertébral (DIV). Cette dégénérescence est notamment caractérisée par la disparition progressive des cellules du noyau pulpeux (*nucleus pulposus*, NP), partie centrale du DIV. Compte tenu de l'absence de réparation spontanée du DIV, la supplémentation du NP par des cellules fonctionnelles constitue une stratégie prometteuse pour limiter la progression, voire contrecarrer le processus de dégénérescence du DIV. Après un rappel de la physiopathologie discale, les différentes stratégies de médecine régénératrice du DIV (thérapie cellulaire, ingénierie tissulaire), ainsi que les résultats des études précliniques et cliniques, seront discutés. ◀

Environ 80 % de la population générale souffriront, au moins une fois au cours de la vie, de douleurs lombaires, qui sont reconnues comme le mal du XXI^e siècle par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Ainsi, la lombalgie représente la seconde cause de consultation médicale dans les pays industrialisés, derrière les troubles cardiaques, et son impact médico-économique est considérable. Aux États-Unis, le coût annuel de cette pathologie a été estimé entre 100 et 200 milliards de dollars [1]. Ces lombalgies s'expliquent, dans 40 % des cas, par une dégénérescence du disque intervertébral (DIV). Les mécanismes de cette dégénérescence sont aujourd'hui mieux documentés et offrent de nouvelles opportunités de traitements. Il est aujourd'hui admis que le *nucleus pulposus* (NP), partie centrale du DIV, est la première structure affectée. La disparition des cellules du NP est considérée comme un élément pivot du processus de dégénérescence, qui entraîne une atteinte qualitative et quantitative des constituants de la matrice extracellulaire (MEC). Celle-ci devient fibreuse et déshydratée, entraînant une perte des fonctions biomécaniques du DIV. Actuellement, la prise en charge des patients lombalgiques se fonde sur

Médecine régénératrice du disque intervertébral

De la physiopathologie à l'application clinique

Nina Henry^{1,3,4}, Pauline Colombier^{1,3},
Laurent Lescaudron^{1,3,4}, Olivier Hamel^{1,3,5,6},
Jean Le Bideau², Jérôme Guicheux^{1,3,7},
Johann Clouet^{1,3,8,9}



des traitements médicamenteux et chirurgicaux (arthrodèse et arthroplastie) qui présentent néanmoins certaines limites. Il s'agit notamment du caractère invasif des approches chirurgicales, des risques de dégénérescence des étages adjacents liés à la technique d'arthrodèse, et de descellement de la prothèse liés à la technique d'arthroplastie.

Dans ce contexte, la médecine régénératrice basée sur l'apport au NP dégénéré de cellules fonctionnelles (thérapie cellulaire) pourrait constituer une option thérapeutique prometteuse. Plusieurs sources de cellules sont actuellement proposées présentant chacune des avantages et des inconvénients. Afin de favoriser la survie et l'intégration tissulaire de ces cellules et restaurer les propriétés mécaniques du DIV, l'utilisation d'un biomatériau est également parfois envisagée (ingénierie tissulaire). Actuellement, des études précliniques et cliniques ont d'ores et déjà débuté et leurs résultats sont encourageants.

¹Inserm UMRS791-LI0AD (laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire), groupe STEP (skeletal tissue engineering and physiopathology), 1, place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France ;

²Institut des matériaux Jean Rouxel (IMN), UMR6502 université de Nantes-CNRS, 44322 Nantes, France ;

³Université de Nantes, UFR odontologie, 44042 Nantes, France ;

⁴Université de Nantes, UFR sciences et techniques, 44042 Nantes, France ;

⁵CHU Nantes, PHU4 OTONN, service de neurotraumatologie, 44042 Nantes, France ;

⁶Université de Nantes, UFR Médecine, 44042 Nantes, France ;

⁷CHU Nantes, PHU 4 OTONN, 44042 Nantes, France ;

⁸CHU Nantes, PHU 7 biologie-pharmacie, pharmacie centrale, 44042 Nantes, France ;

⁹Université de Nantes, UFR sciences biologiques et pharmaceutiques, 44042 Nantes, France.

jerome.guicheux@inserm.fr

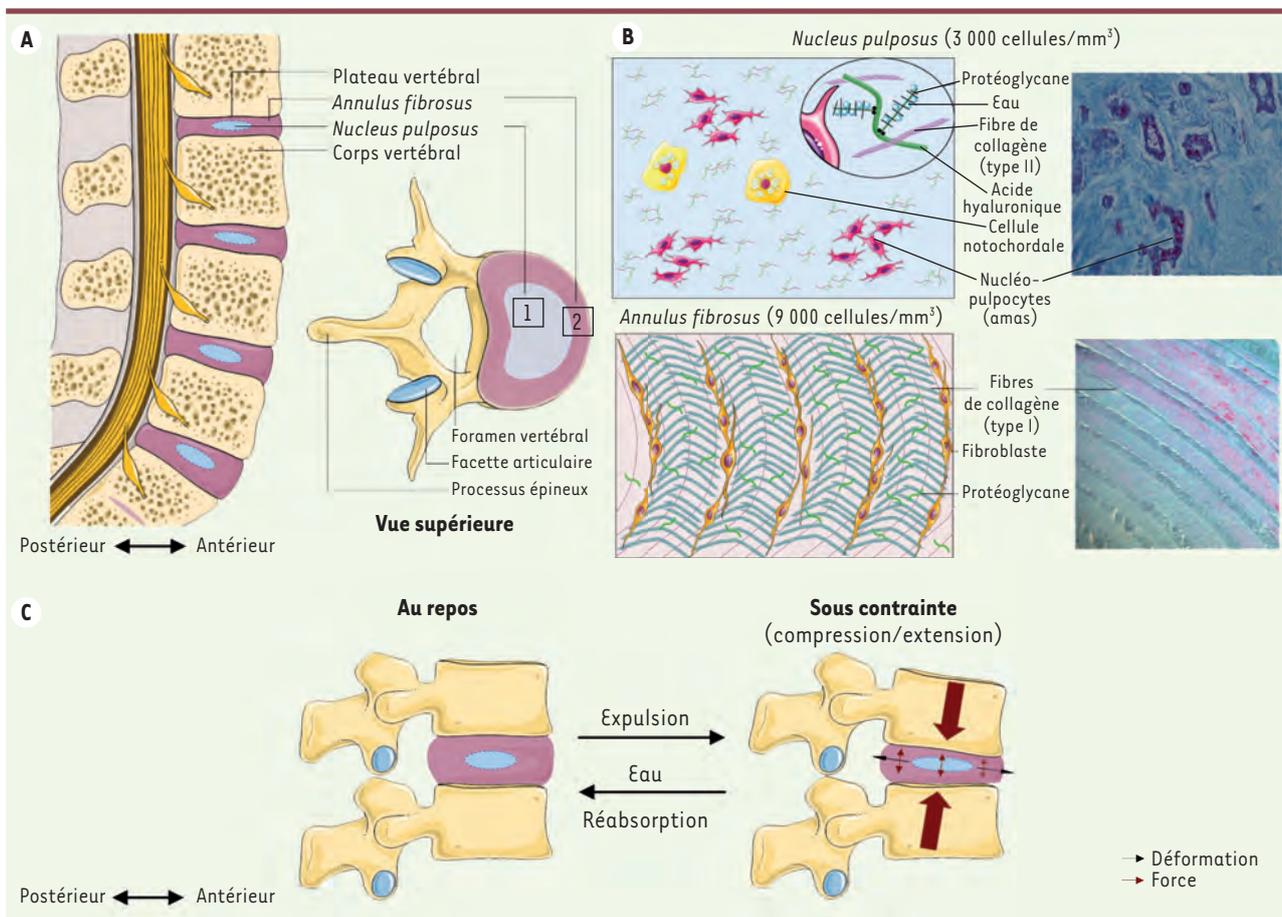


Figure 1. Le disque intervertébral sain. A. Organisation du rachis lombaire et aspect général d'un DIV lombaire : *nucleus pulposus* (1) et *annulus fibrosus* (2). B. Organisation matricielle du DIV. C. Biomécanique du DIV au repos et sous contrainte.

Disque intervertébral sain, disque intervertébral dégénéré

Le disque intervertébral sain

Historiquement considérés comme des ligaments intervertébraux servant d'amortisseurs fibro-hydrauliques unissant les vertèbres, les DIV constituent en fait les articulations semi-mobiles (amphiarthroses) de la colonne vertébrale. Vingt-trois DIV permettent le maintien de la stabilité et de la dynamique rachidienne. Chaque DIV sain est composé de trois éléments : l'anneau fibreux (*annulus fibrosus*, AF) entourant le noyau pulpeux (*nucleus pulposus*, NP) et les plateaux cartilagineux, qui permettent la jonction entre le DIV et les vertèbres sus- et sous-jacentes. Ces structures présentent chacune une organisation spécifique illustrée sur la Figure 1 [2]. Dans les années 1990, la coexistence de deux types cellulaires au sein du NP a été démontrée : les cellules du NP, dont le phénotype est proche de celui des chondrocytes articulaires, et les cellules notochordales (CNT). Depuis 2007, plusieurs publications ont démontré l'existence d'un phénotype singulier de ces cellules du NP, nous amenant à les dénommer nucléopulpocytes (NPCytes). Ces nucléopulpocytes expriment spécifiquement différents marqueurs (OVOS2 [ovostatin 2], PAX1 [paired box protein 1], CD24, CA12 [carbonic anhydrase XII]) et partagent l'expression des

marqueurs ACAN (agrécan) et COL2A1 (collagène de type II) avec les chondrocytes articulaires. Cependant, le rapport ACAN/COL2A1 est de 2:1 pour le cartilage articulaire et de 27:1 pour le NP, ce qui démontre l'activité de synthèse spécifique des nucléopulpocytes [3-8]. Les cellules notochordales sont des vestiges de la notochorde embryonnaire. Au cours de la troisième semaine de développement embryonnaire humain, une structure spécifique appelée « le nœud » se met en place. Les cellules du nœud s'invaginent ensuite dans l'espace mésodermique pour former l'axe médian de l'embryon qu'est la notochorde. Cet organe est responsable de la mise en place du squelette axial grâce à son activité sécrétoire (Shh, chordin, noggin). Dès la 8^e semaine de développement, la notochorde disparaît progressivement pour laisser place aux vertèbres et à l'anneau fibreux. Entre les vertèbres, ces cellules notochordales prolifèrent et forment le NP [9]. Dès la naissance, ce dernier subit des processus de maturation marqués, notamment par la disparition progressive des cellules notochordales selon un mécanisme encore inconnu

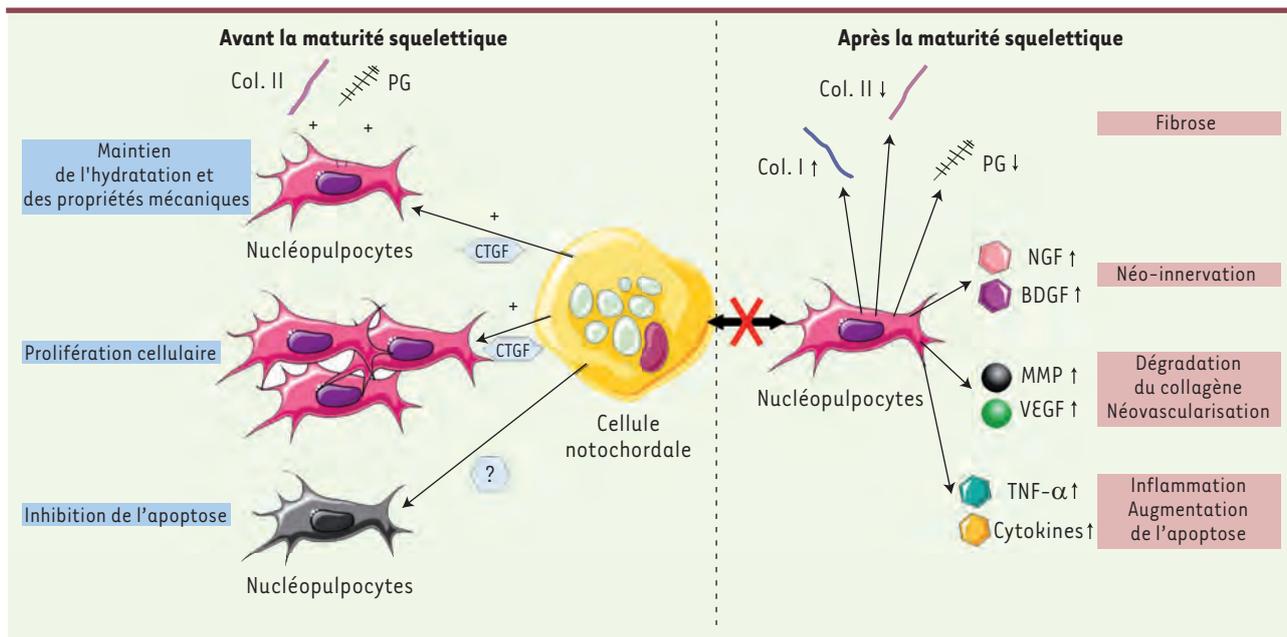


Figure 2. Dialogue moléculaire entre les cellules notochordales et les nucléolipocytes. Les cellules notochordales, présentes dès la formation du DIV, favorisent la prolifération des nucléolipocytes et la synthèse d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en eau, en collagène de type II et en protéoglycane. Quand les cellules notochordales disparaissent, ce dialogue moléculaire est rompu et les nucléolipocytes s'engagent dans un programme catabolique conduisant à une fibrose de la MEC, une néo-innervation, une néo-vascularisation, une inflammation, ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose. (?): médiateur inconnu; X: rupture de la communication moléculaire; +: stimulation de la synthèse; ↑ augmentation de la synthèse; PG: protéoglycane; Col. I: collagène de type I; Col. II: collagène de type II; CTGF/CCN2: *connective tissue growth factor/CCN2*; NGF: *nerve growth factor*; BDGF: *brain derived growth factor*; MMP: *matrix metalloproteinase*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; TNF- α : *tumor necrosis factor- α* .

[10]. Grâce au développement de souris génétiquement modifiées et d'outils moléculaires qui permettent le suivi des cellules notochordales, deux études ont démontré que les cellules du NP, ou nucléolipocytes, provenaient de la notochorde [7, 8]. Ainsi, l'hypothèse d'une différenciation progressive des cellules notochordales en nucléolipocytes fait actuellement l'objet d'investigations.

De plus, de récentes études ont démontré que les cellules notochordales stimulent la synthèse de protéoglycane (PG) par les nucléolipocytes ainsi que leur prolifération, grâce à la sécrétion notamment du *connective tissue growth factor* (CTGF/CCN2) (Figure 2) [11]. Ces protéoglycane retiennent les molécules d'eau et offrent au NP des propriétés de déformabilité et de résistance aux contraintes mécaniques incomparables et indispensables au maintien de la dynamique rachidienne [2].

Ces relations moléculaires et cellulaires sont primordiales pour le maintien de l'homéostasie discale. Elles restent néanmoins fragiles et sont particulièrement affectées au cours du vieillissement.

Le disque intervertébral dégénéré

L'amortisseur fibro-hydraulique, constitué par le DIV et surtout par le NP, voit ses capacités de résistance aux contraintes mécaniques diminuer avec de l'âge. La région lombaire est particulièrement touchée, et l'hypothèse d'une usure liée à des contraintes mécaniques répétées

a été longtemps défendue. L'origine multifactorielle de la dégénérescence discale est aujourd'hui bien décrite (composantes génétique, biomécanique, environnementale) et le rôle clé des cellules du NP dans la mise en place de ce processus est privilégié [2]. En effet, la disparition progressive des cellules notochordales s'accompagne d'une rupture du dialogue moléculaire avec les nucléolipocytes, ce qui entraîne un déséquilibre de l'homéostasie discale. Ainsi, au moment de la maturité squelettique, période coïncidant avec les premiers signes de dégénérescence discale, la disparition des cellules notochordales est observée, et elle précède la disparition progressive des nucléolipocytes. En parallèle, une atteinte qualitative et quantitative des composants de la MEC se met progressivement en place (Figure 3). Cette atteinte touche particulièrement les protéoglycane et s'accompagne d'une déshydratation de la MEC et d'une diminution des capacités de résistance aux contraintes mécaniques.

Aujourd'hui, le rôle pivot de la disparition des cellules discales dans la mise en place de la dégénérescence du DIV contribue à faire de la médecine régénératrice une approche thérapeutique particulièrement prometteuse.

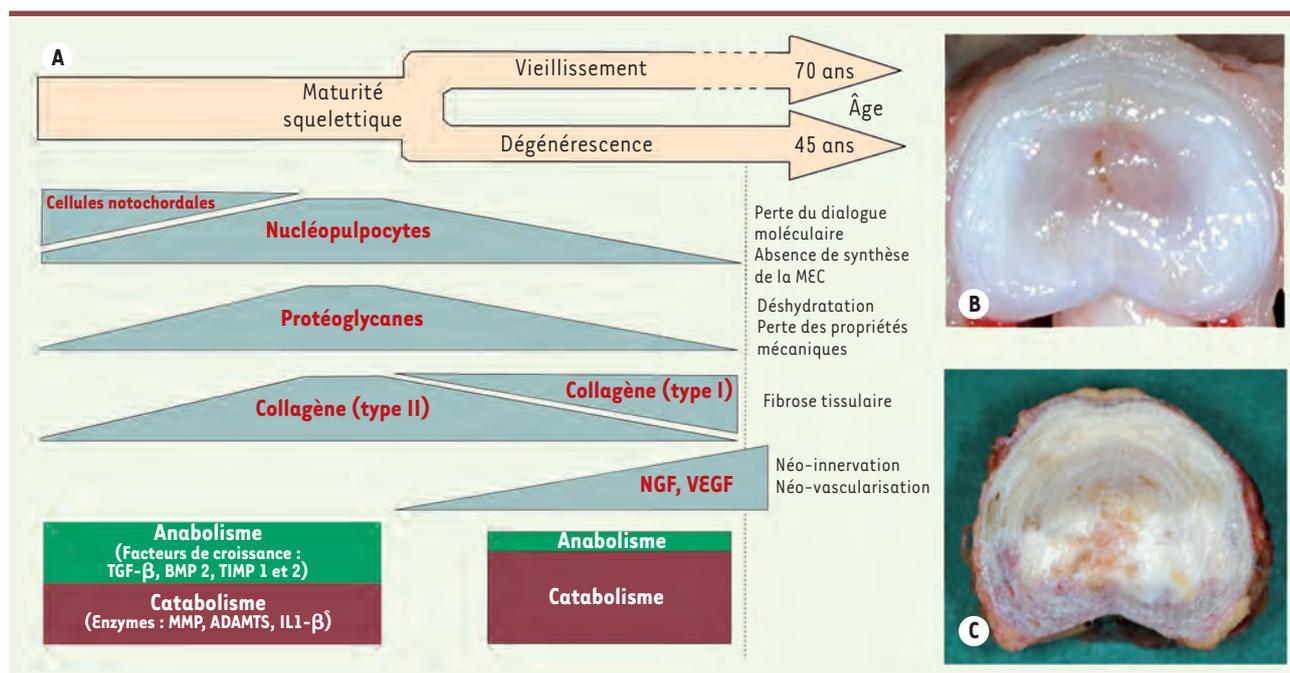


Figure 3. La dégénérescence discale. **A.** Représentation schématique de l'évolution des composants du DIV au cours de la dégénérescence discale. **B.** Vue macroscopique d'un DIV sain (hautement hydraté). **C.** Vue macroscopique d'un DIV dégénéré (déshydraté et fibrotique). MEC : matrice extracellulaire ; DIV : disque intervertébral ; NGF : *nerve growth factor* ; VEGF : *vascular endothelial growth factor* ; TGF-β : *transforming growth factor-β* ; BMP2 : *bone morphogenic protein 2* ; TIMP1-2 : *tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and 2* ; MMP : *matrix metalloproteinase* ; ADAMTS : *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ; IL1-β : *interleukine 1-β*.

Basée sur l'utilisation de cellules capables de restaurer les compartiments cellulaires altérés, associées ou non à un biomatériau, la médecine régénératrice du DIV a pour objectif de restaurer la MEC discale afin de rétablir ses propriétés de résistance aux contraintes mécaniques.

La médecine régénératrice du disque intervertébral : contexte et résultats actuels

Trois approches thérapeutiques sont susceptibles d'être utilisées : la thérapie génique, la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire. Ces deux dernières, qui ont en commun l'utilisation de cellules régénératrices, retiennent aujourd'hui l'attention au regard de l'origine multifactorielle de la dégénérescence discale (Figure 4).

La thérapie cellulaire

Cette première approche est basée sur l'utilisation de cellules fonctionnelles afin de restaurer la MEC discale.

Les différentes sources cellulaires

- **Les cellules du NP et les chondrocytes articulaires.** L'utilisation de cellules du NP issues de DIV sains étant impossible du fait de la morbidité associée au prélèvement, des cellules provenant de DIV herniés ont fait l'objet d'investigations précliniques et cliniques avec des résultats satisfaisants [12]. Ainsi, chez l'animal, mais également chez

des patients présentant une hernie discale, l'injection de ces cellules a permis de restaurer l'intensité du signal en T2 à l'IRM (imagerie par résonance magnétique), reflétant une amélioration de l'état d'hydratation discal. Cependant, leur usage à grande échelle est aujourd'hui peu envisageable du fait de la trop faible quantité de cellules obtenues lors des prélèvements, et de la nature pathologique des cellules de DIV herniés, dont le phénotype est différent de celui des cellules de NP sain (Figure 4).

Compte tenu de certaines similitudes des chondrocytes articulaires avec les nucléopulpyocytes (capacité à synthétiser une MEC riche en protéoglycanes et en collagène de type II), l'utilisation des premiers a été proposée pour traiter la dégénérescence discale (Figure 4). Ainsi, la formation d'un tissu cartilagineux a pu être démontrée [13]. Aujourd'hui cependant, la description d'une signature phénotypique singulière des nucléopulpyocytes a remis en question la pertinence de l'utilisation de chondrocytes pour la médecine régénératrice du DIV. Dans ce contexte, l'utilisation d'autres types cellulaires a été envisagée.

- **Les cellules souches mésenchymateuses.** La multipotence des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en fait des candidates prometteuses pour la médecine

régénératrice. Leur accessibilité est également un atout par rapport aux cellules décrites précédemment. Actuellement, les travaux utilisant les CSM de la moelle osseuse et du tissu adipeux sont les plus avancés.

La nature indifférenciée ou pré-différenciée de ces cellules souches lors de leur injection *in situ* constitue un point de discussion majeur modifiant les stratégies mises en œuvre (Figure 4). Des cellules souches non différenciées, répondant aux signaux locaux une fois injectées dans le DIV, pourraient se différencier en un type cellulaire compatible avec une régénérescence discale. Cette hypothèse se fonde sur les propriétés de plasticité des CSM [14], ainsi que sur leurs propriétés anti-inflammatoires et trophiques¹ [15, 16]. Pour le moment, à notre connaissance, cette plasticité en réponse à l'environnement n'a pas été démontrée pour les cellules implantées dans un site discale. L'utilisation de cellules indifférenciées expose aussi au risque de leur migration vers d'autres organes, pouvant y faire émerger des processus carcinogéniques. Aucune étude ne s'est intéressée à la biodistribution des CSM après injection intradiscale, et aucun processus cancérogène n'a été démontré ou infirmé. Ce risque théorique reste faible.

L'utilisation de cellules pré-différenciées se heurte à un autre obstacle, d'ordre technique : aucun laboratoire n'a clairement identifié le(s) protocole(s) de différenciation adéquat(s) permettant d'induire la différenciation des CSM en nucléopulpytes. Plusieurs pistes sont actuellement envisagées utilisant des facteurs de croissance, la modulation de la pression d'oxygène et la culture tridimensionnelle (3D). En effet, il a été montré qu'en présence de 2 % d'oxygène, de *growth differentiation factor 5* (GDF5) et de *transforming growth factor-β* (TGF-β), des CSM de moelle osseuse cultivées en 3D (micro-masses) synthétisent de l'agrécane et des glycosaminoglycanes [17]. Parallèlement à cette stratégie d'enrichissement d'un milieu de culture, l'utilisation d'un milieu conditionné à partir de cellules notochordales issues de NP jeunes pourrait s'avérer efficace pour différencier des CSM en nucléopulpytes. En effet, une étude a pu montrer une synthèse de glycosaminoglycanes sulfatés dans ces conditions [18].

• **Les iPS : la nouvelle donne ?** Les cellules iPS (*induced pluripotent stem cell*) proviennent de la reprogrammation de cellules somatiques (le plus souvent des fibroblastes cutanés) par l'expression forcée de facteurs de transcription caractéristiques de l'état pluripotent [19]. Elles possèdent les propriétés des cellules souches embryonnaires (CSE) et pourraient être un outil particulièrement intéressant en médecine régénératrice [20]. Un essai utilisant des cellules iPS autologues différenciées en cellules de l'épithélium rétinien pigmenté a d'ailleurs débuté au Japon à l'été 2014 pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge [21]. Les cellules iPS – qui, contrairement aux CSE, ne posent pas les problèmes éthiques d'utilisation d'embryons – pourraient constituer un tournant dans la stratégie de prise en charge de la dégénérescence discale. Ainsi, il a été récemment montré que des cellules iPS murines, différenciées en corps embryoides, dont les cellules sont triées selon leur expression de CD24, un marqueur de cellules

progénitrices du NP [22], pouvaient se différencier en une population cellulaire proche des nucléopulpytes. Ces cellules se sont révélées capables de synthétiser les composants de la MEC d'un NP natif (protéoglycanes et collagène de type II) [23].

La différenciation des iPS en cellules notochordales pourrait constituer également une approche intéressante au regard de l'absence d'une source de cellules notochordales. Ainsi, l'apport de cellules notochordales issues d'iPS permettrait de rétablir le dialogue moléculaire avec les nucléopulpytes décrit précédemment afin de restaurer un environnement discal intègre (Figure 4).

• **Cellules autologues ou allogéniques ?** L'origine autologue ou allogénique des cellules thérapeutiques fait également l'objet de nombreuses discussions. Le développement de banques de cellules allogéniques garantirait la qualité des procédés de fabrication selon des normes GMP (*good manufacturing practice*) et offrirait des cellules « prêtes à l'emploi ». Cette validation est primordiale afin de garantir aux patients toute la sécurité indispensable à l'utilisation de ces médicaments de thérapie innovante (MTI ou ATMP [*advanced therapy medicinal products*]) selon le règlement européen 1394/2007 [45]. Un premier essai clinique ayant pour objectif de traiter l'infarctus du myocarde de patients avec des cellules souches mésenchymateuses préalablement différenciées *in vitro* en cellules cardiogénitrices selon différentes combinaisons de facteurs a d'ores et déjà été mené [24].

L'utilisation de cellules allogéniques présente théoriquement plusieurs risques ou contraintes. Une première contrainte est celle des aspects éthiques et des exigences liées au prélèvement de tissus ou de cellules chez les donneurs potentiels. Le risque est aujourd'hui limité au regard des réglementations existantes, notamment au niveau européen (directive 2004/23 CE : normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, le stockage et la distribution de tissus et cellules humains). Dans le contexte de la thérapie du DIV, l'obtention de CSM de donneurs peut être envisagée et n'expose pas aux mêmes risques ni questions éthiques que d'autres prélèvements (cellules d'embryon, de cordon ombilical, etc.). Le second risque auquel expose une utilisation de cellules allogéniques est le risque infectieux. Ce dernier semble maîtrisable grâce à une sélection des donneurs et à la mise en place de tests de sécurité sanitaire sur les cellules prélevées. Le dernier risque, immunogénique, est lié au développement de réactions immunitaires lors de l'injection de cellules allogéniques à l'origine d'un potentiel rejet. Ce risque semble cependant faible dans le contexte discal.

¹ Voir à ce propos le numéro thématique de *médecine/sciences* « Cellules souches mésenchymateuses » publié en mars 2011 (vol. 27, n° 3).

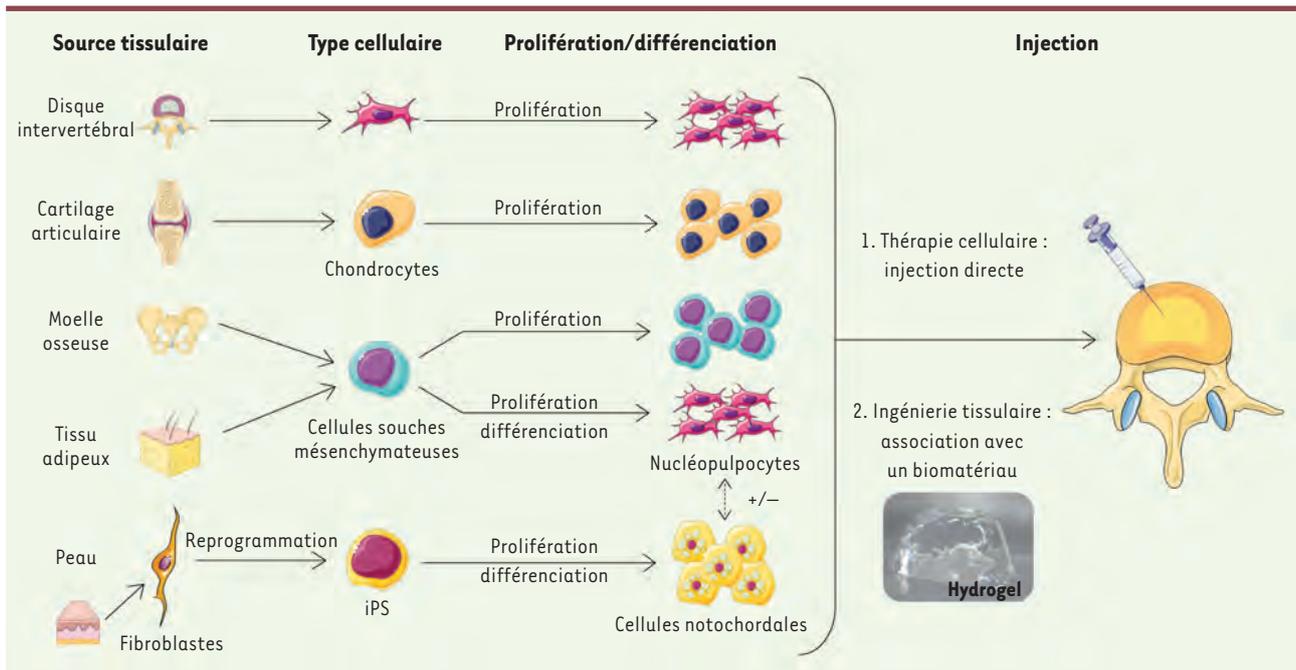


Figure 4. Médecine régénératrice : de la thérapie cellulaire à l'ingénierie tissulaire. Le principe de la thérapie cellulaire repose sur l'injection *in situ* d'un ou plusieurs types de cellules, différenciées ou non. L'ingénierie tissulaire fait appel à un biomatériau qui permet de protéger les cellules injectées, et leur fournit un environnement adapté. IPS : *induced pluripotent stem cell* ; +/- : possibilité d'association des nucléopulpcytes et des cellules notochordales.

En effet, il a été démontré que les CSM présentent des propriétés immunogéniques faibles [16, 25]. De plus, l'environnement discal constitue un site immunoprivilégié qui pourrait limiter ce risque [26]. L'utilisation de cellules autologues peut également être envisagée mais pourrait conduire à une augmentation des coûts de production par rapport à la production des cellules régénératrices d'origine allogénique. L'harmonisation des procédés entre les établissements sera également un élément à surveiller. Dans les deux cas, et conformément au statut des MTI, l'obtention d'une autorisation des établissements pharmaceutiques sera nécessaire et ils devront se doter de procédures et de lieux adaptés à la manipulation des cellules.

Thérapie cellulaire : résultats cliniques actuels

Plusieurs études précliniques ont permis de démontrer la capacité de cellules « régénératrices » (cellules du NP, cellules adultes, CSM non différenciées) à synthétiser une MEC cartilagineuse en l'absence de matériau [13, 27, 28]. Parfois imparfaites, notamment par l'absence d'uniformité entre les matériels et les méthodes, ces études précliniques ont malgré tout permis d'envisager la mise en œuvre d'études cliniques. Une étude avec des cellules autologues du NP (isolées d'un DIV hernié adjacent) cultivées pendant 12 semaines avant leur réimplantation montre à deux ans, au niveau morphologique, une restauration des signaux IRM reflétant l'état d'hydratation du tissu discal et une réduction des douleurs (essai EuroDisc chez environ 60 patients) [12]. Dans une autre étude, ayant pour objectif de traiter 15 patients avec des chondrocytes

juvéniles d'origine allogénique [29], une amélioration de l'indice de hauteur discale et des symptômes douloureux était notée après un an. Aucune amélioration de l'hydratation des DIV des patients n'a cependant été observée. Concernant les études utilisant des CSM, seules des CSM non différenciées ont été utilisées. Une première étude, portant sur 10 patients et utilisant des cellules précurseurs autologues, n'a montré aucune amélioration des symptômes douloureux [30]. À l'inverse, deux autres études (2 et 10 patients), utilisant de la moelle osseuse autologue (contenant environ 0,01 % de CSM indifférenciées), ont démontré une amélioration significative des douleurs chez les patients, ainsi qu'une restauration partielle de l'hydratation du DIV [31, 32]. Le faible nombre de patients de ces études ne permet pas de conclure quant à l'efficacité de l'utilisation des CSM. Des études complémentaires, dont certaines sont déjà en cours (Tableau 1), sont nécessaires afin de consolider ces premiers résultats cliniques. De plus, l'avancée de nos connaissances de la différenciation des CSM en nucléopulpcytes s'accompagnera probablement d'études précliniques et cliniques. Ces investigations devraient permettre de décider quelle stratégie, parmi celles décrites précédemment (Figure 4), sera la plus efficace.

Promoteur	Produit	Nbre patients	Indications	Nature des cellules	Caractéristiques de l'étude	Contrôle	Références
Celling treatment center (Austin, États-Unis)	Regena-DISC	NA	Dégénérescence discale et hernie discale	CSM autologues (moelle osseuse ou tissu adipeux)	NA	NA	http://www.regenadisc.com
Mesoblast Ltd (New York, États-Unis)	-	100	Dégénérescence discale	CSM allogéniques	Prospective, interventionnelle, randomisée, double aveugle	Solution saline, solution d'acide hyaluronique	ClinicalTrial.gov NCT01290367
Tetec AG (Rentlingen, Allemagne)	Novocart Disc plus	120	Hernie discale	Cellules du NP autologues	Prospective, interventionnelle, randomisée, ouverte	Novocart Disc basic (pas de cellules), Séquestrectomie	ClinicalTrial.gov NCT01640457
RNL Bio Company Ltd. (Séoul, Corée)	-	8	Dégénérescence discale	CSM autologues (tissu adipeux)	Prospective, interventionnelle, non randomisée, ouverte	Un seul bras expérimental	ClinicalTrial.gov NCT01643681
Red de Terapia Celular (Valladolid, Espagne)	-	24 (2x12)	Dégénérescence discale	CSM allogéniques (moelle osseuse)	Prospective, interventionnelle, randomisée, double aveugle	Mépicavaïne	ClinicalTrial.gov NCT01860417
Bioheart, Inc (Sunrise, États-Unis)	-	100	Dégénérescence discale	Cellules souches adipeuses	Prospective, interventionnelle, ouverte, multicentrique	Un seul bras expérimental	ClinicalTrial.gov NCT02097862

Tableau 1. Médecine régénératrice du disque intervertébral : dispositifs et essais cliniques. NA : non applicable, signifie qu'il ne s'agit pas d'un essai clinique.

L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire a pour principe l'utilisation de cellules associées à un biomatériau ou à une matrice. Les approches utilisant un biomatériau dépourvu de cellules (prothèses partielles du DIV) ne seront pas traitées ici.

Rôles du biomatériau

Associée aux cellules « régénératrices », l'utilisation d'un biomatériau est envisagée pour plusieurs raisons. La première s'explique par le pourcentage élevé de mort cellulaire qui accompagne l'injection *in situ* des cellules et qui risque de limiter la réparation du tissu discal. Ainsi, l'utilisation d'un biomatériau cytoprotecteur favoriserait la survie, la prolifération et la différenciation des cellules injectées [33].

Ce biomatériau pourrait également permettre de reproduire les propriétés de résistance aux contraintes mécaniques du DIV. Dans ce contexte, les progrès dans le domaine de la physico-chimie des matériaux et de l'ingénierie biomédicale ont permis le développement de

multiples biomatériaux avec des propriétés biomécaniques variées [34].

Propriétés des biomatériaux

Parmi les biomatériaux développés, une famille se distingue pour des applications discales. Il s'agit de la famille des hydrogels, qui regroupe des polymères capables de former des réseaux hautement hydrophiles (> 90 % d'eau) rappelant la structure de la MEC du NP [2, 35, 36]. Les polymères utilisés dans la formation des hydrogels peuvent être d'origine naturelle (alginate, chitosan, acide hyaluronique, cellulose, etc.) ou synthétique (poly acide lactique co-glycolique [PLGA], poly acide lactique [PLA], etc.).

Les avantages des polymères d'origine naturelle sont leur faible toxicité et leur biocompatibilité. Une variabilité importante lors de l'extraction des polymères naturels et de leur formulation doit être néanmoins

Propriétés	Définition	Implications en ingénierie tissulaire du DIV
Biocompatibilité	Capacité à provoquer une réponse appropriée de l'organisme hôte dans une application spécifique	Absence de réactions inflammatoires
Cytocompatibilité	Capacité à conserver la viabilité des cellules	Maintien des caractéristiques cellulaires propices à la synthèse d'une MEC adaptée
Biofonctionnalité	Capacité à remplir <i>in vivo</i> les fonctions biologiques auxquelles la matrice est destinée	Synthèse d'une MEC nucléopolypogénique riche en protéoglycanes offrant une résistance aux contraintes mécaniques
Injectabilité	Biomatériau injectable	Prise en charge ambulatoire du patient par chirurgie mini-invasive (percutanée)
Perméabilité	Diffusion des nutriments et des déchets	Échanges de gaz, nutriments et déchets. Maintien de la viabilité cellulaire et de la synthèse de la matrice extracellulaire discale
Biodégradabilité	Dégradation du biomatériau au cours du temps	Remplacement du biomatériau par une MEC discale intègre

Tableau II. Propriétés des biomatériaux/matrices et implications en ingénierie tissulaire du DIV.

soulignée, car elle limite l'homogénéité des résultats des expérimentations. À l'inverse, la variabilité des polymères synthétiques est faible et leurs propriétés peuvent être modulées aisément.

Il n'existe actuellement pas de consensus concernant le choix du biomatériau le plus adapté pour une application en ingénierie tissulaire du DIV. Le biomatériau utilisé doit néanmoins présenter certaines propriétés intrinsèques (Tableau II). Le caractère auto-durcissant (dépendant du pH ou de la température) de l'hydrogel [37] constitue une propriété intéressante, car elle permet d'envisager la mise en œuvre d'approches chirurgicales mini-invasives dont le bénéfice médico-économique est certain.

La biofonctionnalité est également une propriété indispensable. Ainsi, le biomatériau doit supporter, voire stimuler, la synthèse d'une MEC par les cellules régénératrices (cellules du NP, chondrocytes articulaires, CSM) ; cela a d'ores et déjà été démontré par certaines études [38-40]. La nature hyper-hydratée des hydrogels permet, en outre, de reproduire l'environnement discal natif (hydratation du NP > 95 %) et renforce leur intérêt en ingénierie tissulaire du DIV.

Dans le choix du biomatériau pour l'ingénierie tissulaire discale, une autre propriété intrinsèque doit être prise en compte au regard du rôle du DIV dans la résistance aux contraintes mécaniques rachidiennes. Les propriétés mécaniques des biomatériaux sont ainsi souvent explorées et comparées aux propriétés de compression du NP isolé qui sont d'environ 10-kPa [34]. Dans ce contexte, la nature hyper-hydratée des hydrogels offre des propriétés de résistance hydraulique (*swelling*)

particulièrement intéressantes. La modulation de ces propriétés mécaniques fait actuellement l'objet de multiples investigations basées notamment sur l'ajout de renforts mécaniques.

Ingénierie tissulaire : résultats actuels

Contrairement aux études de thérapie cellulaire, aucun essai clinique chez l'homme n'a actuellement été effectué en ingénierie tissulaire. Seules des études précliniques associant cellules régénératrices et biomatériau ont été réalisées. Toutes utilisent des CSM non différenciées d'origine médullaire [41-43] couplées à différents biomatériaux (atélcollagène, PLGA, collagène II/acide hyaluronique/chondroïtine). Les résultats de ces études démontrent la formation *de novo* d'une MEC cartilagineuse. Comme pour les études précliniques en thérapie cellulaire, il existe des disparités entre les matériels et les méthodes utilisés dans ces études (modèles animaux tels que le rat, le chien ou le lapin ; concentration en cellules injectées ; nature du biomatériau utilisé) qui compliquent l'analyse des résultats. Néanmoins, une méta-analyse récente a permis de comparer l'ensemble de ces études animales. Elle montre une amélioration au cours du temps des signaux IRM, reflétant l'hydratation des DIV traités [44]. L'absence de données biomécaniques

ne permet cependant pas de conclure quant à l'efficacité de cette stratégie d'ingénierie tissulaire sur l'amélioration de la résistance aux contraintes mécaniques des DIV traités. De multiples questions restent donc encore en suspens, à commencer par la définition du biomatériau le plus adapté ; la combinaison avec des types cellulaires, autres que les CSM non différenciées, peut être également envisagée.

Conclusion

L'amélioration des connaissances physiopathologiques de la dégénérescence discale permet d'envisager la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire du NP comme des approches particulièrement prometteuses pour le traitement des lombalgies discogéniques. Pour faire de celles-ci des innovations de rupture dans la prise en charge des patients lombalgiques et répondre aux limites des traitements actuels, de nombreuses questions devront être résolues. Cependant, l'approfondissement des connaissances acquises dans le domaine des cellules souches et des biomatériaux devrait permettre d'envisager prochainement la restauration d'un tissu discal et de ses propriétés mécaniques. ♦

SUMMARY

Regenerative medicine of the intervertebral disc: from pathophysiology to clinical application

A large proportion of low back pain may be explained by intervertebral disc (IVD) degeneration. Currently, the process leading to IVD degeneration highlights the pivotal role of IVD cells. The number of these cells drastically decreases and does not support a spontaneous repair of the tissue. In order to counteract IVD degeneration, regenerative medicine, based on a cell supplementation of the damaged tissue is considered as a promising approach. After a description of IVD physiopathology, we will develop the different strategies based on cell therapy and tissue engineering and currently under investigation to improve altered IVD degeneration. Finally, results from the current pre-clinical and clinical studies will be discussed. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Fondation de l'avenir pour la recherche médicale appliquée (FARMA), Fondation pour la recherche médicale (FRM), Start-up grant AO Foundation.

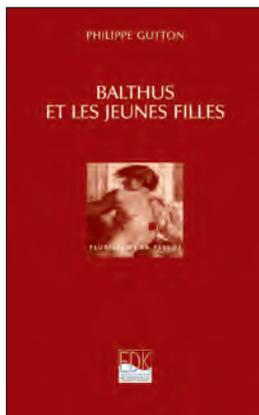
RÉFÉRENCES

- Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain : socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am* 2006 ; 88 : 21-4.
- Clouet J, Vinatier C, Merceron C, et al. The intervertebral disc : from pathophysiology to tissue engineering. *Joint Bone Spine* 2009 ; 76 : 614-8.
- 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.
- Clouet J, Grimandi G, Pot-Vaucel M, et al. Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes. *Rheumatology* 2009 ; 48 : 1447-50.
- Sakai D, Nakai T, Mochida J, et al. Differential phenotype of intervertebral disc cells : microarray and immunohistochemical analysis of canine nucleus pulposus and anulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009 ; 34 : 1448-56.
- Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, et al. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum* 2010 ; 62 : 3695-705.
- McCann MR, Tamplin OJ, Rossant J, Seguin CA. Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse : implications for intervertebral disc development. *Dis Model Mech* 2012 ; 5 : 73-82.
- Choi KS, Cohn MJ, Harfe BD. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse : implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev Dyn* 2008 ; 237 : 3953-8.
- Peacock A. Observations on the postnatal structure of the intervertebral disc in man. *J Anat* 1952 ; 86 : 162-79.
- Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am* 2006 ; 88 Suppl 2 : 10-4.
- Erwin WM, Ashman K, O'Donnell P, Inman RD. Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2006 ; 54 : 3859-67.
- Hohaus C, Ganey TM, Minkus Y, Meisel HJ. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. *Eur Spine J* 2008 ; 17 Suppl 4 : 492-503.
- Acosta FL, Jr, Metz L, Adkisson HD, et al. Porcine intervertebral disc repair using allogeneic juvenile articular chondrocytes or mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2011 ; 17 : 3045-55.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; 284 : 143-7.
- Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells : sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013 ; 13 : 392-402.
- Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells : immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 2014 ; 32 : 252-60.
- Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, et al. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *Eur Cell Mater* 2011 ; 21 : 533-47.
- Korecki CL, Taboas JM, Tuan RS, Iatridis JC. Notochordal cell conditioned medium stimulates mesenchymal stem cell differentiation toward a young nucleus pulposus phenotype. *Stem Cell Res Ther* 2010 ; 1 : 18.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861-72.
- Coulombel L. Cellules iPS humaines : déjà ! *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 102-4.
- Song P, Inagaki Y, Sugawara Y, Kokudo N. Perspectives on human clinical trials of therapies using iPS cells in Japan : reaching the forefront of stem-cell therapies. *Biosci Trends* 2013 ; 7 : 157-8.
- Tang X, Jing L, Chen J. Changes in the molecular phenotype of nucleus pulposus cells with intervertebral disc aging. *PLoS One* 2012 ; 7 : e52020.
- Chen J, Lee EJ, Jing L, et al. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) into nucleus pulposus-like cells in vitro. *PLoS One* 2013 ; 8 : e75548.
- Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, et al. Reply : The C-CURE randomized clinical trial (cardiopoietic stem cell therapy in heart failure). *J Am Coll Cardiol* 2013 ; 62 : 2454-6.
- Goldschlager T, Jenkin G, Ghosh P, et al. Potential applications for using stem cells in spine surgery. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010 ; 5 : 345-55.
- Sun Z, Zhang M, Zhao XH, et al. Immune cascades in human intervertebral disc : the pros and cons. *Int J Clin Exp Pathol* 2013 ; 6 : 1009-14.
- Li X, Lee JP, Balian G, Greg Anderson D. Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in co-cultures with nucleus pulposus. *Connect Tissue Res* 2005 ; 46 : 75-82.
- Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease. *Eur Spine J* 2008 ; 17 Suppl 4 : 452-8.
- Coric D, Pettine K, Sumich A, Boltes MO. Prospective study of disc repair with allogeneic chondrocytes presented at the 2012 Joint Spine Section Meeting. *J Neurosurg Spine* 2013 ; 18 : 85-95.
- Haufe SM, Mork AR. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs. *Stem Cells Dev* 2006 ; 15 : 136-7.
- Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, et al. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation : a report of two case studies. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010 ; 35 : E475-80.
- Orozco L, Soler R, Morera C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells : a pilot study. *Transplantation* 2011 ; 92 : 822-8.

RÉFÉRENCES

33. Liang Y, Walczak P, Bulte JW. The survival of engrafted neural stem cells within hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials* 2013 ; 34 : 5521-9.
34. Iatridis JC, Nicoll SB, Michalek AJ, et al. Role of biomechanics in intervertebral disc degeneration and regenerative therapies : what needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair? *Spine J* 2013 ; 13 : 243-62.
35. Silva-Correia J, Correia SI, Oliveira JM, Reis RL. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotechnol Adv* 2013 ; 31 : 1514-31.
36. Leung VY, Tam V, Chan D, et al. Tissue engineering for intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am* 2011 ; 42 : 575-83.
37. 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.
38. Collin EC, Grad S, Zeugolis DI, et al. An injectable vehicle for nucleus pulposus cell-based therapy. *Biomaterials* 2011 ; 32 : 2862-70.
39. Cheng YH, Yang SH, Su WY, et al. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration : an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 2010 ; 16 : 695-703.
40. Huang B, Li CQ, Zhou Y, et al. Collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer scaffold for nucleus pulposus tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010 ; 92 : 322-31.
41. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 2006 ; 27 : 335-45.
42. Ruan DK, Xin H, Zhang C, et al. Experimental intervertebral disc regeneration with tissue-engineered composite in a canine model. *Tissue Eng Part A* 2010 ; 16 : 2381-9.
43. Huang B, Zhuang Y, Li CQ, et al. Regeneration of the intervertebral disc with nucleus pulposus cell-seeded collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer constructs in a rabbit disc degeneration model. *Spine (Phila Pa 1976)* 2011 ; 36 : 2252-9.
44. Mehrkens A, Muller AM, Valderrabano V, et al. Tissue engineering approaches to degenerative disc disease—a meta-analysis of controlled animal trials. *Osteoarthritis Cartilage* 2012 ; 20 : 1316-25.
45. Chabannon C, Sabatier F, Rial-Sebbag E, et al. Les unités de thérapie cellulaire à l'épreuve de la réglementation sur les médicaments de thérapie innovante. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 576-83.

TIRÉS À PART
J. Guicheux



ISBN : 978-2-8425-4190-3 204 pages

An'en pas douter Balthus (1908-2001) aura été l'un des peintres les plus singuliers du XX^e siècle. Les décors étranges où évoluent ses personnages l'ont longtemps inscrit dans la mouvance surréaliste, influence pourtant qu'il rejetait. Les poses suggestives de ses modèles, jeunes filles en fleur, adolescentes à peine pubères, ont incité maints commentateurs à le considérer comme un peintre érotique. Mais là encore Balthus réfutait pareille définition réductrice de son art, lui qui se revendiquant fervent catholique, affirmait : « Le peintre doit être religieux ou n'être pas. »

Philippe Gutton, psychanalyste spécialiste de l'adolescence, reprend la question à ses racines dans un souci de ne pas réduire à une interprétation simplificatrice une création si originale. Quelle énigme recèle cette œuvre ? Que nous disent les figures troublantes qui la hantent ? Que révèlent celles-ci de ce temps charnière qu'est l'adolescence ? Qu'en tant qu'âge de découverte de la génitalité et de la mort, elle est paradigmatique de la créativité à laquelle tout être humain est tenu de croire s'il veut échapper à la mélancolie ; qu'elle ouvre au mystère de la femme advenante, au secret du vivant, bref qu'interrogeant la puberté féminine en tant qu'elle symbolise l'origine, Balthus, selon la meilleure esthétique, tente et réussit à rendre visible l'invisible de l'humain se faisant.

Philippe GUTTON est psychiatre, psychanalyste. Professeur honoraire des universités, il a fondé en 1983 et dirige depuis la revue *Adolescence*. Il est l'auteur de nombreux ouvrages, dont, *Le pubertaire, Paris, PUF, 1991* ; *Violence et adolescence, Paris, In Press, 2002* ; *Le génie adolescent, Paris, Odile Jacob, 2008* ; *La chambre des amants, Paris, Odile Jacob, 2011*.



BON DE COMMANDE

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex - Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Balthus et les jeunes filles** : 20 € + 3 € de port = **23 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDK**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

Dans le cadre du développement de cette stratégie thérapeutique, nous avons tout d'abord étudié la biologie du développement du DIV afin de définir les étapes clés de la formation de la notochorde embryonnaire chez la souris et de transposer ces connaissances à la différenciation des iPSC humaines. Nous avons ainsi montré que l'activation des voies TGF- β /Nodal/Activin et Wnt entraînait la différenciation des iPSC en progéniteurs de mésendoderme. La différenciation de ces progéniteurs en CNT a été induite par transfection répétée d'ARNm NOTO et le maintien de l'activité de la voie Wnt. Ce protocole de différenciation a permis de générer des CNT au phénotype stable. La formation d'un complexe protéique FOXA2/T/NOTO a été également démontrée. Afin de préciser le rôle de ce complexe dans la régulation de l'expression des marqueurs de CNT, le séquençage des promoteurs sur lesquels FOXA2 et T sont fixés en présence et en absence de NOTO est envisagé par ChIP sequencing. Malgré les résultats encourageants générés dans cette étude, la différenciation des CNT embryonnaires en CNT matures reste un challenge à relever avant d'envisager leur utilisation en médecine régénératrice du DIV. Aucune donnée dans la littérature ne décrit les mécanismes moléculaires à l'origine de la transition du phénotype des CNT embryonnaires en CNT adultes. La première stratégie envisagée pour produire des CNT matures sera de réaliser des organoïdes à partir de CNT embryonnaires dérivées d'iPSC. Ces organoïdes définissent une structure tridimensionnelle *in vitro* qui permet la différenciation de types cellulaires issus d'un progéniteur commun. Cette technique a été utilisée pour mimer le développement embryonnaire des poumons [591], des cryptes intestinales [592] ou encore du foie [593]. Grâce à cette technique, le développement embryonnaire du NP pourrait être reproduit *in vitro* à partir des CNT embryonnaires dérivées d'iPSC. La maturation de ces cellules ainsi que l'apparition de NPCytes pourrait être observée.

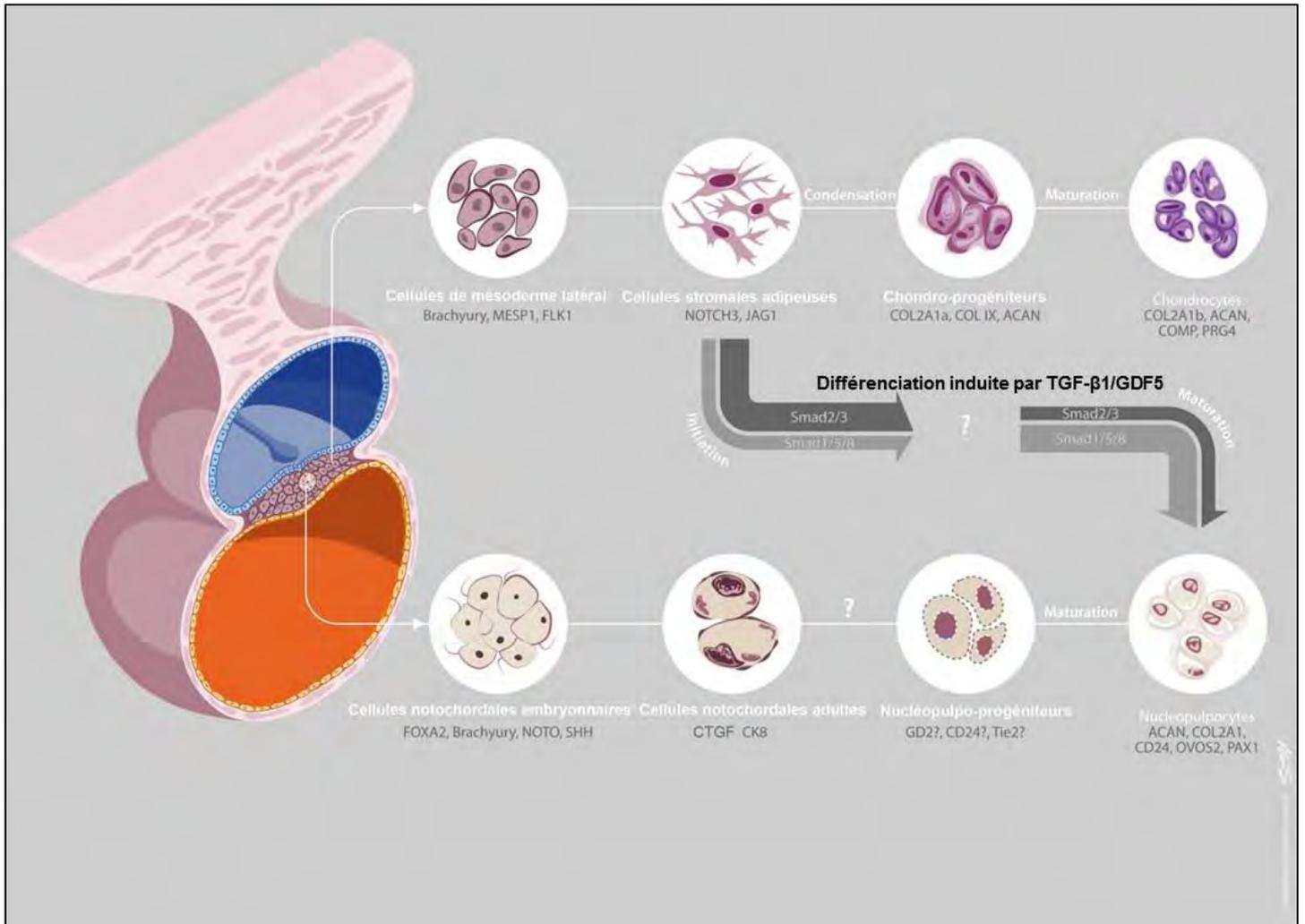


Figure 29 : Modèle de différenciation des cellules stromales adipeuses humaines en nucléopulpyocytes. Les CSA sont issues du mésoderme latéral tandis que les NPCytes proviennent du mésoderme axial (notochorde). L'activation de la voie Smad2/3 est cruciale pour la différenciation des CSA en NPCytes et est active majoritairement pendant la phase d'initiation de la différenciation. La voie Smad1/5/8 est activée principalement durant la phase de maturation de la différenciation. MESP1 : Mesoderm Posterior Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1), FLK1: Tyrosine Kinase Growth Factor Receptor, JAG1: Jagged 1, COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein, PRG4 : Proteoglycan 4, COL2A1a : gène codant pour l'isoforme foetale du collagène de type II, COL2A1b : gène codant pour l'isoforme mature du collagène de type II. ? : Mécanisme inconnu.

Un projet actuellement développé au sein du laboratoire, consiste à mettre au point un modèle *in vitro* de culture de notochordes isolées à partir de souris au stade E11.5. Ce modèle pourrait permettre d'étudier les mécanismes responsables du maintien du phénotype des CNT mais aussi de leur différenciation en CNT matures. Par exemple, le maintien de l'expression de *FoxA2* et *Noto in vitro* (chute à partir de E12.5 *in vivo*) permettrait de mettre en évidence leur potentiel rôle dans la transition notochorde-*Nucleus pulposus*. L'activation et l'inhibition des voies de signalisation Nodal, Wnt et Shh pourraient également permettre de comprendre les étapes de différenciation des CNT embryonnaires en CNT matures.

Dans une deuxième phase expérimentale, nous nous sommes intéressés à produire des NPCytes à partir de CSA humaines. L'action synergique du TGF- β 1 et du GDF5 a permis la différenciation des CSA humaines dans la voie nucléopulpogénique. L'étude du rôle des voies de signalisation Smad2/3 et Smad1/5/8 a permis de préciser les mécanismes de différenciation de cellules issues du mésoderme latéral en cellules dérivant du lignage notochordal (Figure 29). Nous avons ainsi démontré qu'en activant fortement la voie Smad2/3 pendant la phase d'initiation de la différenciation et la voie Smad1/5/8 pendant la phase de maturation, les CSA se différencient en NPCytes. Entre les phases d'initiation et de maturation, les voies Smad sont inactives suggérant la formation d'un progéniteur intermédiaire dont l'activité est régulée par d'autres voies de signalisation. Etant donné que la différenciation des CSA en NPCytes ne consiste pas en la formation d'un progéniteur de type « notochordal », la caractérisation de ce progéniteur intermédiaire permettrait de définir et comprendre les étapes de différenciation nucléopulpogénique des CSA. Cette caractérisation permettrait également de déterminer si ce progéniteur existe *in*

vivo et donc lier cette différenciation de CSA *in vitro* à un mécanisme pouvant exister *in vivo*.

Nous avons également démontré que ces cellules survivent, maintiennent leur phénotype spécialisé et leur activité sécrétrice après transplantation sous-cutanée chez la souris *nude*. Il conviendra maintenant d'analyser les capacités régénératrices des NPCytes-dérivées de CSA dans des modèles animaux de dégénérescence discale. Dans ce contexte, différents modèles animaux ont été développés au sein du laboratoire (lapin et brebis) [594, 595]. Malgré l'apparition d'une dégénérescence discale spontanée au cours du vieillissement chez le lapin, la taille réduite des DIV dans ce modèle ne rend pas aisée l'injection de cellules régénératrices associées à l'hydrogel d'HMPC-Si. Des investigations chez le gros animal (brebis) ont donc débutées chez la brebis au regard des similitudes anatomiques et de taille avec les DIV humains. Le développement d'une dégénérescence spontanée au cours du vieillissement a par ailleurs été démontré chez cet animal. De plus, des injections de 400 à 600 µl d'hydrogel d'HPMC-Si ont été possibles par voie percutanée. L'injection de NPCytes-dérivés de CSA dans des DIV dégénérés de brebis sera donc la prochaine étape de ce projet. Cette étape permettra d'apporter la preuve de concept du potentiel régénérateur des NPCytes générés à partir de CSA. Concernant le potentiel régénérateur des CNT dérivées d'iPSC, plusieurs étapes restent encore à franchir avant d'envisager les premiers essais précliniques. En effet, la compréhension et le contrôle de la différenciation des iPSC en CNT matures ainsi que la mise en évidence d'un effet bénéfique de ces cellules sur l'activité biologique des NPCytes permettra d'envisager des essais précliniques chez la brebis.

Pour conclure sur ce travail de thèse réunissant étude de la biologie du développement et médecine régénératrice, un modèle *in vitro* de CNT et NPCytes humains a été généré. Celui-ci permettra à la fois d'étudier le développement embryonnaire du NP et sa régénérescence. Le potentiel scientifique de ce modèle est large et permettra de répondre tant à des questions fondamentales relevant de la biologie du développement, qu'à des perspectives plus translationnelles développées par les ingénieurs tissulaires.

VII- Références bibliographiques

1. Bartels, E.M., et al., *Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain*. Spine (Phila Pa 1976), 1998. **23**(1): p. 1-7; discussion 8.
2. Moore, R.J., et al., *Changes in endplate vascularity after an outer anulus tear in the sheep*. Spine (Phila Pa 1976), 1992. **17**(8): p. 874-8.
3. Hunter, C.J., J.R. Matyas, and N.A. Duncan, *Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison*. J Anat, 2004. **205**(5): p. 357-62.
4. 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.
5. McCann, M.R., et al., *Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse: implications for intervertebral disc development*. Dis Model Mech, 2011. **5**(1): p. 73-82.
6. Choi, H., Z.I. Johnson, and M.V. Risbud, *Understanding nucleus pulposus cell phenotype: a prerequisite for stem cell based therapies to treat intervertebral disc degeneration*. Curr Stem Cell Res Ther, 2015. **10**(4): p. 307-16.
7. Minogue, B.M., et al., *Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(12): p. 3695-705.
8. Clouet, J., et al., *Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes*. Rheumatology (Oxford, England), 2009. **48**(11): p. 1447-1450.
9. Colombier, P., et al., *Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissue engineers*. Trends Biotechnol, 2014. **32**(9): p. 433-5.
10. Colombier, P., et al., *TGF-beta1 and GDF5 act synergistically to drive the differentiation of human adipose stromal cells towards Nucleus pulposus -like cells*. Stem Cells, 2015.
11. Henry, N., et al., *[Regenerative medicine of the intervertebral disc: from pathophysiology to clinical application]*. Med Sci (Paris), 2014. **30**(12): p. 1091-100.
12. Erwin, W.M., et al., *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.
13. Erwin, W.M., et al., *Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(6): p. R215.
14. Tran, C.M., et al., *Regulation of CCN2/connective tissue growth factor expression in the nucleus pulposus of the intervertebral disc: role of Smad and activator protein 1 signaling*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(7): p. 1983-92.
15. Tran, C.M., I.M. Shapiro, and M.V. Risbud, *Molecular regulation of CCN2 in the intervertebral disc: Lessons learned from other connective tissues*. Matrix Biol, 2013.
16. Bork, P., *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor*. FEBS Lett, 1993. **327**(2): p. 125-30.
17. Sivan, S.S., et al., *Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc*. Eur Spine J, 2014. **23 Suppl 3**: p. S344-53.

18. Nerlich, A.G., B.E. Bachmeier, and N. Boos, *Expression of fibronectin and TGF-beta1 mRNA and protein suggest altered regulation of extracellular matrix in degenerated disc tissue*. Eur Spine J, 2005. **14**(1): p. 17-26.
19. Tran, C.M., et al., *HIF-1alpha and CCN2 form a Regulatory Circuit in Hypoxic Nucleus Pulposus Cells: CCN2 Suppresses HIF-1alpha Level and Transcriptional Activity*. J Biol Chem, 2013.
20. Roberts, S., *Disc morphology in health and disease*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 864-9.
21. DeCandido, P., et al., *Magnetic resonance assessment of the distribution of lumbar spine disc degenerative changes*. J Spinal Disord, 1988. **1**(1): p. 9-15.
22. Luoma, K., et al., *Low back pain in relation to lumbar disc degeneration*. Spine, 2000. **25**(4): p. 487-492.
23. Vos, T., et al., *Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2163-96.
24. Martin, B.I., et al., *Expenditures and health status among adults with back and neck problems*. JAMA, 2008. **299**(6): p. 656-64.
25. Martin, B.I., et al., *Are lumbar spine reoperation rates falling with greater use of fusion surgery and new surgical technology?* Spine (Phila Pa 1976), 2007. **32**(19): p. 2119-26.
26. Bono, C.M. and S.R. Garfin, *History and evolution of disc replacement*. Spine J, 2004. **4**(6 Suppl): p. 145S-150S.
27. Lin, E.L. and J.C. Wang, *Total disk arthroplasty*. J Am Acad Orthop Surg, 2006. **14**(13): p. 705-14.
28. Tam, P.P. and D.A. Loebel, *Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(5): p. 368-81.
29. Ferrer-Vaquero, A., M. Viotti, and A.K. Hadjantonakis, *Transitions between epithelial and mesenchymal states and the morphogenesis of the early mouse embryo*. Cell Adh Migr, 2010. **4**(3): p. 447-57.
30. Ciruna, B.G. and J. Rossant, *Expression of the T-box gene Eomesodermin during early mouse development*. Mech Dev, 1999. **81**(1-2): p. 199-203.
31. Pearce, J.J. and M.J. Evans, *Mml, a mouse Mix-like gene expressed in the primitive streak*. Mech Dev, 1999. **87**(1-2): p. 189-92.
32. Rivera-Perez, J.A. and T. Magnuson, *Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3*. Dev Biol, 2005. **288**(2): p. 363-71.
33. Kinder, S.J., et al., *The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo*. Development, 1999. **126**(21): p. 4691-701.
34. Kinder, S.J., et al., *The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm*. Development, 2001. **128**(18): p. 3623-34.
35. Lawson, K.A., J.J. Meneses, and R.A. Pedersen, *Cell fate and cell lineage in the endoderm of the presomite mouse embryo, studied with an intracellular tracer*. Dev Biol, 1986. **115**(2): p. 325-39.
36. Smith, J.L., K.M. Gesteland, and G.C. Schoenwolf, *Prospective fate map of the mouse primitive streak at 7.5 days of gestation*. Dev Dyn, 1994. **201**(3): p. 279-89.
37. Tam, P.P. and R.S. Beddington, *The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis*. Development, 1987. **99**(1): p. 109-26.

38. Rodaway, A. and R. Patient, *Mesendoderm. an ancient germ layer?* Cell, 2001. **105**(2): p. 169-72.
39. Tada, S., et al., *Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture.* Development, 2005. **132**(19): p. 4363-74.
40. Beddington, R.S., *Induction of a second neural axis by the mouse node.* Development, 1994. **120**(3): p. 613-20.
41. De Robertis, E.M., *Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(4): p. 296-302.
42. Abdelkhalek, H.B., et al., *The mouse homeobox gene Not is required for caudal notochord development and affected by the truncate mutation.* Genes Dev, 2004. **18**(14): p. 1725-36.
43. Lawson, K.A., J.J. Meneses, and R.A. Pedersen, *Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo.* Development, 1991. **113**(3): p. 891-911.
44. Tam, P.P. and R.R. Behringer, *Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan.* Mech Dev, 1997. **68**(1-2): p. 3-25.
45. Bachiller, D., et al., *The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development.* Nature, 2000. **403**(6770): p. 658-61.
46. Blum, M., et al., *Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo.* Differentiation, 2007. **75**(2): p. 133-46.
47. Yamanaka, Y., et al., *Live imaging and genetic analysis of mouse notochord formation reveals regional morphogenetic mechanisms.* Dev Cell, 2007. **13**(6): p. 884-96.
48. Vogan, K.J. and C.J. Tabin, *A new spin on handed asymmetry.* Nature, 1999. **397**(6717): p. 295, 297-8.
49. Sulik, K., et al., *Morphogenesis of the murine node and notochordal plate.* Dev Dyn, 1994. **201**(3): p. 260-78.
50. Hirokawa, N., Y. Tanaka, and Y. Okada, *Cilia, KIF3 molecular motor and nodal flow.* Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(1): p. 31-9.
51. Jurand, A., *Some aspects of the development of the notochord in mouse embryos.* J Embryol Exp Morphol, 1974. **32**(1): p. 1-33.
52. Catala, M., et al., *A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls.* Development, 1996. **122**(9): p. 2599-610.
53. Le Douarin, N.M., *Early neurogenesis in Amniote vertebrates.* Int J Dev Biol, 2001. **45**(1): p. 373-8.
54. Beckers, A., et al., *The mouse homeobox gene Noto regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15765-70.
55. Amacher, S.L. and C.B. Kimmel, *Promoting notochord fate and repressing muscle development in zebrafish axial mesoderm.* Development, 1998. **125**(8): p. 1397-406.
56. Melby, A.E., D. Kimelman, and C.B. Kimmel, *Spatial regulation of floating head expression in the developing notochord.* Dev Dyn, 1997. **209**(2): p. 156-65.
57. Paavola, L.G., D.B. Wilson, and E.M. Center, *Histochemistry of the developing notochord, perichordal sheath and vertebrae in Danforth's short-tail (sd) and normal C57BL/6 mice.* J Embryol Exp Morphol, 1980. **55**: p. 227-45.
58. Choi, K.S. and B.D. Harfe, *Hedgehog signaling is required for formation of the notochord sheath and patterning of nuclei pulposi within the intervertebral discs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9484-9.

59. Kosher, R.A. and J.W. Lash, *Notochordal stimulation of in vitro somite chondrogenesis before and after enzymatic removal of perinotochordal materials*. Dev Biol, 1975. **42**(2): p. 362-78.
60. Cheah, K.S., et al., *Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development*. Development, 1991. **111**(4): p. 945-53.
61. Lefebvre, V., P. Li, and B. de Crombrughe, *A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5718-33.
62. Ng, L.J., et al., *SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse*. Dev Biol, 1997. **183**(1): p. 108-21.
63. 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.
64. Center, E.M., S.S. Spigelman, and D.B. Wilson, *Perinotochordal sheath of heterozygous and homozygous Danforth's short-tail mice*. J Hered, 1982. **73**(4): p. 299-300.
65. Ellis, K., J. Bagwell, and M. Bagnat, *Notochord vacuoles are lysosome-related organelles that function in axis and spine morphogenesis*. J Cell Biol, 2013. **200**(5): p. 667-79.
66. Waddington CH, P.M., *The ultrastructure of the developing urodele notochord*. Proc R Soc London B, 1962.
67. Ellis, K., B.D. Hoffman, and M. Bagnat, *The vacuole within: how cellular organization dictates notochord function*. Bioarchitecture, 2013. **3**(3): p. 64-8.
68. Hunter, C.J., et al., *Osmoregulatory function of large vacuoles found in notochordal cells of the intervertebral disc running title: an osmoregulatory vacuole*. Mol Cell Biomech, 2007. **4**(4): p. 227-37.
69. Ang, S.L. and J. Rossant, *HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development*. Cell, 1994. **78**(4): p. 561-74.
70. Wilkinson, D.G., S. Bhatt, and B.G. Herrmann, *Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation*. Nature, 1990. **343**(6259): p. 657-9.
71. Talbot, W.S., et al., *A homeobox gene essential for zebrafish notochord development*. Nature, 1995. **378**(6553): p. 150-7.
72. Maier, J.A., Y. Lo, and B.D. Harfe, *Foxa1 and foxa2 are required for formation of the intervertebral discs*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55528.
73. Sasaki, H. and B.L. Hogan, *Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo*. Development, 1993. **118**(1): p. 47-59.
74. Dufort, D., et al., *The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis*. Development, 1998. **125**(16): p. 3015-25.
75. Monaghan, A.P., et al., *Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm*. Development, 1993. **119**(3): p. 567-78.
76. Sasaki, H. and B.L. Hogan, *Enhancer analysis of the mouse HNF-3 beta gene: regulatory elements for node/notochord and floor plate are independent and consist of multiple sub-elements*. Genes Cells, 1996. **1**(1): p. 59-72.
77. Sawada, A., et al., *Tead proteins activate the Foxa2 enhancer in the node in cooperation with a second factor*. Development, 2005. **132**(21): p. 4719-29.
78. Weinstein, D.C., et al., *The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo*. Cell, 1994. **78**(4): p. 575-88.

79. Alten, L., et al., *A novel mammal-specific three partite enhancer element regulates node and notochord-specific Noto expression*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47785.
80. Clements, D., et al., *Distinct regulatory control of the Brachyury gene in axial and non-axial mesoderm suggests separation of mesoderm lineages early in mouse gastrulation*. Mech Dev, 1996. **56**(1-2): p. 139-49.
81. Inman, K.E. and K.M. Downs, *Localization of Brachyury (T) in embryonic and extraembryonic tissues during mouse gastrulation*. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(8): p. 783-93.
82. Bueno, D., et al., *Spatial and temporal relationships between Shh, Fgf4, and Fgf8 gene expression at diverse signalling centers during mouse development*. Dev Dyn, 1996. **207**(3): p. 291-9.
83. DiPaola, C.P., et al., *Molecular signaling in intervertebral disk development*. J Orthop Res, 2005. **23**(5): p. 1112-9.
84. Jeong, Y. and D.J. Epstein, *Distinct regulators of Shh transcription in the floor plate and notochord indicate separate origins for these tissues in the mouse node*. Development, 2003. **130**(16): p. 3891-902.
85. Tsukui, T., et al., *Multiple left-right asymmetry defects in Shh(-/-) mutant mice unveil a convergence of the shh and retinoic acid pathways in the control of Lefty-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11376-81.
86. Zhang, X.M., M. Ramalho-Santos, and A.P. McMahon, *Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node*. Cell, 2001. **106**(2): p. 781-92.
87. Alten, L., et al., *Differential regulation of node formation, nodal ciliogenesis and cilia positioning by Noto and Foxj1*. Development, 2012. **139**(7): p. 1276-84.
88. Anderson, R.M., et al., *Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse*. Development, 2002. **129**(21): p. 4975-87.
89. McMahon, J.A., et al., *Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite*. Genes Dev, 1998. **12**(10): p. 1438-52.
90. Stafford, D.A., et al., *Cooperative activity of noggin and gremlin 1 in axial skeleton development*. Development, 2011. **138**(5): p. 1005-14.
91. Plouhinec, J.L., L. Zakin, and E.M. De Robertis, *Systems control of BMP morphogen flow in vertebrate embryos*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(6): p. 696-703.
92. Fowlis, D., et al., *Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo*. Dev Dyn, 1995. **203**(2): p. 241-51.
93. Barrionuevo, F., et al., *Sox9 is required for notochord maintenance in mice*. Dev Biol, 2006. **295**(1): p. 128-40.
94. Gotz, W., et al., *Detection and distribution of the carbohydrate binding protein galectin-3 in human notochord, intervertebral disc and chordoma*. Differentiation, 1997. **62**(3): p. 149-57.
95. Van den Brule, F.A., et al., *Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis*. Dev Dyn, 1997. **209**(4): p. 399-405.
96. Tamplin, O.J., et al., *Microarray analysis of Foxa2 mutant mouse embryos reveals novel gene expression and inductive roles for the gastrula organizer and its derivatives*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 511.
97. Tamplin, O.J., B.J. Cox, and J. Rossant, *Integrated microarray and ChIP analysis identifies multiple Foxa2 dependent target genes in the notochord*. Dev Biol, 2011.
98. Bedore, J., et al., *Loss of notochord-derived CCN2 results in impaired intervertebral disc development and premature disc degeneration*. Arthritis Rheum, 2013.

99. Wederell, E.D., et al., *Global analysis of in vivo Foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(14): p. 4549-64.
100. Lolas, M., et al., *Charting Brachyury-mediated developmental pathways during early mouse embryogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(12): p. 4478-83.
101. Searle, A.G., *Curtailed, a new dominant T-allele in the house mouse*. Genet Res, 1966. **7**(1): p. 86-95.
102. Robb, L., et al., *Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of murine and human homologues of a Xenopus mix gene*. Dev Dyn, 2000. **219**(4): p. 497-504.
103. Wolfe, A.D. and K.M. Downs, *Mixl1 localizes to putative axial stem cell reservoirs and their posterior descendants in the mouse embryo*. Gene Expr Patterns, 2014. **15**(1): p. 8-20.
104. Hart, A.H., et al., *Mixl1 is required for axial mesendoderm morphogenesis and patterning in the murine embryo*. Development, 2002. **129**(15): p. 3597-608.
105. Evans, A.L., et al., *Genomic targets of Brachyury (T) in differentiating mouse embryonic stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33346.
106. Nishizaki, Y., et al., *Identification of essential sequence motifs in the node/notochord enhancer of Foxa2 (Hnf3beta) gene that are conserved across vertebrate species*. Mech Dev, 2001. **102**(1-2): p. 57-66.
107. Sawada, A., et al., *Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3177-89.
108. Perea-Gomez, A., M. Rhinn, and S.L. Ang, *Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo*. Int J Dev Biol, 2001. **45**(1): p. 311-20.
109. Arnold, S.J. and E.J. Robertson, *Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 91-103.
110. Shen, M.M., H. Wang, and P. Leder, *A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation*. Development, 1997. **124**(2): p. 429-42.
111. Yu, L., M.C. Hebert, and Y.E. Zhang, *TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses*. EMBO J, 2002. **21**(14): p. 3749-59.
112. Whitman, M., *Nodal signaling in early vertebrate embryos: themes and variations*. Dev Cell, 2001. **1**(5): p. 605-17.
113. Wu, M.Y. and C.S. Hill, *Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis*. Dev Cell, 2009. **16**(3): p. 329-43.
114. Yeo, C. and M. Whitman, *Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms*. Mol Cell, 2001. **7**(5): p. 949-57.
115. Shen, M.M., *Nodal signaling: developmental roles and regulation*. Development, 2007. **134**(6): p. 1023-34.
116. Gritsman, K., et al., *The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling*. Cell, 1999. **97**(1): p. 121-32.
117. Yamamoto, M., et al., *The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse*. Genes Dev, 2001. **15**(10): p. 1242-56.
118. Kofron, M., et al., *New roles for FoxH1 in patterning the early embryo*. Development, 2004. **131**(20): p. 5065-78.
119. Norris, D.P., et al., *The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo*. Development, 2002. **129**(14): p. 3455-68.

120. Ben-Haim, N., et al., *The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4*. Dev Cell, 2006. **11**(3): p. 313-23.
121. Brennan, J., et al., *Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo*. Nature, 2001. **411**(6840): p. 965-9.
122. Morkel, M., et al., *Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation*. Development, 2003. **130**(25): p. 6283-94.
123. Norris, D.P. and E.J. Robertson, *Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1575-88.
124. Meno, C., et al., *Diffusion of nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor Lefty2*. Dev Cell, 2001. **1**(1): p. 127-38.
125. Beck, S., et al., *Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(12): p. 981-5.
126. Conlon, F.L., et al., *A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse*. Development, 1994. **120**(7): p. 1919-28.
127. Lowe, L.A., S. Yamada, and M.R. Kuehn, *Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo*. Development, 2001. **128**(10): p. 1831-43.
128. Bellgrau, D., et al., *A role for CD95 ligand in preventing graft rejection*. Nature, 1995. **377**(6550): p. 630-2.
129. Pulina, M.V., et al., *A conditional mutant allele for analysis of Mixl1 function in the mouse*. Genesis, 2014. **52**(5): p. 417-23.
130. Hoodless, P.A., et al., *FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse*. Genes Dev, 2001. **15**(10): p. 1257-71.
131. Tremblay, K.D., et al., *Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process*. Development, 2000. **127**(14): p. 3079-90.
132. Vincent, S.D., et al., *Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals*. Genes Dev, 2003. **17**(13): p. 1646-62.
133. Zhou, X., et al., *Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation*. Nature, 1993. **361**(6412): p. 543-7.
134. Hamada, H., et al., *Establishment of vertebrate left-right asymmetry*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(2): p. 103-13.
135. Barrow, J.R., et al., *Wnt3 signaling in the epiblast is required for proper orientation of the anteroposterior axis*. Dev Biol, 2007. **312**(1): p. 312-20.
136. Liu, P., et al., *Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 361-5.
137. Yoon, Y., et al., *Extra-embryonic Wnt3 regulates the establishment of the primitive streak in mice*. Dev Biol, 2015. **403**(1): p. 80-8.
138. Dann, C.E., et al., *Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 86-90.
139. Janda, C.Y., et al., *Structural basis of Wnt recognition by Frizzled*. Science, 2012. **337**(6090): p. 59-64.
140. Li, V.S., et al., *Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1245-56.
141. Zeng, X., et al., *Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions*. Development, 2008. **135**(2): p. 367-75.

142. Bafico, A., et al., *Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(7): p. 683-6.
143. Cheng, Z., et al., *Crystal structures of the extracellular domain of LRP6 and its complex with DKK1*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(11): p. 1204-10.
144. Cruciat, C.M. and C. Niehrs, *Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(3): p. a015081.
145. Jho, E.H., et al., *Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(4): p. 1172-83.
146. Tanaka, S.S., et al., *Impact of WNT signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo*. *Dev Growth Differ*, 2011. **53**(7): p. 843-56.
147. Galceran, J., S.C. Hsu, and R. Grosschedl, *Rescue of a Wnt mutation by an activated form of LEF-1: regulation of maintenance but not initiation of Brachyury expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8668-73.
148. Moser, A.R., et al., *Homozygosity for the Min allele of Apc results in disruption of mouse development prior to gastrulation*. *Dev Dyn*, 1995. **203**(4): p. 422-33.
149. Yamaguchi, T.P., et al., *T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification*. *Genes Dev*, 1999. **13**(24): p. 3185-90.
150. Lickert, H., et al., *Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm*. *Dev Cell*, 2002. **3**(2): p. 171-81.
151. Ishikawa, T.O., et al., *Requirement for tumor suppressor Apc in the morphogenesis of anterior and ventral mouse embryo*. *Dev Biol*, 2003. **253**(2): p. 230-46.
152. Huelsken, J., et al., *Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice*. *J Cell Biol*, 2000. **148**(3): p. 567-78.
153. Korinek, V., et al., *Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(3): p. 1248-56.
154. Merrill, B.J., et al., *Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo*. *Development*, 2004. **131**(2): p. 263-74.
155. Andre, P., et al., *Wnt5a and Wnt11 regulate mammalian anterior-posterior axis elongation*. *Development*, 2015. **142**(8): p. 1516-27.
156. Gao, B., et al., *Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2*. *Dev Cell*, 2011. **20**(2): p. 163-76.
157. Park, M. and R.T. Moon, *The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(1): p. 20-5.
158. Yamaguchi, T.P., et al., *A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo*. *Development*, 1999. **126**(6): p. 1211-23.
159. Tada, M. and C.P. Heisenberg, *Convergent extension: using collective cell migration and cell intercalation to shape embryos*. *Development*, 2012. **139**(21): p. 3897-904.
160. Ukita, K., et al., *Wnt signaling maintains the notochord fate for progenitor cells and supports the posterior extension of the notochord*. *Mech Dev*, 2009. **126**(10): p. 791-803.
161. Bottcher, R.T. and C. Niehrs, *Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development*. *Endocr Rev*, 2005. **26**(1): p. 63-77.
162. Lim, J. and J.P. Thiery, *Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development*. *Development*, 2012. **139**(19): p. 3471-86.
163. Arnold, S.J., et al., *Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse*. *Development*, 2008. **135**(3): p. 501-11.
164. Sugihara, K., et al., *Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation*. *Oncogene*, 1998. **17**(26): p. 3427-33.

165. Zohn, I.E., et al., *p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation*. Cell, 2006. **125**(5): p. 957-69.
166. Zhang, X., et al., *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15694-700.
167. Deng, C.X., et al., *Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization*. Genes Dev, 1994. **8**(24): p. 3045-57.
168. Yamaguchi, T.P., et al., *fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation*. Genes Dev, 1994. **8**(24): p. 3032-44.
169. Ciruna, B. and J. Rossant, *FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak*. Dev Cell, 2001. **1**(1): p. 37-49.
170. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
171. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
172. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
173. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
174. Crossley, P.H. and G.R. Martin, *The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo*. Development, 1995. **121**(2): p. 439-51.
175. Sun, X., et al., *Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo*. Genes Dev, 1999. **13**(14): p. 1834-46.
176. Partanen, J., L. Schwartz, and J. Rossant, *Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2332-44.
177. Wahl, M.B., et al., *FGF signaling acts upstream of the NOTCH and WNT signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis*. Development, 2007. **134**(22): p. 4033-41.
178. Xu, J., et al., *Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17*. Mech Dev, 1999. **83**(1-2): p. 165-78.
179. Naiche, L.A., N. Holder, and M. Lewandoski, *FGF4 and FGF8 comprise the wavefront activity that controls somitogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(10): p. 4018-23.
180. Arenkiel, B.R., G.O. Gaufo, and M.R. Capecchi, *Hoxb1 neural crest preferentially form glia of the PNS*. Dev Dyn, 2003. **227**(3): p. 379-86.
181. Boulet, A.M. and M.R. Capecchi, *Signaling by FGF4 and FGF8 is required for axial elongation of the mouse embryo*. Dev Biol, 2012. **371**(2): p. 235-45.
182. Walsh, D.W., et al., *Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(5): p. 244-56.
183. Javier, A.L., et al., *Bmp indicator mice reveal dynamic regulation of transcriptional response*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e42566.
184. Kishigami, S. and Y. Mishina, *BMP signaling and early embryonic patterning*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(3): p. 265-78.
185. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
186. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.

187. Lawson, K.A., et al., *Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo*. Genes Dev, 1999. **13**(4): p. 424-36.
188. Fujiwara, T., N.R. Dunn, and B.L. Hogan, *Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13739-44.
189. Winnier, G., et al., *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. Genes Dev, 1995. **9**(17): p. 2105-16.
190. Fujiwara, T., et al., *Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse*. Development, 2002. **129**(20): p. 4685-96.
191. Lewandoski, M., E.N. Meyers, and G.R. Martin, *Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1997. **62**: p. 159-68.
192. Mine, N., R.M. Anderson, and J. Klingensmith, *BMP antagonism is required in both the node and lateral plate mesoderm for mammalian left-right axis establishment*. Development, 2008. **135**(14): p. 2425-34.
193. Philipp, M. and M.G. Caron, *Hedgehog signaling: is Smo a G protein-coupled receptor?* Curr Biol, 2009. **19**(3): p. R125-7.
194. Briscoe, J. and P.P. Therond, *The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(7): p. 416-29.
195. Chiang, C., et al., *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 407-13.
196. Gaunt, S.J., et al., *Evidence that Hoxa expression domains are evolutionarily transposed in spinal ganglia, and are established by forward spreading in paraxial mesoderm*. Mech Dev, 1999. **82**(1-2): p. 109-18.
197. Parker, M.H., P. Seale, and M.A. Rudnicki, *Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(7): p. 497-507.
198. Buttitta, L., et al., *Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction*. Development, 2003. **130**(25): p. 6233-43.
199. Fan, C.M. and M. Tessier-Lavigne, *Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1175-86.
200. Murtaugh, L.C., J.H. Chyung, and A.B. Lassar, *Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling*. Genes Dev, 1999. **13**(2): p. 225-37.
201. Zeng, L., et al., *Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis*. Genes Dev, 2002. **16**(15): p. 1990-2005.
202. Jukkola, T., et al., *Meox1Cre: a mouse line expressing Cre recombinase in somitic mesoderm*. Genesis, 2005. **43**(3): p. 148-53.
203. Mankoo, B.S., et al., *The concerted action of Meox homeobox genes is required upstream of genetic pathways essential for the formation, patterning and differentiation of somites*. Development, 2003. **130**(19): p. 4655-64.
204. I.M., S. and R. M.V., *The intervertebral disc molecular and structural studies of the disc in health and disease*. 2014.
205. 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.
206. Peacock, A., *Observations on the prenatal development of the intervertebral disc in man*. J Anat, 1951. **85**(3): p. 260-74.

207. Takahashi, Y., et al., *Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somites in the mouse embryo*. Dev Biol, 2013. **380**(2): p. 172-84.
208. Durbin, L., et al., *Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites*. Genes Dev, 1998. **12**(19): p. 3096-109.
209. Domyan, E.T., et al., *Roundabout receptors are critical for foregut separation from the body wall*. Dev Cell, 2013. **24**(1): p. 52-63.
210. Lawson, L. and B.D. Harfe, *Notochord to Nucleus Pulposus Transition*. Curr Osteoporos Rep, 2015. **13**(5): p. 336-41.
211. Alman, B.A., *The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(9): p. 552-60.
212. Rodrigo, I., et al., *Meox homeodomain proteins are required for Bapx1 expression in the sclerotome and activate its transcription by direct binding to its promoter*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2757-66.
213. Tribioli, C. and T. Lufkin, *The murine Bapx1 homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen*. Development, 1999. **126**(24): p. 5699-711.
214. Akazawa, H., et al., *Targeted disruption of the homeobox transcription factor Bapx1 results in lethal skeletal dysplasia with asplenia and gastroduodenal malformation*. Genes Cells, 2000. **5**(6): p. 499-513.
215. Aszodi, A., et al., *Mouse models for extracellular matrix diseases*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(3-4): p. 238-52.
216. Furumoto, T.A., et al., *Notochord-dependent expression of MFH1 and PAX1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral column development*. Dev Biol, 1999. **210**(1): p. 15-29.
217. Hayes, A.J., et al., *Collagen fibrillogenesis in the development of the annulus fibrosus of the intervertebral disc*. Eur Cell Mater, 2011. **22**: p. 226-41.
218. Peters, H., et al., *Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development*. Development, 1999. **126**(23): p. 5399-408.
219. Baffi, M.O., M.A. Moran, and R. Serra, *Tgfbr2 regulates the maintenance of boundaries in the axial skeleton*. Dev Biol, 2006. **296**(2): p. 363-74.
220. Baffi, M.O., et al., *Conditional deletion of the TGF-beta type II receptor in Col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones*. Dev Biol, 2004. **276**(1): p. 124-42.
221. Sohn, P., et al., *Molecular profiling of the developing mouse axial skeleton: a role for Tgfbr2 in the development of the intervertebral disc*. BMC Dev Biol, 2010. **10**: p. 29.
222. 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.
223. Pankov, R. and K.M. Yamada, *Fibronectin at a glance*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 20): p. 3861-3.
224. Hayes, A.J., M. Benjamin, and J.R. Ralphs, *Role of actin stress fibres in the development of the intervertebral disc: cytoskeletal control of extracellular matrix assembly*. Dev Dyn, 1999. **215**(3): p. 179-89.
225. Zheng, Z., et al., *Delayed wound closure in fibromodulin-deficient mice is associated with increased TGF-beta3 signaling*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(3): p. 769-78.
226. Svensson, L., et al., *Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9636-47.

227. Hildebrand, A., et al., *Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta*. *Biochem J*, 1994. **302 (Pt 2)**: p. 527-34.
228. Maier, J.A., Y. Lo, and B.D. Harfe, *Foxa1 and Foxa2 are required for formation of the intervertebral discs*. *PLoS One*, 2014. **8(1)**: p. e55528.
229. Uetzmann, L., I. Burtscher, and H. Lickert, *A mouse line expressing Foxa2-driven Cre recombinase in node, notochord, floorplate, and endoderm*. *Genesis*, 2008. **46(10)**: p. 515-22.
230. Zhu, Y., A. McAlinden, and L.J. Sandell, *Type IIA procollagen in development of the human intervertebral disc: regulated expression of the NH(2)-propeptide by enzymic processing reveals a unique developmental pathway*. *Dev Dyn*, 2001. **220(4)**: p. 350-62.
231. Cameron, T.L., et al., *Global comparative transcriptome analysis of cartilage formation in vivo*. *BMC Dev Biol*, 2009. **9**: p. 20.
232. Liu, C.F. and V. Lefebvre, *The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drive chondrogenesis*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43(17)**: p. 8183-203.
233. Ejeskar, A. and S. Holm, *Oxygen tension measurements in the intervertebral disc. A methodological and experimental study*. *Ups J Med Sci*, 1979. **84(1)**: p. 83-93.
234. Gruber, H.E., et al., *Vertebral endplate architecture and vascularization: application of micro-computerized tomography, a vascular tracer, and immunocytochemistry in analyses of disc degeneration in the aging sand rat*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005. **30(23)**: p. 2593-600.
235. Falchuk, K.H., E.J. Goetzl, and J.P. Kulka, *Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis*. *Am J Med*, 1970. **49(2)**: p. 223-31.
236. Treuhaft, P.S. and M.C. DJ, *Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases*. *Arthritis Rheum*, 1971. **14(4)**: p. 475-84.
237. Fisher, A.B. and C. Dodia, *Lung as a model for evaluation of critical intracellular PO₂ and PCO₂*. *Am J Physiol*, 1981. **241(1)**: p. E47-50.
238. Chen, J.W., et al., *Significance of hypoxia in the physiological function of intervertebral disc cells*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2014. **24(3)**: p. 193-204.
239. Fujita, N., et al., *HIF-1alpha and HIF-2alpha degradation is differentially regulated in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc*. *J Bone Miner Res*, 2011.
240. Rajpurohit, R., et al., *Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2*. *Cell and Tissue Research*, 2002. **308(3)**: p. 401-407.
241. Ashton, I.K., et al., *Neuropeptides in the human intervertebral disc*. *J Orthop Res*, 1994. **12(2)**: p. 186-92.
242. Purmessur, D., A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Expression and regulation of neurotrophins in the nondegenerate and degenerate human intervertebral disc*. *Arthritis Res Ther*, 2008. **10(4)**: p. R99.
243. Sakai, D. and G.B. Andersson, *Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions*. *Nat Rev Rheumatol*, 2015. **11(4)**: p. 243-56.
244. Moore, R.J., et al., *Remodeling of vertebral bone after outer anular injury in sheep*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1996. **21(8)**: p. 936-40.
245. Moore, R.J., *The vertebral endplate: disc degeneration, disc regeneration*. *Eur Spine J*, 2006. **15 Suppl 3**: p. S333-7.
246. Urban, J.P., S. Holm, and A. Maroudas, *Diffusion of small solutes into the intervertebral disc: as in vivo study*. *Biorheology*, 1978. **15(3-4)**: p. 203-21.

247. Urban, J.P., et al., *Nutrition of the intervertebral disk. An in vivo study of solute transport.* Clin Orthop Relat Res, 1977(129): p. 101-14.
248. Antoniou, J., 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.
249. Marchand, F. and A.M. Ahmed, *Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus.* Spine (Phila Pa 1976), 1990. **15**(5): p. 402-10.
250. Dahia, C.L., E. Mahoney, and C. Wylie, *Shh signaling from the nucleus pulposus is required for the postnatal growth and differentiation of the mouse intervertebral disc.* PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35944.
251. Somerville, J.M., et al., *Growth of C57BL/6 mice and the material and mechanical properties of cortical bone from the tibia.* Calcif Tissue Int, 2004. **74**(5): p. 469-75.
252. Dahia, C.L., et al., *Intercellular signaling pathways active during intervertebral disc growth, differentiation, and aging.* Spine (Phila Pa 1976), 2009. **34**(5): p. 456-62.
253. Hayes, A.J. and J.R. Ralphs, *The response of foetal annulus fibrosus cells to growth factors: modulation of matrix synthesis by TGF-beta1 and IGF-1.* Histochem Cell Biol, 2011. **136**(2): p. 163-75.
254. Hickey, D.S. and D.W. Hukins, *X-ray diffraction studies of the arrangement of collagenous fibres in human fetal intervertebral disc.* J Anat, 1980. **131**(Pt 1): p. 81-90.
255. Meakin, J.R. and D.W. Hukins, *Effect of removing the nucleus pulposus on the deformation of the annulus fibrosus during compression of the intervertebral disc.* J Biomech, 2000. **33**(5): p. 575-80.
256. Hickey, D.S. and D.W. Hukins, *Relation between the structure of the annulus fibrosus and the function and failure of the intervertebral disc.* Spine (Phila Pa 1976), 1980. **5**(2): p. 106-16.
257. Oka, K., et al., *TGF-beta mediated Dlx5 signaling plays a crucial role in osteochondroprogenitor cell lineage determination during mandible development.* Dev Biol, 2008. **321**(2): p. 303-9.
258. Park, J., et al., *Regulation of Sox9 by Sonic Hedgehog (Shh) is essential for patterning and formation of tracheal cartilage.* Dev Dyn, 2010. **239**(2): p. 514-26.
259. Haschtmann, D., S.J. Ferguson, and J.V. Stoyanov, *BMP-2 and TGF-beta3 do not prevent spontaneous degeneration in rabbit disc explants but induce ossification of the annulus fibrosus.* Eur Spine J, 2012. **21**(9): p. 1724-33.
260. Kondo, N., et al., *Intervertebral disc development is regulated by Wnt/beta-catenin signaling.* Spine (Phila Pa 1976), 2011. **36**(8): p. E513-8.
261. 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.
262. Vujovic, S., et al., *Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas.* J Pathol, 2006. **209**(2): p. 157-65.
263. Sakai, D., et al., *Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc.* Nat Commun, 2012. **3**: p. 1264.
264. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche.* Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
265. Fujita, N., et al., *CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(4): p. 1890-6.
266. Martinez, C., et al., *Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs.* Blood, 2007. **109**(10): p. 4245-8.

267. Quintin, A., et al., *Isolation and in vitro chondrogenic potential of human foetal spine cells*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8B): p. 2559-69.
268. 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.
269. Erwin, W.M., et al., *Intervertebral disc-derived stem cells: implications for regenerative medicine and neural repair*. Spine (Phila Pa 1976), 2013. **38**(3): p. 211-6.
270. Purmessur, D., et al., *Dynamic pressurization induces transition of notochordal cells to a mature phenotype while retaining production of important patterning ligands from development*. Arthritis Res Ther, 2013. **15**(5): p. R122.
271. Tran, C.M., et al., *Transforming growth factor beta controls CCN3 expression in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(10): p. 3022-31.
272. Gao, R. and D.R. Brigstock, *Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparin-dependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells*. Hepatol Res, 2003. **27**(3): p. 214-220.
273. Gao, R. and D.R. Brigstock, *Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8848-55.
274. Gao, R. and D.R. Brigstock, *A novel integrin alpha5beta1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells*. Gut, 2006. **55**(6): p. 856-62.
275. Heng, E.C., et al., *CCN2, connective tissue growth factor, stimulates collagen deposition by gingival fibroblasts via module 3 and alpha6- and beta1 integrins*. J Cell Biochem, 2006. **98**(2): p. 409-20.
276. Hoshijima, M., et al., *CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin alpha5beta1*. FEBS Lett, 2006. **580**(5): p. 1376-82.
277. Abreu, J.G., et al., *Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 599-604.
278. Maeda, A., et al., *CCN family 2/connective tissue growth factor modulates BMP signalling as a signal conductor, which action regulates the proliferation and differentiation of chondrocytes*. J Biochem, 2009. **145**(2): p. 207-16.
279. Maeda, S., *An impact of CCN2-BMP-2 complex upon chondrocyte biology: evoking a signalling pathway bypasses ERK and Smads?* J Biochem, 2011. **150**(3): p. 219-21.
280. Kawata, K., et al., *Possible role of LRP1, a CCN2 receptor, in chondrocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(2): p. 552-9.
281. Kawata, K., et al., *Role of LRP1 in transport of CCN2 protein in chondrocytes*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 12): p. 2965-72.
282. Winkler, T., et al., *Wnt signaling activates Shh signaling in early postnatal intervertebral discs, and re-activates Shh signaling in old discs in the mouse*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98444.
283. Cole, T.C., et al., *The proteoglycans of the canine intervertebral disc*. Biochim Biophys Acta, 1985. **839**(2): p. 127-38.
284. Oegema, T.R., Jr., et al., *Comparison of the biochemistry of proteoglycans isolated from normal, idiopathic scoliotic and cerebral palsy spines*. Spine (Phila Pa 1976), 1983. **8**(4): p. 378-84.
285. Urban, J. and A. Maroudas, *The chemistry of the intervertebral disc in relation to its physiological function*. Clin Rheum Dis, 1980. **6**: p. 51-76.

286. Ameye, L. and M.F. Young, *Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases*. *Glycobiology*, 2002. **12**(9): p. 107R-16R.
287. 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.
288. Kempson, G.E., et al., *The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans*. *Biochim Biophys Acta*, 1973. **297**(2): p. 456-72.
289. Li, X., et al., *Collagen and proteoglycan abnormalities in the GDF-5-deficient mice and molecular changes when treating disk cells with recombinant growth factor*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004. **29**(20): p. 2229-34.
290. Matsunaga, S., et al., *Age-related changes in expression of transforming growth factor-beta and receptors in cells of intervertebral discs*. *J Neurosurg*, 2003. **98**(1 Suppl): p. 63-7.
291. Murakami, H., et al., *The expression of anabolic cytokines in intervertebral discs in age-related degeneration*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006. **31**(16): p. 1770-4.
292. Risbud, M.V., E. Schipani, and I.M. Shapiro, *Hypoxic regulation of nucleus pulposus cell survival: from niche to notch*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(4): p. 1577-83.
293. Maier, J.A. and B.D. Harfe, *Nuclei pulposi formation from the embryonic notochord occurs normally in GDF5-deficient mice*. *Spine*, 2011.
294. Adams, M.A. and P.J. Roughley, *What is intervertebral disc degeneration, and what causes it?* *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006. **31**(18): p. 2151-61.
295. Mayer, J.E., et al., *Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration*. *Spine J*, 2013. **13**(3): p. 299-317.
296. Ain, D.L., et al., *The association between peripheral artery and lumbar spine disease: a single-center study*. *Am J Med*, 2012. **125**(4): p. 411-5.
297. Kauppila, L.I., *Atherosclerosis and disc degeneration/low-back pain--a systematic review*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009. **37**(6): p. 661-70.
298. Arndt, J., et al., *Bacteriology of degenerated lumbar intervertebral disks*. *J Spinal Disord Tech*, 2012. **25**(7): p. E211-6.
299. Ganko, R., et al., *Can bacterial infection by low virulent organisms be a plausible cause for symptomatic disc degeneration? A systematic review*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2015. **40**(10): p. E587-92.
300. Clouet, J., et al., *The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering*. *Joint Bone Spine*, 2009. **76**(6): p. 614-8.
301. Johnson, Z.I., et al., *Disc in flames: Roles of TNF-alpha and IL-1beta in intervertebral disc degeneration*. *Eur Cell Mater*, 2015. **30**: p. 104-16; discussion 116-7.
302. Kepler, C.K., et al., *The molecular basis of intervertebral disc degeneration*. *Spine J*, 2013. **13**(3): p. 318-30.
303. Molinos, M., et al., *Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration*. *J R Soc Interface*, 2015. **12**(104): p. 20141191.
304. Risbud, M.V. and I.M. Shapiro, *Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content*. *Nat Rev Rheumatol*, 2014. **10**(1): p. 44-56.
305. Vo, N.V., et al., *Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration*. *Spine J*, 2013. **13**(3): p. 331-41.
306. Wang, Y.X. and J.F. Griffith, *Effect of menopause on lumbar disk degeneration: potential etiology*. *Radiology*, 2010. **257**(2): p. 318-20.
307. Wang, Y.-X.J. and J.F. Griffith, *Menopause causes vertebral endplate degeneration and decrease in nutrient diffusion to the intervertebral discs*. *Medical Hypotheses*, 2011.

308. Huang, Y.C., J.P. Urban, and K.D. Luk, *Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way?* Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(9): p. 561-6.
309. Merceron, C., et al., *Loss of HIF-1alpha in the notochord results in cell death and complete disappearance of the nucleus pulposus.* PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110768.
310. Erwin, W.M., et al., *The biological basis of degenerative disc disease: proteomic and biomechanical analysis of the canine intervertebral disc.* Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 240.
311. Vergroesen, P.P., et al., *Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle.* Osteoarthritis Cartilage, 2015. **23**(7): p. 1057-70.
312. Yee, A., et al., *Fibrotic-like changes in degenerate human intervertebral discs revealed by quantitative proteomic analysis.* Osteoarthritis Cartilage, 2015.
313. Pockert, A.J., 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.
314. Arpino, V., M. Brock, and S.E. Gill, *The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis.* Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 247-54.
315. Cornejo, M.C., et al., *Soluble factors from the notochordal-rich intervertebral disc inhibit endothelial cell invasion and vessel formation in the presence and absence of pro-inflammatory cytokines.* Osteoarthritis Cartilage, 2015. **23**(3): p. 487-96.
316. Purmessur, D., et al., *Intact glycosaminoglycans from intervertebral disc-derived notochordal cell-conditioned media inhibit neurite growth while maintaining neuronal cell viability.* Spine J, 2015. **15**(5): p. 1060-9.
317. Burke, J.G., et al., *Spontaneous production of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 by the human lumbar intervertebral disc.* Spine (Phila Pa 1976), 2002. **27**(13): p. 1402-7.
318. Le Maitre, C.L., A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *A preliminary in vitro study into the use of IL-1Ra gene therapy for the inhibition of intervertebral disc degeneration.* Int J Exp Pathol, 2006. **87**(1): p. 17-28.
319. Moon, H.J., et al., *Effects of secreted factors in culture medium of annulus fibrosus cells on microvascular endothelial cells: elucidating the possible pathomechanisms of matrix degradation and nerve in-growth in disc degeneration.* Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**(2): p. 344-54.
320. Ohba, T., 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.
321. Kim, J.H., et al., *Rabbit notochordal cells modulate the expression of inflammatory mediators by human annulus fibrosus cells cocultured with activated macrophage-like THP-1 cells.* Spine (Phila Pa 1976), 2012. **37**(22): p. 1856-64.
322. Nishida, T., et al., *Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor).* J Bone Miner Res, 2004. **19**(8): p. 1308-19.
323. Abbott, R.D., et al., *Degenerative grade affects the responses of human nucleus pulposus cells to link-N, CTGF, and TGFbeta3.* J Spinal Disord Tech, 2013. **26**(3): p. E86-94.
324. Lee, S., et al., *Comparison of growth factor and cytokine expression in patients with degenerated disc disease and herniated nucleus pulposus.* Clin Biochem, 2009. **42**(15): p. 1504-11.
325. Peng, B., et al., *Expression and role of connective tissue growth factor in painful disc fibrosis and degeneration.* Spine (Phila Pa 1976), 2009. **34**(5): p. E178-82.
326. Brigstock, D.R., *Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals.* J Cell Commun Signal, 2010. **4**(1): p. 1-4.

327. Mason, R.M., *Connective tissue growth factor(CCN2), a pathogenic factor in diabetic nephropathy. What does it do? How does it do it?* J Cell Commun Signal, 2009. **3**(2): p. 95-104.
328. Tian, Y., et al., *TGFbeta regulates Galectin-3 expression through canonical Smad3 signaling pathway in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration.* Matrix Biol, 2015.
329. Wang, X., et al., *Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-dependent matrix metalloproteinase-3 expression in nucleus pulposus cells requires cooperative signaling via syndecan 4 and mitogen-activated protein kinase-NF-kappaB axis: implications in inflammatory disc disease.* Am J Pathol, 2014. **184**(9): p. 2560-72.
330. Cully, M., *Degenerative disc disease: Altered Wnt signalling in intervertebral disc degeneration.* Nat Rev Rheumatol, 2013. **9**(3): p. 136.
331. Erwin, M., *Canonical Wnt signaling and caveolae play a role in intervertebral disc degeneration; the continuing saga of the mysterious notochordal cell.* Arthritis Res Ther, 2013. **15**(2): p. 113.
332. Smolders, L.A., et al., *Gene expression profiling of early intervertebral disc degeneration reveals a down-regulation of canonical Wnt signaling and caveolin-1 expression: implications for development of regenerative strategies.* Arthritis Res Ther, 2013. **15**(1): p. R23.
333. Wang, M., et al., *Conditional activation of beta-catenin signaling in mice leads to severe defects in intervertebral disc tissue.* Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2611-23.
334. Takae, R., et al., *Immunolocalization of bone morphogenetic protein and its receptors in degeneration of intervertebral disc.* Spine (Phila Pa 1976), 1999. **24**(14): p. 1397-401.
335. Than, K.D., et al., *Bone morphogenetic proteins and degenerative disk disease.* Neurosurgery, 2012. **70**(4): p. 996-1002; discussion 1002.
336. Kim, J.S., et al., *Insulin-like growth factor 1 synergizes with bone morphogenetic protein 7-mediated anabolism in bovine intervertebral disc cells.* Arthritis Rheum, 2010. **62**(12): p. 3706-15.
337. Peeters, M., et al., *BMP-2 and BMP-2/7 Heterodimers Conjugated to a Fibrin/Hyaluronic Acid Hydrogel in a Large Animal Model of Mild Intervertebral Disc Degeneration.* Biores Open Access, 2015. **4**(1): p. 398-406.
338. Ren, X.F., et al., *Adeno-associated virus-mediated BMP-7 and SOX9 in vitro co-transfection of human degenerative intervertebral disc cells.* Genet Mol Res, 2015. **14**(2): p. 3736-44.
339. Wang, Z., W.C. Hutton, and S.T. Yoon, *Bone morphogenetic protein-7 antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced activation of nuclear factor kappaB and up-regulation of the ADAMTS, leading to decreased degradation of disc matrix macromolecules aggrecan and collagen II.* Spine J, 2014. **14**(3): p. 505-12.
340. Wang, Z., et al., *Link protein N-terminal peptide binds to bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor and drives matrix protein expression in rabbit intervertebral disc cells.* J Biol Chem, 2013. **288**(39): p. 28243-53.
341. Le Maitre, C.L., J.A. Hoyland, and A.J. Freemont, *Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1beta and TNFalpha expression profile.* Arthritis Res Ther, 2007. **9**(4): p. R77.
342. Feng, C., et al., *Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc.* Cell Physiol Biochem, 2015. **35**(1): p. 1-16.

343. Le Maitre, C.L., A.J. Freemont, and J.A. Hoyland, *Expression of cartilage-derived morphogenetic protein in human intervertebral discs and its effect on matrix synthesis in degenerate human nucleus pulposus cells*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(5): p. R137.
344. Gruber, H.E., et al., *Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) in the human intervertebral annulus cells and its modulation by IL-1ss and TNF-alpha in vitro*. *Exp Mol Pathol*, 2014. **96**(2): p. 225-9.
345. Aigner, T., et al., *Variation with age in the pattern of type X collagen expression in normal and scoliotic human intervertebral discs*. *Calcif Tissue Int*, 1998. **63**(3): p. 263-8.
346. Paietta, R.C., E.L. Burger, and V.L. Ferguson, *Mineralization and collagen orientation throughout aging at the vertebral endplate in the human lumbar spine*. *J Struct Biol*, 2013. **184**(2): p. 310-20.
347. Sahlman, J., 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. 2558-2565.
348. Benneker, L.M., et al., *2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005. **30**(2): p. 167-73.
349. Hee, H.T., et al., *Vascularization and morphological changes of the endplate after axial compression and distraction of the intervertebral disc*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011. **36**(7): p. 505-11.
350. Rodriguez, A.G., et al., *Morphology of the human vertebral endplate*. *J Orthop Res*, 2012. **30**(2): p. 280-7.
351. Neidlinger-Wilke, C., et al., *Molecular interactions between human cartilaginous endplates and nucleus pulposus cells: a preliminary investigation*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2014. **39**(17): p. 1355-64.
352. Leung, V.Y., et al., *Matrix remodeling during intervertebral disc growth and degeneration detected by multichromatic FAST staining*. *J Histochem Cytochem*, 2009. **57**(3): p. 249-56.
353. Rannou, F., 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.
354. Coppes, M.H., et al., *Innervation of "painful" lumbar discs*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1997. **22**(20): p. 2342-9; discussion 2349-50.
355. Freemont, A.J., et al., *Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc*. *J Pathol*, 2002. **197**(3): p. 286-92.
356. Gigante, A., et al., *Expression of NGF, Trka and p75 in human cartilage*. *Eur J Histochem*, 2003. **47**(4): p. 339-44.
357. Gruber, H.E., et al., *Genome-wide analysis of pain-, nerve- and neurotrophin -related gene expression in the degenerating human annulus*. *Mol Pain*, 2012. **8**: p. 63.
358. Kazezian, Z., et al., *Gene Expression Profiling Identifies Interferon Signalling Molecules and IGFBP3 in Human Degenerative Annulus Fibrosus*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 15662.
359. Feng, G., et al., *Multipotential differentiation of human anulus fibrosus cells: an in vitro study*. *J Bone Joint Surg Am*, 2010. **92**(3): p. 675-85.
360. Jin, L., et al., *Annulus fibrosus cell characteristics are a potential source of intervertebral disc pathogenesis*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e96519.
361. Clausen, T., et al., *HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(3): p. 152-62.

362. Scott, F.L., et al., *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 1019-22.
363. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
364. Bachmeier, B.E., et al., *Analysis of tissue distribution of TNF-alpha, TNF-alpha-receptors, and the activating TNF-alpha-converting enzyme suggests activation of the TNF-alpha system in the aging intervertebral disc*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1096**: p. 44-54.
365. Hall-Glenn, F., et al., *CCN2/CTGF is required for matrix organization and to protect growth plate chondrocytes from cellular stress*. J Cell Commun Signal, 2013.
366. Han, D., et al., *Double role of Fas ligand in the apoptosis of intervertebral disc cells in vitro*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(11): p. 938-47.
367. Inui, Y., et al., *Fas-ligand expression on nucleus pulposus begins in developing embryo*. Spine (Phila Pa 1976), 2004. **29**(21): p. 2365-9.
368. Takada, T., et al., *Fas ligand exists on intervertebral disc cells: a potential molecular mechanism for immune privilege of the disc*. Spine (Phila Pa 1976), 2002. **27**(14): p. 1526-30.
369. Wang, H., et al., *Role of death receptor, mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in different stages of degenerative human lumbar disc*. Apoptosis, 2011. **16**(10): p. 990-1003.
370. Wang, J., 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.
371. Zhao, C.Q., L.S. Jiang, and L.Y. Dai, *Programmed cell death in intervertebral disc degeneration*. Apoptosis, 2006. **11**(12): p. 2079-88.
372. Zhao, C.Q., et al., *The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration*. Ageing Res Rev, 2007. **6**(3): p. 247-61.
373. Dierick, J.F., et al., *Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 1011-7.
374. Tchkonina, T., et al., *Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 966-72.
375. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*. Embo J, 2003. **22**(16): p. 4212-22.
376. Dimozi, A., et al., *Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells*. Eur Cell Mater, 2015. **30**: p. 89-102; discussion 103.
377. Gruber, H.E., et al., *Increased cell senescence is associated with decreased cell proliferation in vivo in the degenerating human annulus*. Spine J, 2009. **9**(3): p. 210-5.
378. Kim, K.W., et al., *Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs*. Spine J, 2009. **9**(8): p. 658-66.
379. Park, J.B., C.H. Byun, and E.Y. Park, *Rat Notochordal Cells Undergo Premature Stress-Induced Senescence by High Glucose*. Asian Spine J, 2015. **9**(4): p. 495-502.
380. Park, J.S., et al., *Accelerated premature stress-induced senescence of young annulus fibrosus cells of rats by high glucose-induced oxidative stress*. Int Orthop, 2014. **38**(6): p. 1311-20.
381. Freund, A., et al., *Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences*. Trends Mol Med, 2010. **16**(5): p. 238-46.
382. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. Cell, 2005. **120**(4): p. 513-22.

383. Campisi, J., et al., *Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease?* Semin Cancer Biol, 2011. **21**(6): p. 354-9.
384. Lotz, M.K. and B. Carames, *Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA.* Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(10): p. 579-87.
385. Gruber, H.E., et al., *Autophagy in the Degenerating Human Intervertebral Disc: In Vivo Molecular and Morphological Evidence, and Induction of Autophagy in Cultured Annulus Cells Exposed to Proinflammatory Cytokines-Implications for Disc Degeneration.* Spine (Phila Pa 1976), 2015. **40**(11): p. 773-82.
386. Jiang, L., et al., *Apoptosis, senescence, and autophagy in rat nucleus pulposus cells: Implications for diabetic intervertebral disc degeneration.* J Orthop Res, 2013. **31**(5): p. 692-702.
387. Jiang, W., et al., *SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells.* Sci Rep, 2014. **4**: p. 7456.
388. Ma, K.G., et al., *Autophagy is activated in compression-induced cell degeneration and is mediated by reactive oxygen species in nucleus pulposus cells exposed to compression.* Osteoarthritis Cartilage, 2013. **21**(12): p. 2030-8.
389. Miyazaki, S., et al., *Recombinant human SIRT1 protects against nutrient deprivation-induced mitochondrial apoptosis through autophagy induction in human intervertebral disc nucleus pulposus cells.* Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 253.
390. Park, E.Y. and J.B. Park, *High glucose-induced oxidative stress promotes autophagy through mitochondrial damage in rat notochordal cells.* Int Orthop, 2013. **37**(12): p. 2507-14.
391. Xu, H., et al., *The evidence and the possible significance of autophagy in degeneration model of human cervical end-plate cartilage.* Exp Ther Med, 2014. **7**(3): p. 537-542.
392. Xu, H.G., et al., *Autophagy protects end plate chondrocytes from intermittent cyclic mechanical tension induced calcification.* Bone, 2014. **66**: p. 232-9.
393. Xu, K., et al., *Autophagy attenuates the catabolic effect during inflammatory conditions in nucleus pulposus cells, as sustained by NF-kappaB and JNK inhibition.* Int J Mol Med, 2015. **36**(3): p. 661-8.
394. Ye, W., et al., *Age-related increases of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in rat nucleus pulposus.* Connect Tissue Res, 2011. **52**(6): p. 472-8.
395. Ye, W., et al., *Increased Macroautophagy in the Pathological Process of Intervertebral Disc Degeneration in Rats.* Connect Tissue Res, 2012.
396. Mason, C. and P. Dunnill, *A brief definition of regenerative medicine.* Regen Med, 2008. **3**(1): p. 1-5.
397. Buckwalter, J.A., *Aging and degeneration of the human intervertebral disc.* Spine (Phila Pa 1976), 1995. **20**(11): p. 1307-14.
398. Bibby, S.R.S. and J.P.G. Urban, *Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells.* European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2004. **13**(8): p. 695-701.
399. Grunhagen, T., et al., *Intervertebral disk nutrition: a review of factors influencing concentrations of nutrients and metabolites.* Orthop Clin North Am, 2011. **42**(4): p. 465-77.
400. Grunhagen, T., et al., *Nutrient supply and intervertebral disc metabolism.* J Bone Joint Surg Am, 2006. **88 Suppl 2**: p. 30-5.
401. Tomaszewski, K.A., et al., *The biology behind the human intervertebral disc and its endplates.* Folia Morphol (Warsz), 2015. **74**(2): p. 157-68.

402. Guo, Q., et al., *Gene expression modulation in TGF-beta3-mediated rabbit bone marrow stem cells using electrospun scaffolds of various stiffness*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(7): p. 1582-92.
403. Pirvu, T., et al., *A combined biomaterial and cellular approach for annulus fibrosus rupture repair*. Biomaterials, 2015. **42**: p. 11-9.
404. Sharifi, S., et al., *Treatment of the degenerated intervertebral disc; closure, repair and regeneration of the annulus fibrosus*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(10): p. 1120-32.
405. Priyadarshani, P., Y. Li, and L. Yao, *Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration*. Osteoarthritis Cartilage, 2015.
406. Wu, J., et al., *Prolonged expansion of human nucleus pulposus cells expressing human telomerase reverse transcriptase mediated by lentiviral vector*. J Orthop Res, 2014. **32**(1): p. 159-66.
407. Wu, J., et al., *Extending the activities of human nucleus pulposus cells with recombinant adeno-associated virus vector-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transfer*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(19-20): p. 2407-15.
408. Wallach, C.J., et al., *Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs*. Spine (Phila Pa 1976), 2003. **28**(20): p. 2331-7.
409. Chaofeng, W., et al., *Nucleus pulposus cells expressing hBMP7 can prevent the degeneration of allogenic IVD in a canine transplantation model*. J Orthop Res, 2013. **31**(9): p. 1366-73.
410. Moon, S.H., et al., *Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail*. Spine (Phila Pa 1976), 2008. **33**(17): p. 1850-5.
411. Ren, S., et al., *Treatment of rabbit intervertebral disc degeneration with co-transfection by adeno-associated virus-mediated SOX9 and osteogenic protein-1 double genes in vivo*. Int J Mol Med, 2013. **32**(5): p. 1063-8.
412. Nishida, K., 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 (Phila Pa 1976), 1999. **24**(23): p. 2419-25.
413. Zhan, Z., 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.
414. Leckie, S.K., et al., *Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model*. Spine J, 2012. **12**(1): p. 7-20.
415. Mali, S., *Delivery systems for gene therapy*. Indian J Hum Genet, 2013. **19**(1): p. 3-8.
416. Yin, H., et al., *Non-viral vectors for gene-based therapy*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(8): p. 541-55.
417. Meisel, H.J., et al., *Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome*. European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2006. **15 Suppl 3**: p. S397-405-S397-405.
418. Meisel, H.J.r., et al., *Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc*. Biomolecular Engineering, 2007. **24**(1): p. 5-21.
419. Coric, D., et al., *Prospective study of disc repair with allogeneic chondrocytes presented at the 2012 Joint Spine Section Meeting*. J Neurosurg Spine, 2013. **18**(1): p. 85-95.

420. Hu, M.H., et al., *Lovastatin promotes redifferentiation of human nucleus pulposus cells during expansion in monolayer culture*. *Artif Organs*, 2011. **35**(4): p. 411-6.
421. Rederstorff, E., et al., *Enriching a cellulose hydrogel with a biologically active marine exopolysaccharide for cell-based cartilage engineering*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015.
422. Vinatier, C., et al., *Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel*. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2007. **80**(1): p. 66-74.
423. Vinatier, C., et al., *A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes*. *Biomaterials*, 2005. **26**(33): p. 6643-6651.
424. Wang, J.Y., et al., *Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001. **26**(16): p. 1747-51; discussion 1752.
425. Sivan, S.S., et al., *Injectable hydrogels with high fixed charge density and swelling pressure for nucleus pulposus repair: biomimetic glycosaminoglycan analogues*. *Acta Biomater*, 2014. **10**(3): p. 1124-33.
426. Willems, N., et al., *Safety of intradiscal injection and biocompatibility of polyester amide microspheres in a canine model predisposed to intervertebral disc degeneration*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2015.
427. Clouet, J., et al., *The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering*. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 2009. **76**(6): p. 614-618.
428. Leung, V.Y., et al., *Tissue engineering for intervertebral disk degeneration*. *Orthop Clin North Am*, 2011. **42**(4): p. 575-83.
429. Silva-Correia, J., et al., *Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk*. *Biotechnol Adv*, 2013. **31**(8): p. 1514-31.
430. Illien-Junger, S., et al., *Combined Anti-Inflammatory and Anti-AGE Drug Treatments Have a Protective Effect on Intervertebral Discs in Mice with Diabetes*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64302.
431. Sakai, D., et al., *Migration of bone marrow-derived cells for endogenous repair in a new tail-looping disc degeneration model in the mouse: a pilot study*. *Spine J*, 2015. **15**(6): p. 1356-65.
432. Bellin, M., et al., *Induced pluripotent stem cells: the new patient?* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(11): p. 713-26.
433. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(12): p. 3081-9.
434. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
435. Deng, X.Y., et al., *Non-viral methods for generating integration-free, induced pluripotent stem cells*. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2015. **10**(2): p. 153-8.
436. Goh, P.A., et al., *A systematic evaluation of integration free reprogramming methods for deriving clinically relevant patient specific induced pluripotent stem (iPS) cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e81622.
437. Schlaeger, T.M., et al., *A comparison of non-integrating reprogramming methods*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(1): p. 58-63.
438. Seki, T. and K. Fukuda, *Methods of induced pluripotent stem cells for clinical application*. *World J Stem Cells*, 2015. **7**(1): p. 116-25.
439. Zhou, Y.Y. and F. Zeng, *Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2013. **11**(5): p. 284-7.

440. Mascetti, V.L. and R.A. Pedersen, *Human-Mouse Chimerism Validates Human Stem Cell Pluripotency*. *Cell Stem Cell*, 2016. **18**(1): p. 67-72.
441. Guenther, M.G., et al., *Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(2): p. 249-57.
442. Laurila, K., et al., *Integrative genomics and transcriptomics analysis of human embryonic and induced pluripotent stem cells*. *BioData Min*, 2014. **7**(1): p. 32.
443. Rouhani, F., et al., *Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells*. *PLoS Genet*, 2014. **10**(6): p. e1004432.
444. Hu, B.Y., et al., *Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(9): p. 4335-40.
445. Cai, J., et al., *Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats*. *Stem Cells Dev*, 2010. **19**(7): p. 1017-23.
446. Chambers, S.M., et al., *Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling*. *Nat Biotechnol*, 2009. **27**(3): p. 275-80.
447. Shi, Y., et al., *Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(3): p. 477-86, S1.
448. Mummery, C.L., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview*. *Circ Res*, 2012. **111**(3): p. 344-58.
449. Newman, A.M. and J.B. Cooper, *Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(2): p. 258-62.
450. Osafune, K., et al., *Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(3): p. 313-5.
451. Koehler, K.R., et al., *Extended passaging increases the efficiency of neural differentiation from induced pluripotent stem cells*. *BMC Neurosci*, 2011. **12**: p. 82.
452. Pauklin, S. and L. Vallier, *Activin/Nodal signalling in stem cells*. *Development*, 2015. **142**(4): p. 607-19.
453. Levenstein, M.E., et al., *Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal*. *Stem Cells*, 2006. **24**(3): p. 568-74.
454. Goke, J., et al., *Genome-wide kinase-chromatin interactions reveal the regulatory network of ERK signaling in human embryonic stem cells*. *Mol Cell*, 2013. **50**(6): p. 844-55.
455. Yu, P., et al., *FGF2 sustains NANOG and switches the outcome of BMP4-induced human embryonic stem cell differentiation*. *Cell Stem Cell*, 2011. **8**(3): p. 326-34.
456. Genbacev, O., et al., *Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders*. *Fertil Steril*, 2005. **83**(5): p. 1517-29.
457. James, D., et al., *TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells*. *Development*, 2005. **132**(6): p. 1273-82.
458. Vallier, L., M. Alexander, and R.A. Pedersen, *Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 19): p. 4495-509.
459. Vallier, L., et al., *Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression*. *Development*, 2009. **136**(8): p. 1339-49.
460. Vallier, L., et al., *Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells*. *Stem Cells*, 2009. **27**(11): p. 2655-66.

461. Wang, G., et al., *Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **330**(3): p. 934-42.
462. Xiao, L., X. Yuan, and S.J. Sharkis, *Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells*. *Stem Cells*, 2006. **24**(6): p. 1476-86.
463. Xiao, B., et al., *[Relationship between 666C > T polymorphism of TIMP-1 and lumbar intervertebral disc degeneration]*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2010. **90**(41): p. 2939-42.
464. Xu, R.H., et al., *NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(2): p. 196-206.
465. Camus, A., et al., *Absence of Nodal signaling promotes precocious neural differentiation in the mouse embryo*. *Dev Biol*, 2006. **295**(2): p. 743-55.
466. Darr, H., Y. Mayshar, and N. Benvenisty, *Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features*. *Development*, 2006. **133**(6): p. 1193-201.
467. Saunders, A., F. Faiola, and J. Wang, *Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog*. *Stem Cells*, 2013. **31**(7): p. 1227-36.
468. Zaehres, H., et al., *High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells*. *Stem Cells*, 2005. **23**(3): p. 299-305.
469. Funayama, N.S., et al., *beta-Catenin Regulates Primitive Streak Induction through Collaborative Interactions with SMAD2/SMAD3 and OCT4*. *Cell Stem Cell*, 2015. **16**(6): p. 639-52.
470. Pan, G.J., et al., *Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4*. *Cell Res*, 2002. **12**(5-6): p. 321-9.
471. Huangfu, D., et al., *Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(11): p. 1269-75.
472. Rodda, D.J., et al., *Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(26): p. 24731-7.
473. Wang, J., D.N. Levasseur, and S.H. Orkin, *Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(17): p. 6326-31.
474. Zhang, L., et al., *Successful co-immunoprecipitation of Oct4 and Nanog using cross-linking*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **361**(3): p. 611-4.
475. Chew, J.L., et al., *Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(14): p. 6031-46.
476. Loh, Y.H., et al., *The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells*. *Nat Genet*, 2006. **38**(4): p. 431-40.
477. Boland, M.J., K.L. Nabor, and J.F. Loring, *Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation*. *Circ Res*, 2014. **115**(2): p. 311-24.
478. Liang, G. and Y. Zhang, *Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective*. *Cell Res*, 2013. **23**(1): p. 49-69.
479. Lim, D.A., *Transcriptional and epigenetic insights from stem cells and developing tissues*. *Development*, 2015. **142**(15): p. 2549-53.
480. Tee, W.W. and D. Reinberg, *Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs*. *Development*, 2014. **141**(12): p. 2376-90.
481. Loh, K.M., et al., *Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations*. *Cell Stem Cell*, 2014. **14**(2): p. 237-52.
482. Toivonen, S., et al., *Activin A and Wnt-dependent specification of human definitive endoderm cells*. *Exp Cell Res*, 2013. **319**(17): p. 2535-44.

483. Yu, J.S., et al., *PI3K/mTORC2 regulates TGF-beta/Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7212.
484. Brown, S., et al., *Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors*. Stem Cells, 2011. **29**(8): p. 1176-85.
485. Chng, Z., et al., *SIP1 mediates cell-fate decisions between neuroectoderm and mesendoderm in human pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(1): p. 59-70.
486. Teo, A.K., et al., *Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin*. Genes Dev, 2011. **25**(3): p. 238-50.
487. McLean, A.B., et al., *Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 29-38.
488. Naujok, O., U. Diekmann, and S. Lenzen, *The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells is initially independent from activin A but requires canonical Wnt-signaling*. Stem Cell Rev, 2014. **10**(4): p. 480-93.
489. Touboul, T., et al., *Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development*. Hepatology, 2010. **51**(5): p. 1754-65.
490. Chal, J., et al., *Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(9): p. 962-9.
491. Winzi, M.K., et al., *Isolation and characterization of node/notochord-like cells from mouse embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(11): p. 1817-27.
492. Colombo, E., et al., *Mouse orthologue of ARX, a gene mutated in several X-linked forms of mental retardation and epilepsy, is a marker of adult neural stem cells and forebrain GABAergic neurons*. Dev Dyn, 2004. **231**(3): p. 631-9.
493. Miura, H., et al., *Expression of a novel aristaless related homeobox gene 'Arx' in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate*. Mech Dev, 1997. **65**(1-2): p. 99-109.
494. Chen, J., et al., *Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) into nucleus pulposus-like cells in vitro*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75548.
495. Liu, Y., M.N. Rahaman, and B.S. Bal, *Modulating notochordal differentiation of human induced pluripotent stem cells using natural nucleus pulposus tissue matrix*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100885.
496. Friedenstein, A.J., et al., *Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. Transplantation, 1974. **17**(4): p. 331-40.
497. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Exp Hematol, 1976. **4**(5): p. 267-74.
498. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**(3): p. 381-90.
499. Dominici, M., 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.
500. Jones, E.A., et al., *Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(6): p. 1731-40.
501. Jones, E.A., 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.

502. Jones, E.A., et al., *Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(12): p. 3349-60.
503. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. *Stem Cells*, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
504. Li, C.Y., et al., *Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy*. *Stem Cell Res Ther*, 2015. **6**: p. 55.
505. Mehlhorn, A.T., et al., *Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(10): p. 2853-62.
506. Ronziere, M.C., et al., *Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells*. *Biomed Mater Eng*, 2010. **20**(3): p. 145-58.
507. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(9): p. 726-36.
508. Sheng, G., *The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs)*. *BMC Dev Biol*, 2015. **15**(1): p. 44.
509. Caplan, A.I., *All MSCs are pericytes?* *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(3): p. 229-30.
510. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(3): p. 301-13.
511. Itaba, N., et al., *Human mesenchymal stem cell-engineered hepatic cell sheets accelerate liver regeneration in mice*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 16169.
512. Lindvall, O., Z. Kokaia, and A. Martinez-Serrano, *Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work*. *Nat Med*, 2004. **10 Suppl**: p. S42-50.
513. Gantenbein-Ritter, B., et al., *Differential response of human bone marrow stromal cells to either TGF-beta(1) or rhGDF-5*. *Eur Spine J*, 2011. **20**(6): p. 962-71.
514. Stoyanov, J.V., et al., *Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells*. *Eur Cell Mater*, 2011. **21**: p. 533-47.
515. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells*. *Blood*, 2007. **110**(10): p. 3499-506.
516. Prockop, D.J. and J.Y. Oh, *Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation*. *Mol Ther*, 2012. **20**(1): p. 14-20.
517. Wang, Y., et al., *Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(11): p. 1009-16.
518. El-Jawhari, J.J., et al., *Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis*. *QJM*, 2014. **107**(7): p. 505-14.
519. Molendijk, I., et al., *Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in Crohn's disease*. *J Allergy (Cairo)*, 2012. **2012**: p. 187408.
520. Sun, Y., et al., *Mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis display impaired function in inhibiting Th17 cells*. *J Immunol Res*, 2015. **2015**: p. 284215.
521. Karussis, D., et al., *Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases*. *J Neurol Sci*, 2008. **265**(1-2): p. 131-5.
522. Swart, J.F., et al., *Mesenchymal stem cell therapy in proteoglycan induced arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(4): p. 769-77.
523. Haufe, S.M. and A.R. Mork, *Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs*. *Stem Cells Dev*, 2006. **15**(1): p. 136-7.

524. Orozco, L., et al., *Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study*. Transplantation, 2011. **92**(7): p. 822-8.
525. Yoshikawa, T., et al., *Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies*. Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(11): p. E475-80.
526. Pettine, K.A., et al., *Percutaneous injection of autologous bone marrow concentrate cells significantly reduces lumbar discogenic pain through 12 months*. Stem Cells, 2015. **33**(1): p. 146-56.
527. Pang, X., H. Yang, and B. Peng, *Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of chronic discogenic low back pain*. Pain Physician, 2014. **17**(4): p. E525-30.
528. Sakai, D., 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. 3531-3541.
529. Barczewska, M., et al., *MR monitoring of minimally invasive delivery of mesenchymal stem cells into the porcine intervertebral disc*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74658.
530. Saldanha, K.J., et al., *Magnetic resonance imaging of iron oxide labelled stem cells: applications to tissue engineering based regeneration of the intervertebral disc*. Eur Cell Mater, 2008. **16**: p. 17-25.
531. Sobajima, S., et al., *Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration*. The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society, 2008. **8**(6): p. 888-896.
532. 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 (Phila Pa 1976), 2009. **34**(12): p. 1272-80.
533. Li, X., et al., *Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in co-cultures with nucleus pulposus*. Connect Tissue Res, 2005. **46**(2): p. 75-82.
534. Ruan, D., et al., *Differentiation of human Wharton's jelly cells toward nucleus pulposus-like cells after coculture with nucleus pulposus cells in vitro*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(1-2): p. 167-75.
535. Wei, A., 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.
536. Cai, F., et al., *Evaluation of intervertebral disc regeneration with implantation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) using quantitative T2 mapping: a study in rabbits*. Int Orthop, 2015. **39**(1): p. 149-59.
537. Henriksson, H.B., et al., *Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model*. Spine (Phila Pa 1976), 2009. **34**(2): p. 141-8.
538. Sakai, D., 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. 2379-2387.
539. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. J Cell Biochem, 2006. **98**(5): p. 1076-84.
540. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. Science, 2006. **311**(5769): p. 1880-5.
541. Strassburg, S., et al., *Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype*. Regen Med, 2010. **5**(5): p. 701-11.

542. Yang, S.H., et al., *In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation*. Spine (Phila Pa 1976), 2008. **33**(18): p. 1951-7.
543. Sun, Z., et al., *Adipose-derived stromal cells protect intervertebral disc cells in compression: implications for stem cell regenerative disc therapy*. Int J Biol Sci, 2015. **11**(2): p. 133-43.
544. Svanvik, T., et al., *Human disk cells from degenerated disks and mesenchymal stem cells in co-culture result in increased matrix production*. Cells Tissues Organs, 2010. **191**(1): p. 2-11.
545. Watanabe, T., et al., *Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 2010. **28**(5): p. 623-30.
546. Yakkoui, Y., et al., *Chordoma: the entity*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1846**(2): p. 655-69.
547. Kelley, M.J., et al., *Characterization of T gene sequence variants and germline duplications in familial and sporadic chordoma*. Hum Genet, 2014. **133**(10): p. 1289-97.
548. Miettinen, M., et al., *Nuclear Brachyury Expression Is Consistent in Chordoma, Common in Germ Cell Tumors and Small Cell Carcinomas, and Rare in Other Carcinomas and Sarcomas: An Immunohistochemical Study of 5229 Cases*. Am J Surg Pathol, 2015. **39**(10): p. 1305-12.
549. Sharon, N., et al., *Molecular and functional characterizations of gastrula organizer cells derived from human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2011. **29**(4): p. 600-8.
550. Hendrickx, M., X.H. Van, and L. Leyns, *Anterior-posterior patterning of neural differentiated embryonic stem cells by canonical Wnts, Fgfs, Bmp4 and their respective antagonists*. Dev Growth Differ, 2009. **51**(8): p. 687-98.
551. Wells, J.M. and D.A. Melton, *Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers*. Development, 2000. **127**(8): p. 1563-72.
552. Yamaguchi, T.P., R.A. Conlon, and J. Rossant, *Expression of the fibroblast growth factor receptor FGFR-1/flg during gastrulation and segmentation in the mouse embryo*. Dev Biol, 1992. **152**(1): p. 75-88.
553. Odent, S., et al., *Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(9): p. 1683-9.
554. Siegfried, Z. and I. Simon, *DNA methylation and gene expression*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(3): p. 362-71.
555. Kaikkonen, M.U., M.T. Lam, and C.K. Glass, *Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics*. Cardiovasc Res, 2011. **90**(3): p. 430-40.
556. Warmflash, A., et al., *A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells*. Nat Methods, 2014. **11**(8): p. 847-54.
557. Crowder, S.W., et al., *Material Cues as Potent Regulators of Epigenetics and Stem Cell Function*. Cell Stem Cell, 2016. **18**(1): p. 39-52.
558. Zizic Mitrecic, M., et al., *The mouse gene Noto is expressed in the tail bud and essential for its morphogenesis*. Cells Tissues Organs, 2010. **192**(2): p. 85-92.
559. Guo, Y., et al., *The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endodermal-specific promoter expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3663-7.
560. Pourquie, O., et al., *Control of dorsoventral patterning of somitic derivatives by notochord and floor plate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5242-6.

561. Kim, J.H., et al., *High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18556.
562. de Felipe, P., et al., *E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(2): p. 68-75.
563. Kuzmich, A.I., et al., [*Quantitative comparison of expression for genes linked in bicistronic vectors via ires or 2A-peptide of porcine teschovirus-1 sequence*]. Bioorg Khim, 2013. **39**(4): p. 454-65.
564. Ryan, M.D., A.M. King, and G.P. Thomas, *Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt **11**): p. 2727-32.
565. Lin, Y., et al., *Survivin is expressed in degenerated nucleus pulposus cells and is involved in proliferation and the prevention of apoptosis in vitro*. Mol Med Rep, 2016. **13**(1): p. 1026-32.
566. Minogue, B.M., et al., *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.
567. Omoto, S., et al., *Expression and localization of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24/CCN2) in osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(10): p. 771-8.
568. Tran, C.M., et al., *CCN2 suppresses catabolic effects of interleukin-1beta through alpha5beta1 and alphaVbeta3 integrins in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration*. J Biol Chem, 2014. **289**(11): p. 7374-87.
569. Rutges, J., 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.
570. Aigner, T., et al., *SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes*. Matrix Biol, 2003. **22**(4): p. 363-72.
571. Park, J.Y., et al., *Comparative expression of matrix-associated genes and inflammatory cytokines-associated genes according to disc degeneration: analysis of living human nucleus pulposus*. J Spinal Disord Tech, 2011. **24**(6): p. 352-7.
572. Power, K.A., et al., *Identification of cell surface-specific markers to target human nucleus pulposus cells: expression of carbonic anhydrase XII varies with age and degeneration*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(12): p. 3876-86.
573. Mobasher, A., et al., *Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9*. Cell Biol Int, 2002. **26**(3): p. 297-300.
574. Richardson, S.M., et al., *Expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-3, GLUT-9 and HIF-1alpha in normal and degenerate human intervertebral disc*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(4): p. 503-11.
575. Le Maitre, C.L., et al., *Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 4): p. 652-5.
576. Mwale, F., et al., *Effect of oxygen levels on proteoglycan synthesis by intervertebral disc cells*. Spine. **36**(2): p. E131-138-E131-138.
577. Bridgen, D.T., et al., *Integrin-mediated interactions with extracellular matrix proteins for nucleus pulposus cells of the human intervertebral disc*. J Orthop Res, 2013. **31**(10): p. 1661-7.
578. Chen, J., et al., *Expression of laminin isoforms, receptors, and binding proteins unique to nucleus pulposus cells of immature intervertebral disc*. Connect Tissue Res, 2009. **50**(5): p. 294-306.

579. Nettles, D.L., W.J. Richardson, and L.A. Setton, *Integrin expression in cells of the intervertebral disc*. J Anat, 2004. **204**(6): p. 515-20.
580. Woods, V.L., Jr., et al., *Integrin expression by human articular chondrocytes*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(4): p. 537-44.
581. 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.
582. Merceron, C., et al., *The effect of two and three dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel*. Cell Transplantation, 2011.
583. Merceron, C., et al., *Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine*. Stem Cells, 2012. **30**(3): p. 471-80.
584. Portron, S., et al., *Effects of in vitro low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their in vivo chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62368.
585. Hong, J.H., et al., *Essential role of carbonic anhydrase XII in secretory gland fluid and HCO₃⁻ secretion revealed by disease causing human mutation*. J Physiol, 2015. **593**(24): p. 5299-312.
586. Chujo, T., et al., *Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc--in vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study*. Spine (Phila Pa 1976), 2006. **31**(25): p. 2909-17.
587. Tao, F., et al., *Differentiation of mesenchymal stem cells into nucleus pulposus cells in vitro*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008. **28**(2): p. 156-8.
588. Zhou, X., et al., *BMP3 Alone and Together with TGF-beta Promote the Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into a Nucleus Pulposus-Like Phenotype*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(9): p. 20344-59.
589. Risbud, M.V., et al., *Defining the Phenotype of Young Healthy Nucleus Pulposus Cells: Recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 Annual ORS Meeting*. J Orthop Res, 2014.
590. Merceron, C., et al., *Cartilage tissue engineering: From hydrogel to mesenchymal stem cells*. Biomed Mater Eng, 2010. **20**(3): p. 159-66.
591. Nadkarni, R.R., S. Abed, and J.S. Draper, *Organoids as a model system for studying human lung development and disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2015.
592. Grabinger, T., et al., *Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1228.
593. Takebe, T., et al., *Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant*. Nature, 2013.
594. Clouet, J., et al., *Characterization of the age-dependent intervertebral disc changes in rabbit by correlation between MRI, histology and gene expression*. BMC Musculoskelet Disord, 2011. **12**: p. 147.
595. Lucas, O., et al., *Laser-treated Nucleus pulposus as an innovative model of intervertebral disc degeneration*. Experimental Biology and Medicine, 2012.

Thèse de Doctorat

Pauline Colombier

Médecine régénératrice du disque intervertébral :

Intérêt des cellules souches mésenchymateuses et pluripotentes induites

Regenerative medicine of intervertebral disc:

Human mesenchymal and induced pluripotent stem cells

Résumé

Les disques intervertébraux (DIV) sont composés d'une partie centrale appelée le *Nucleus pulposus* (NP). Cette partie centrale est peuplée de cellules notochordales (CNT), considérées comme les cellules progénitrices du NP et de nucléopulpecytes (NPCytes), responsable de la synthèse de la matrice extracellulaire. L'ensemble des cellules du NP est issu de la notochorde embryonnaire. La disparition précoce des CNT et NPCytes est associée à l'apparition des premiers signes de dégénérescence discale entraînant des lombalgies. Ainsi, compléter le NP en CNT et NPCytes produits à partir de cellules souches humaines pourrait être une approche prometteuse pour la médecine régénératrice du DIV. Dans ce contexte, ce travail de thèse a consisté à différencier des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) humaines en CNT. Les connaissances acquises sur les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la formation de la notochorde chez l'embryon de souris ont été transposées à l'utilisation des iPSC. La capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses en NPCytes a également été investiguée. Ainsi, ces travaux de thèse ont permis de générer des CNT embryonnaires et NPCytes à partir de cellules souches adultes humaines. De plus, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans ces voies de différenciation a été réalisée. Ces travaux de thèse ont ainsi contribué à améliorer la médecine régénératrice du DIV, en générant des cellules potentiellement capables de restaurer l'homéostasie et la fonction du NP.

Mots clés

Notochorde, disques intervertébraux, cellules souches mésenchymateuses, cellules souches pluripotentes induites, différenciation, médecine régénératrice

Abstract

Intervertebral discs (IVD) are composed of a central part named Nucleus pulposus (NP). This Nucleus pulposus is populated by notochord cells (NCT), which are considered as NP cell progenitors and nucleopulpecytes (NPCytes), responsible for extracellular matrix synthesis. Both cell types are derived from the embryonic notochord. The loss of NCT and NPCytes early in life is associated with first signs of disc degeneration. Thus, the supplementation of the degenerative NP with human stem cells- derived NCT and NPCytes could be a promising approach for the regenerative medicine of IVD. In this context, this work aimed at the establishment of a notochordal differentiation protocol from human induced pluripotent stem cells (iPSC). Molecular and cellular mechanisms involved in the formation of the notochord in mice embryos were transposed to iPSC technology. To address whether NPCytes can be generated, we investigated the abilities of human mesenchymal stem cells to differentiate toward nucleopulpecogenic lineage. In summary, we have shown that NCT and NPCytes can be generated by controlling human stem cells differentiation. In addition, molecular mechanisms driving both differentiation processes have been described. Finally, these findings contributed to the regenerative medicine of IVD, by generating cells potentially able to restore NP homeostasis and function.

Key Words

Notochord, intervertebral disc, mesenchymal stem cells, induced pluripotent stem cells, differentiation, regenerative medicine