DOCTORAT BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

Comue Université Bretagne Loire

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « Biologie cellulaire, biologie du développement »

Par

Lily PAILLAT

Rôle de la Cavéoline1 dans le disque intervertébral : du développement embryonnaire à la croissance post-natale.

Thèse présentée et soutenue à NANTES, le 9 Juillet 2021
Unité de recherche : INSERM UMR 1229, RMeS Regenerative Medicine and Skeleton

Rapporteurs avant soutenance :

Stéphane Vassilopoulos	Chargé de Recherche	Institut de Myologie, UMRS 974, Sorbonne Université, Paris
David Eglin	Professeur des Universités	Ecole des Mines, centre ingénierie et Santé, Saint-Etienne,

Composition du Jury :

Président :	David Eglin	Professeur des Universités	Ecole des Mines, centre ingénierie et Santé, Saint-Etienne,
Examinateurs :	Laurence Legeai-Mallet	Directeur de Recherche	Institut Imagine, INSERM UMR 1163, Université de Paris
	Hang Korng Ea	Professeur des Universités Praticien Hospitalier	Bioscar, INSERM UMR 1132 Université de Paris
Dir. de thèse :	Anne Camus	Chargée de Recherche	Laboratoire RMeS, UMR 1229, Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	Soazig Le Lay	Chargée de Recherche	Institut du thorax, UMR 1087, CNRS 6291, Université d'Angers

Invitée :

Valérie Dupé	Chargée de Recherche	Institut génétique et développement de Rennes, UMR 6290, CNRS-UR1, Université de Rennes

A Antoine, mon père,

A Henri et Mimi, mes grands-parents

« Ce ne sont pas nos aptitudes qui montrent ce que nous sommes, ce sont nos choix »
Albus Dumbledore, « Harry Potter et la chambre des secrets »

« Lorsqu'un fait semble contredire une longue série de déductions, c'est qu'on l'interprète mal *» Sherlock Holmes, « une étude rouge »*

« La réussite n'est pas définitive, l'échec n'est pas fatal : c'est le courage de continuer qui compte » *Winston Churchill*

« Pour être irremplaçable, il faut être différente »
Coco Chanel

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Jérôme Guicheux pour m'avoir accueilli et m'avoir donné ma chance pour réaliser cette thèse au sein du laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229. Merci pour ton soutien, ton sens critique toujours aiguisé mais juste, et ton oreille attentive.

Je remercie chaleureusement le Dr Anne Camus, ma directrice de thèse, pour m'avoir encadré durant ces 3 années. Anne, je me permets de m'adresser directement à toi pour te remercier pour le temps et l'énergie que tu m'as consacrés, tes innombrables conseils, aussi bien sur le plan professionnel que sur le plan personnel, ta rigueur scientifique, et tes connaissances. Je suis fière du travail accompli à tes côtés et j'espère que tu garderas un bon souvenir de cette aventure.

Je remercie le Dr Soazig Le Lay, ma co-directrice de thèse, pour sa disponibilité, ses précieux conseils, son aide et son expertise pour l'interprétation des résultats, les expérimentations à Angers et son soutien.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr Stéphane Vassilopoulos et au Pr David Eglin, pour me faire l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs, ainsi que le Pr Hang Korng et le Dr Laurence Legeai-Mallet pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateurs. Je remercie également chaleureusement le Dr Valérie Dupé d'avoir accepté de juger ces travaux en tant que membre invitée.

Je remercie le Dr Christine Vesque et le Dr Jocelyne Magré d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse dans le cadre de deux comités de suivi de thèse. Je vous remercie pour ces échanges scientifiques enrichissants et vos nombreux conseils.

Je tiens à remercier tout particulièrement Maeva Dutilleul pour ses innombrables conseils techniques pour dompter les expérimentations sur les coupes histologiques d'embryons.

Je remercie aussi sincèrement le Dr Florent Autrusseau pour son aide précieuse à la réalisation de ce projet et la création du programme de quantification personnalisé. Un grand merci surtout pour ta patience et ta compréhension.

Je remercie tous les membres qui ont ou font partie de l'équipe BIODIV ; Claire, Nicolas, Maeva, Antoine, Caroline, Kelly, Julie et Camille pour les nombreux échanges (scientifiques ou non) qu'on a pu avoir, leur bonne humeur et leur soutien au quotidien. Un merci tout particulier pour Claire pour son aide précieuse sur les derniers mois de ma thèse.

Un immense merci également à Julie Lesoeur, Boris Halgand et Sophie Sourice, pour leur aide respectivement en histologie, culture cellulaire et biologie moléculaire. Merci pour votre grande disponibilité, votre compréhension, votre patience et vos précieux conseils ! Merci également à Aurélie, Caroline et Joëlle pour leur soutien technique sur les plateformes du laboratoire.

Je tenais également à remercier Philippe Hulin et Steven Nedellec pour leur accueil toujours sympathique sur la plateforme MicroPicell (SFR Francois Bonamy, UMS 016), devenue un peu ma seconde maison, et leurs conseils qui m'ont fait gagner un temps précieux !

Je remercie également Florence Manero (plateforme SCIAM, Angers) pour la réalisation des images en MET, et Grégory Hilairet (Université d'Angers, SFR ICAT) pour les génotypages des animaux.

Je remercie chaleureusement tout le personnel des animaleries de l'UTE IRS UN de Nantes (Marie Liaboeuf, Coralie Lecompte, Julien Drochon et l'équipe des animaliers) et du SCAHU à Angers (Jérôme Roux, Pierre Legras, Adeline Mourlan et Elodie Guillet) pour leur collaboration, leur adaptation à notre projet « atypique » et leur soutien technique et logistique.

C'est enfin avec une grande et sincère émotion que je remercie l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil tellement chaleureux, leur sympathie, leur bonne humeur quotidienne qui m'ont fait tant de bien durant ces 3 années. Un merci tout particulier à Carole, Sophie, Valérie et Aurore pour les demandes administratives, missions et commandes de dernière minute gérées d'une main de maître ; Laurent et Sarah pour leurs barbeucs légendaires ; Solène et Marianne pour leur énergie et leur force de caractère, Baptiste pour sa bonne humeur et ses blagues et François pour les découvertes de jeux de société !

Parce que oui, il faut l'avouer, la musique « c'est ma clope, mon shit, ma dose, ma weed, ma coke, mon speed, mon crack » (« Rail de Musique », *Stromae*), quelques chansons de ma playlist m'ont inspiré pour l'écriture de ces remerciements.

« Papa » et « Rendez-vous là-haut » ***BigFlo & Oli*** **; « Papaoutai »** ***Stromae*** **; Hell's Bells** ***AC/DC ;*** **« Invincible »** ***Astonvilla ;*** **« Pas toi »** ***Jean-Jacques Goldman ; « Losing my religion »*** ***REM*** **: « La groupie du pianiste »** ***Michel Berger*** **; « Mistral Gagnant »** ***Renaud***

Parce que cette aventure a surtout été un défi personnel que je m'étais juré de relever pour toi, comment ne pas commencer ces remerciements par toi, mon papou. Je voudrais te remercier pour ton amour, tes sourires, tes blagues, tes bons petits plats et ce goût pour la musique et le basket que tu m'as transmis. Merci aussi pour ton caractère dont j'ai hérité et pour toutes ces valeurs que tu m'as inculquées et qui font ma fierté aujourd'hui. Je suis profondément triste que tu ne sois pas là pour me voir le jour de cette soutenance mais je sais que tu me regardes de ton air bienveillant. Il m'a fallu du temps mais aujourd'hui j'ai bien compris « qu'il n'y a pas de bons pères, il n'y a que des hommes qui font de leur mieux ». Alors je terminerai en citant les paroles d'une chanson que j'écoute le soir quand je pense à toi en te disant que « mes amis me rappellent que la vie doit continuer. Ma montre me rappelle qu'un jour je te rejoindrai. En attendant, je fais la fête, et je me mets à chanter : Rendez-vous là-haut ; comme si tu l'entendais ».

« Les yeux de la Mama » ***Kendji Girac*** **; « Bohemian Rapsody »** ***Queen*** **; « Mrs Robinson »** ***Simon and Garfunckel ;*** **« Wake me up** ***» Wham ;*** **« La Javanaise** ***» Serge Gainsbourg***

Ma petite minoune ! J'en ai vécu des galères pour en arriver jusqu'ici ! Mais ce qui est certain c'est que je n'y serai jamais arrivé sans toi. Toi qui sais m'écouter quand ça va mal, me faire rire, me faire comprendre quand je dois me remettre en question pour toujours en apprendre plus sur moi et aller de l'avant. Comme je le dis souvent, pour moi tu es un chat, tu as eu 7 vies ! Je t'admire (c'est le bon mot je t'assure) pour ta capacité à rebondir, à ne jamais te laisser faire, à te remettre en question et à te battre ! Je t'admire également pour le courage dont tu fais preuve pour me supporter, surtout les jours ou j'ai décidé de t'embêter et de te charrier. Je sais qu'on pourra toujours compter l'une sur l'autre, qu'on sera toujours aussi complices, et de toute façon tu me l'as promis, tu ne mourras pas avant l'âge de 110 ans ! Hâte qu'on vive encore des tas d'aventures ensemble mam's.

« Envoles-moi » *Jean-Jacques Goldman* ; « Le paradis blanc » *Michel Berger* ; « Emmenez-moi » *Charles Aznavour* ; « Lettre à Elise » *Beethoven*

Je voulais tout d'abord te remercier grand-père. Je me souviens comme si c'était hier quand je me mettais à la porte de ton bureau et que je te regardais jouer du piano et chanter avec admiration. J'étais toute petite, mais je sais que c'est toi qui m'a transmis cette passion pour la musique. Je me souviens également de cette malice que tu avais dans le regard quand on allait piquer les gâteaux dans la cuisine dans le dos de grand-mère. Je ne sais pas lequel de nous deux était le plus content et le plus gourmand ! Merci aussi de m'avoir fait comprendre que la culture, la connaissance, et la tolérance sont des valeurs essentielles. Cette thèse je l'ai aussi faite pour toi, pour montrer « qu'à coup de livres je franchirais tous ces murs ». Merci aussi à toi grand-mère, pour ta douceur, ton amour et ta bienveillance. Merci à vous deux, pour m'avoir montré ce que représente l'amour, le vrai. A tous les instants de ma vie, je me demande ce que vous auriez fait ou ce que vous m'auriez conseillé de faire. J'espère que vous êtes fiers de celle que je suis devenue. Vous me manquez tant.

« Et si tu n'existais pas » *Joe Dassin* ; « Je t'aime à l'italienne » *Frédéric François*

Je vais surement te décevoir mamie, mais ces chansons ne sont pas vraiment dans ma playlist… Mais c'est évidemment elles qui me sont venues en pensant à toi. Ces chansons qui défilaient sur ton petit poste dans la cuisine. Je voudrais te remercier pour l'amour que tu me portes, pour la bienveillance avec laquelle tu me regardes depuis toujours. Merci pour tous ces Kinder Maxi®, plus ou moins cachés dans le placard à provisions, pour toutes ces mousses au chocolat réconfortantes, ces clafoutis et j'en passe qui sont devenus mes « madeleines de Proust ». Je sais qu'on a encore plein de bons moments à passer qui s'ajouteront à mes souvenirs déjà remplis de joie ! Ne change jamais, même si, tu te fais quand même toujours trop de soucis pour moi !...

« Famille » *Jean-Jacques Goldman* ; « Place des grand hommes » *Patrick Bruel* ; « Comme d'hab » *BigFlo & Oli ;* « Jeune et con » *Saez ;* « Lean On *» Major Lazer*

Que d'épreuves traversées mais surtout de moments magiques, de bonheur, de rigolades passés ensemble depuis maintenant plus de 10 ans ! On s'était dis rendez-vous dans 10, et bien on y est ! Je voulais vous remercier forcément, et tous autant que vous êtes car sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui c'est certain.

Merci à Emilie, d'être un peu la maman de notre groupe toujours bienveillante et pleine de courage

Merci à Pauline, d'être toujours une oreille attentive à mes histoires et mes ragots, d'être une fonceuse et d'avoir des airs de détective privé…

Merci à Camille, pour ton si beau sourire, d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir montré le chemin que je devais emprunter pour évoluer. Loin des yeux mais jamais loin du cœur…

Merci à la grande puce Noëmie et la petite puce Marion. Si vous n'existiez pas il faudrait clairement vous inventer ! Merci Nono pour nous raconter toutes ces histoires qui ne peuvent arriver qu'à toi et d'avoir toujours la joie de vivre. Merci Mama, d'être toujours posée… Non en train de boutiquer en fait, d'être aussi douce et de prendre la vie comme elle vient.

Merci à Mélissa pour les belles valeurs que tu transmets toujours et purement et simplement pour la belle leçon de vie que tu nous à donné.

Merci à Marine et Manon les deux cousines, pour votre force de caractère, et pour toutes ces soirées mémorables ou vous nous avez tant fait rire.

Merci à Antoine, Romain et Anthony, d'avoir ce regard bienveillant et protecteur que des grands frères pourraient avoir.

Vous êtes ma force, un pilier sur lequel je peux me reposer. Je sais que depuis ces 3 ans je ne suis pas la plus disponible et la plus attentionnée des amies, pour autant vous ne m'avez jamais laissé tomber. Vous m'avez même mis des coups de pieds au cul quand c'était nécessaire. Les amis ça sert à ça aussi. Je ne vous le dis surement pas assez, mais je vous aime. On se donne rendez-vous dans 10 ans ?!

« La meilleure » ***Hatik*** **; « Ma Baker »** ***Boney M*** **; « Run away with me »** ***The Avener*** **; « Rock it »** ***Ofenbach*** **; « Un Homme »** ***Jérémy Frérot*** **; « Pour que tu m'aimes encore »** ***Céline Dion*** **; « Grand bain »** ***Dadju ft Ninho*** **; « Still loving you »** ***Scorpions***
Mon Nathan, mon gars-Nat', qui aurait cru que j'écrirais ce paragraphe… peut être tout le monde sauf nous deux en fait ! Tu es purement et simplement la plus belle chose qui me soit arrivé ces derniers mois. Je n'ai pas besoin de m'étendre, tu sais déjà tout sur ces étapes de ma vie qui ont fait ce que je suis. Pour rigoler je me compare souvent à un Tupperware®, et aujourd'hui je suis aux anges d'avoir enfin trouvé mon couvercle ! Je voulais te dire un immense (et le mot n'est pas assez fort) merci pour ton amour, ton soutien sans faille, ta confiance, ton regard toujours bienveillant, pour toutes ces barres de rire et ces soirées KohLanta. Hâte de vivre ma nouvelle aventure à tes côtés et de réaliser tous les petits projets dont on discute pour l'instant un peu en rigolant ^^ On ne sait peut-être pas ou l'on va pour le moment, mais on y va ensemble. « C'est nous deux ou bien rien jusqu'à la fin ».

« Crazy kids » ***Kesha*** **; « Can't hold us »** ***Macklemore*** **;**
Quelle chance d'être tombé sur vous, à la Fac pour Coralyne, et durant les stages de master pour Jade, Aurélien, Tristan et Joohee. Je me rappelle comme si c'était hier, des nombreuses soirées passées au labo à la fin du M2, mais aussi des nombreuses soirées passées dans les bars d'Angers ! Merci à vous pour votre soutien dans ces moments difficiles, vos sourires et ces incalculables barres de rire dans l'open space. Aujourd'hui les bébés canards sont devenus grands mais malgré la distance on ne se perd pas de vue, et c'est confirmééé, c'est ca l'amitié.

« Ma sœur » ***Clara Luciani;*** **« Cocaine »** ***Eric Clapton;*** **« Whenever, Wherever »** ***Shakira***
Ma Hilel, ma Muss-Muss. Comment ne pas avoir les larmes aux yeux en écrivant ces quelques mots… Arrivées quasiment en même temps au labo, passionnées de mode et de musique, c'était écrit on était faites pour s'entendre. Et ça n'a pas raté, un coup de foudre amical ! Je voulais te dire un immense merci car sans toi cette aventure n'aurait clairement pas été la même. On a traversé toutes les phases plus ou moins gaies de cette thèse ensemble, et j'ai trouvé en toi une véritable amie. Avec ton don de lire en moi comme dans un livre ouvert, tu as toujours été là pour m'écouter, me conseiller, me soutenir. Merci aussi pour ta joie de vivre tellement contagieuse et pour tous ces bons moments partagés. J'espère que j'ai été à la hauteur de l'amie que tu as été pour moi. L'aventure de la thèse arrive à sa fin, mais notre amitié est là pour un bon moment encore.

« **Demain »** ***BigFlo & Oli;*** **« Love me again »** ***Elton John;*** **« Hey brother »** ***Avicii***
Mon Pierre, mon Pi. Je crois qu'on peut réellement dire que je t'adore autant que tu m'exaspères ^^ Mais je ne peux pas m'en empêcher, faut toujours que je passe te voir à ton

bureau, pour parler de tout et de rien ! Et même si avec Hilel on adore te taquiner, tu sais à quel point tu comptes pour nous. Ces petits restos qu'on faisait tous les trois, ces vacances aussi, que de bons souvenirs et de bouffées d'oxygène durant ces trois années. Je voulais te remercier pour toutes ces barres de rire, tous tes conseils, ta générosité et ta bienveillance. Comme je te le dis tout le temps, ta personnalité atypique a fait mouche, alors surtout, surtout, ne changes jamais. Même si je ne suis plus au labo, tu ne te débarrasseras pas de moi comme ça, je compte bien rester dans ta vie ;)

« Run the world » ***Beyonce;*** **« Seul »** ***Garou***
Comment ne pas remercier le meilleur bureau du labo… Je me souviendrais toujours de mon premier jour, ou je suis arrivée avec mes crayons de couleurs pastels, mon agrafeuse rose et ma tonne de post-it (roses aussi évidemment), et où vous m'avez dit : je crois que « le bureau des pétasses » est fait pour toi ! Vous nous ne vous étiez pas trompé ! Alors un immense merci à vous, Maude, Leslie, Claire, Nina et Cécile d'avoir partagé mes joies, mes peines, d'avoir écouté mes ragots, de m'en avoir raconté aussi, d'avoir été compréhensives les jours ou je faisais ma tête de con… Merci pour tous vos conseils, votre soutien et ces bons moments passés au labo ou en dehors.
Un merci tout particulier à toi Claire. Merci de m'avoir écouté quand ça n'allait pas (ou quand ça allait bien aussi d'ailleurs !) sans aucun jugement. Je te remercie sincèrement pour ton soutien quotidien sur le plan personnel et professionnel.
Ne t'en fais pas Brian, je ne t'oublie pas ! ;) Je te félicite tout d'abord pour ton courage d'avoir été le seul mec dans le bureau ! je crois que tu étais le seul à pouvoir tenir le choc. Merci pour ton soutien, ton écoute et nos instants papotages en fin de journée dans le bureau.

« Egotrip » ***Therapie TAXI;*** **« Whisky in mind »** ***Christian Kane;*** **« Le coach »** ***Soprano;*** **« I feel so bad »** ***Kungs***
Merci à vous deux Nicolas et Kelly, co-fondateurs de la « Team Fox » ! Elle n'est peut-être pas aussi prestigieuse que la team Rocket, ni plus rapide que la lumière mais qu'est ce qu'elle est cool ^^. Nicolas, un grand merci pour ces instants de franche rigolade, pour tes anecdotes assez improbables parfois il faut bien le dire, et ton soutien ! Kelly, tellement heureuse d'avoir pu être un peu ta maman canard, j'espère que j'ai été à la hauteur de mes fonctions ! En tout cas merci pour nos petits instants papotages en dehors du labo, ton soutien dans les moments difficiles et ta bonne humeur. Je suis trop fière de toi et j'espère pouvoir te rendre un jour visite au pays des caribous ;)

« Gangsta's Paradise » ***Coolio ;*** **« California Love »** ***2pac feat Dr. Dre ;*** ***«*** **Bande organisée** ***» 13'Organisé***
Un grand merci à toi Cyril pour ce regard un peu de grand frère que tu as pu avoir, pour tous tes conseils (professionnels mais aussi personnels) et ta joie de vivre débordante. En revanche, je ne te remercie pas pour ma défaite au blind test, j'espère que tu t'es bien préparé ces derniers mois pour la revanche ;)

« Les copains d'abord » ***Georges Brassens*****; « Nothing else matters »** ***Metallica***
J'ai également une pensée pour vous Kiki, Chichi et Giulia ! Merci pour votre accueil, votre soutien et vos sourires !
Enfin un grand merci également à tous les autres thésards du labo, Mélina, Anaïs, Fabien, Mathilde, Constance, Floriane pour tous ces moments de vie qu'on a partagé ! Plein de bisous et force et honneur à vous pour la fin de la thèse.

Publications

Article experimental

Caveolin1/caveolae regulate cell proliferation during early postnatal growth of the intervertebral disc

Lily Paillat[1], Florent Autrusseau[1,2], Kelly Coutant[1], Maeva Dutilleul[1], Alexia Blandin[3,4] Gregory Hilairet[3], Soazig Le Lay[3,4] and Anne Camus[1]

Article soumis dans le journal "Frontiers in Cell and developmental Biology"
Manuscript ID : 726879

Communications

Communications affichées

Caveolin1 function in the embryonic development of the intervertebral disc, its maturation and degeneration

Paillat L, Henry A, Dutilleul M, Coutant K, Le Lay S, Camus A

EMBO Workshop — Caveolae and nanodomains: Translating structural principles and dynamics into function, 2019, Le Pouliguen, France

Communications orales

Caveolin1 function in the intervertebral disc from its embryonic development to maturation and degeneration

Lily Paillat, Antoine Henry, Maëva Dutilleul, Kelly Coutant, Soazig Le Lay and Anne Camus

Journées scientifiques de l'école doctorale, 2020, Nantes

Rôle de la cavéoline1 dans le disque intervertébral : du développement embryonnaire à la maturation et la dégénérescence

Lily Paillat, Antoine Henry, Maëva Dutilleul, Kelly Coutant, Soazig Le Lay and Anne Camus

Séminaire du groupe DEVSTEM, 2021, Nantes

Participation à l'encadrement technique

Kelly Coutant (Avril 2018 - Juin 2018), Stage de Master 1 Biologie – Santé, spécialité : Biologie Biotechnologies Recherche Thérapeutique, Nantes

« Etude de la distribution de la protéine YAP dans le DIV au cours du développement embryonnaire de la souris »

Liste des abréviations

AF : *annulus fibrosus*, anneau fibreux
AH : acide hyaluronique
ApoE : *Apoliprotein E*
BMP-2: bone morphogenic protein-2
CAFs: cancer-associated fibroblasts
CAV1: cavéoline1
CBD: caveolin binding domain
CK8 : cytokératine-8
CLCs : chondrocyte-like cells
CMV : corps multivésiculaires
CNTs : cellules notochordales
CSA : cellule stromale adipeuse
CSD: caveolin scaffolding domain
CSM: cellule souche mésenchymateuse
CTGF/CCN2: connective tissue growth factor
Cyr61: cysteine-rich angiogenic inducer 61
DDL : dégénérescence discale lombaire
DHH : desert hedgehog
DIV : disque intervertébral
DMSO : diméthyl sulfoxide
EGFR: epidermal growth factor receptor
EHD2: Eps15 homology domain-containing protein 2
eNOS : nictric oxyde synthase endothéliale
FOXA2: *forkhead box protein A2*
FRET: fluorescence resonnance energy transfert
GDF-5: growth differenciation factor 5
GLI1: glioma associated oncogene homolog 1
Glut-1: glucose transporter-1
HIC: hypoxie intermittente chronique
HIF1α: hypoxia inducible factor 1 alpha
HBC: hydropropyl-β-cyclodextrin
IFT: intraflagellar transport
IGFR: insulin-like growth factor receptor
IHH: Indian Hedgehog
IL-1: interleukine-1
iPSC: induced pluripotent stem cell
LDL: low density lipids
MEC : matrice extracellulaire
MET : microscopie électronique à transmission
MURC: muscle-restricted coiled-coil protein
NGF nerve growth factor
NF-κB nuclear factor κB
NOS3 : nitric oxide synthase-3
NO : oxyde nitrique

NP : *nucleus pulposus*, noyau pulpeux
NPcytes : nucléopulpocytes
OMS : organisation mondiale de la santé
Pacsine2: protein kinase C and casein subtstrate in neurons
Pax1: paired box 1
PG: protéoglycanes
PDGFR: platelet-derived growth factor receptor
PLC: plateau cartilagineux
PTCH 1: Patched 1
PTH: hormone thyroïdienne
PTRF: polymerase and transcript release factor
RE: réticulum endoplasmique
SAG: Smoothened agonist
SRDC: src-related gene product that binds to c-kinase
Shh: sonic hedgehog
T: brachyury
TAZ: transcriptional coactivateur PDZ binding motif
TIE2: tyrosine kinase endothéliale-2
TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TGF: transforming growth factor
TNF-α: tumor necrosis factor alpha
VDR : récepteur à la vitamine D
VEGF: vascular endothelial growth factor
VEs: vésicules extracellulaires
WGA: wheat germ agglutinin
YAP: yes-associated protein

Table des figures

Figure 1: Représentation schématique de la localisation des disques intervertébraux (DIV) le long du rachis humain. 22

Figure 2: Représentations schématiques de la colonne vertébrale humaine et de la structure des disques intervertébraux (DIV) la composant 23

Figure 3: Représentation schématique de l'implication des plateaux cartilagineux (PLC) dans la diffusion de molécules d'eau, de nutriments et d'oxygène ainsi que dans l'excrétion de déchets métaboliques au sein d'un DIV sain. 25

Figure 4: Représentation schématique de la structure de l'anneau fibreux (AF), montrant l'orientation spécifique des fibres lamellaires de collagène. 26

Figure 5: Représentation schématique de la composition cellulaire et moléculaire du noyau pulpeux (NP) au sein du DIV humain sain juvénile... 27

Figure 6: Représentation schématique de la biomécanique du DIV sain au repos et sous contrainte.. 28

Figure 7: Développement embryonnaire de la notochorde. 30

Figure 8: Différenciation des somites. 32

Figure 9: Morphogenèse embryonnaire du disque intervertébral chez les mammifères. 33

Figure 10: Développement embryonnaire du DIV de E9.5 (jour embryonnaire 9.5) à E17.5 (stade prénatal) chez l'embryon de souris. 35

Figure 11: Représentation schématique de l'activation et la transduction de la voie de signalisation Shh (Sonic Hedgehog) au sein du cil primaire. 36

Figure 12: Représentation schématique de l'évolution de l'activation de certaines voies de signalisations majeures au sein des différents composants du DIV, de la naissance à la croissance post-natale 43

Figure 13: Représentation schématique des différents gènes identifiés comme potentiels facteurs de risques de développement de la dégénérescence discale lombaire (DDL) .. 46

Figure 14: La dégénérescence discale. 48

Figure 15: Représentation schématique de la dégénérescence discale. 51

Figure 16: Classification de Modic (gauche) et classification de Pfirrmann (droite) de la dégénérescence discale basées sur l'IRM. 52

Figure 17: Arthrodèse et arthroplastie de deux DIV lombaires. 54

Figure 18: Représentation schématique du protocole de différenciation de cellules iPS (induced puripotent stem cells) humaines en cellules de type cellules notochordales embryonnaires. 60

Figure 19: Morphologie des cavéoles.. 62

Figure 20: Structure des cavéoles.. 63

Figure 21: Structure des cavéolines 63

Figure 22: Structure des protéines cavines humaines. 65

Figure 23: Représentation schématique d'une cavéole.. 67

Figure 24: Modèle de transport des protéines cavéolaires et d'assemblage des cavéoles à la membrane plasmique (PM).. 68

Figure 25: Tableau récapitulant les interactions de la CAVEOLINE1 avec les protéines de voies de signalisations cellulaires. 72

Figure 26: Réponse cellulaire au stress mécanique par désassemblage rapide et réassemblage des cavéoles à la membrane plasmique. 74

Figure 27: Rôle de EHD2 dans la réponse des cavéoles au stress mécanique..... 75

Figure 28: Représentation schématique de la voie de signalisation Hippo chez les mammifères.. 76

Figure 29: Représentation schématique du lien entre les cavéoles et la voie de signalisation Hippo.. 77

Figure 30: Proposition de l'évolution de l'expression de la CAVEOLINE1 (CAV1) dans les cancers..... 80

Figure 31: Tableau indicatif de l'expression de CAVEOLINE1 au sein d'un disque intervertébral juvénile, mature et dégénéré dans différents modèles (l'Homme, le chien, la souris et le rat). 86

Figure 32: Variation de la densité cellulaire du disque intervertébral en fonction de l'âge. .. 88

Figure 33: Représentation schématique du protocole de prélèvement des explants de notochorde d'embryons de souris à E11.5 (jour embryonnaire 11,5). 95

Figure 34: Représentation schématique du protocole de prélèvement des explants de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance).. 97

Figure 35: Impact de l'hypoxie sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de notochorde murine à E11.5 (jour embryonnaire 11,5).. 98

Figure 36: Impact de l'hypoxie sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de notochorde murine à E11.5 (jour embryonnaire 11.5) après un passage réalisé par dissociation mécanique aux aiguilles de tungstène (E11.5 P1). 99

Figure 37: Impact de l'hypoxie sur le d'explants de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance). 100

Figure 38: (A) Etude de l'expression des protéines cavéolaires en réponse à l'hypoxie. Détection des protéines cavéolaires CAVEOLINE1 (CAV1), CAVEOLINE2 (CAV2), CAVINE1 et EHD2 à partir d'explants de cellules de NP P4 (quatre jours après la naissance) cultivés en hypoxie (H) ou normoxie (N) pendant neuf jours. 101

Figure 39: Impact de l'hypoxie sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance) après un passage réalisé par dissociation mécanique aux aiguilles de tungstène(P4 P1). 102

Figure 40: Impact d'un changement de teneur en oxygène au cours de la culture sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance).. 103

Figure 41: Etude de la densité et de la morphologie des cavéoles en réponse à un changement de teneur en oxygène durant la culture de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance). 104

Figure 42: Impact d'un choc osmotique sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de NP murins à P4 (4 jours après la naissance).. 106

Figure 43: Impact d'un choc osmotique sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de notochorde murine à E11.5 (11,5 jours post-conception) et après passage (E11.5 P1). 108

Figure 44: Impact de l'inhibition de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) par la cyclopamine (inhibiteur du récepteur Smoothened) sur la croissance et le phénotype des cellules de NP murins à P4 (4 jours après la naissance) et P4 P1 (après dissociation mécanique). 110

Figure 45: Impact de l'inhibition de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) par la cyclopamine (inhibiteur du récepteur Smoothened) sur la croissance et le phénotype des cellules de notochorde murine à E11.5 (jour embryonnaire 11.5) après dissociation mécanique (E11.5 P1)..... 112

Figure 46: Impact de la suractivation de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) par le SAG (agoniste du récepteur Smoothened) sur la croissance et le phénotype des cellules de NP murins à P4 (4 jours après la naissance) et P4 P1 (après dissociation mécanique). 114

Figure 47: Impact de la suractivation de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) par le SAG (agoniste du récepteur Smoothened) sur la croissance et le phénotype des cellules de notochorde à E11.5 (jour embryonnaire 11.5) après dissociation mécanique (E11.5 P1)..... 115

Figure 48: Images de microscopie électronique à transmission (MET) de cellules de notochorde (E14.5) et de NP murins à P4 (4 jours après la naissance). 120

Figure 49: Représentation schématique du rôle des vacuoles dans la réponse mécanique des cellules notochordales matures au sein du NP. 123

Figure 50: Tableaux récapitulatifs de l'expression des protéines cavéolaires et de la densité et morphologie des cavéoles, du développement embryonnaire du DIV à la croissance post-natale et la maturation..... 132

Figure 51: Représentation schématique de l'étude in vitro de l'impact de (A) l'hypoxie et de (B) l'impact d'un choc osmotique sur les explants de cellules de notochorde à E11.5 (jour embryonnaire 11.5), E11.5 P1 (après passage) et de NP à P4 (quatre jours après la naissance) 133

Table des tableaux

Tableau 1: Identification des mutations des acteurs de la voie de signalisation Shh (Sonic Hedgehog) chez des embryons de souris et leurs conséquences sur la formation du squelette axial et du DIV. 39

Tableau 2: Marqueurs primaires proposés de cellules de NP juvéniles sains, et leur lien avec la physiologique cellulaire. (Adapté de Risbud et al. 2015). 41

Tableau 3: Identification des mutations des acteurs de la voie de signalisation Shh (Sonic Hedgehog) chez des souris et leurs conséquences sur le phénotype discal. 44

Table des matières

AVANT-PROPOS 17

CHAPITRE I : DISQUE INTERVERTÉBRAL : DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE À LA DÉGÉNÉRESCENCE 21

I Le disque intervertébral 22
I.1 Généralités 22
I.2 Anatomie, composition et fonction des composants 24
I.2.1 Les plateaux cartilagineux (PLC) 24
I.2.2 L'anneau fibreux (*Annulus Fibrosus*, AF) 25
I.2.3 Le noyau pulpeux (*Nucleus Pulposus*, NP) 26
I.3 Développement du disque intervertébral 29
I.3.1 Formation de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde chez l'embryon : E6-E8 29
I.3.2 De la notochorde au disque intervertébral : E9.0-E18.5 30
I.3.3 Influence de la signalisation Shh du développement embryonnaire à la maturation du DIV 35
I.3.4 Croissance post-natale du disque : P0-P21 40
I.3.5 Continuité d'action de la voie Shh après la naissance 43
I.3.6 Le cil primaire : rôle dépendant et/ou indépendant de la signalisation Shh au sein du DIV ? 45

II Dégénérescence discale 45
II.1 Facteurs d'influence 45
II.2 Modifications phénotypiques et mécanismes cellulaires de la dégénérescence discale . 46
II.2.1 Déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme 47
II.2.2 Disparition des CNTs : balance prolifération/apoptose affectée 48
II.2.3 Dégradation de la MEC, inflammation et néo-innervation 49
II.2.4 L'AF et les PLC : acteurs non négligeables de la dégénérescence 49
II.2.5 Sénescence/autophagie : mécanismes adaptatifs aggravant la DDL ou derniers remparts de protection ? 50
II.3 Outils de diagnostic et de qualification de la dégénérescence et traitements disponibles 52
II.3.1 Prise en charge et outils de diagnostic de la DDL 52
II.3.2 Progression de la DDL : quels traitements à disposition ? 53
II.4 Stratégies thérapeutiques innovantes pour la réparation du DIV 54
II.4.1 Thérapie génétique 55
II.4.2 Thérapie moléculaire 55
II.4.3 Thérapie cellulaire 57

CHAPITRE II : CAVÉOLES, CAVÉOLINE1 ET FONCTIONS ASSOCIÉES 61

I Composition et structure des cavéoles 62
I.1 Protéines de structure des cavéoles 63
I.1.1 Les cavéolines 63
I.1.2 Les cavines 65
I.2 Protéines accessoires 67

II Biogenèse des cavéoles 68

III Fonctions des cavéoles 69

III.1 Endocytose et transcytose cellulaire 69

III.1.1 Mécanisme et rôle de l'endocytose cavéolaire 69
III.1.2 Transcytose cavéolaire : transports de molécules 70

III.2 Homéostasie lipidique 70

III.3 Plateformes de signalisations cellulaires 71

III.3.1 Rôle majoritairement inhibiteur de CAV1 sur l'activité des voies de signalisation 72
III.3.2 Rôle activateur de CAV1 nouvellement décrit 72

III.4 Réponse aux stress cellulaires 73

III.4.1 Rôle des cavéoles dans la réponse au stress mécanique 74
III.4.2 Rôle des cavéoles dans la réponse au stress hypoxique 77

IV Principales pathologies associées à des dysfonctions cavéolaires 79

IV.1 Les cancers 79

IV.2 Les dystrophies musculaires 81

IV.3 Les lipodystrophies 81

IV.4 Pathologies liées au vieillissement 82

IV.4.1 Athérosclérose 82
IV.4.2 Arthrose 83
IV.4.3 Dégénérescence discale 84

CHAPITRE III : FONCTIONS DE LA CAVÉOLINE1 DANS LE DISQUE INTERVERTEBRAL : DU DEVELOPEMENT EMBRYONNAIRE A LA CROISSANCE POST-NATALE 87

I Rationnel de l'étude 88

II Objectifs de la thèse 89

III Résultats expérimentaux 91

III.1 Article expérimental 91

III.2 Résultats expérimentaux *in vitro* complémentaires 95

III.2.1 Etude de la réponse des cellules de notochorde et de NP à l'hypoxie 97
III.2.2 Etude de la modulation de la distribution et de l'expression de CAV1 au sein de cellules de NP en réponse à un changement de teneur en oxygène au cours de la culture 102
III.2.1 Etude de la modulation de la distribution et de l'expression de CAV1 au sein de cellules de notochorde et de NP en réponse à un choc osmotique 105
III.2.2 Etude de la modulation de la voie de signalisation Shh sur des explants de cellules de notochorde (E11.5 P1) et de NP (P4 et P4 P1) 109

CHAPITRE IV- DISCUSSION 116

I Fonction des cavéoles/cavéoline1 dans le développement et la croissance du DIV . 117

I.1 Densité cavéolaire et transformation notochorde-NP 117

I.2 Evolution de la densité et la morphologie des cavéoles : de la croissance au vieillissement 118

I.3 Absence de phénotype visible chez les souris *Cav1*$^{-/-}$ malgré la densité cavéolaire importante 119

I.4 Rôle de CAV1 dans la modulation de la capacité proliférative des cellules du NP 121

I.5 Lien entre l'activité de la voie de signalisation Shh et CAV1 ? 123

I.6 Quels éléments de réponse à l'apparition de la dégénérescence précoce en absence de *Cav1* ? 124

II Modulation *in vitro* de la densité des cavéoles à la membrane de cellules de notochorde et de NP 125

II.1 Intérêts du système de culture 3D organotypique d'explants de cellules de notochorde et de NP 125

II.2 Implications des cavéoles dans l'adaptation des cellules du NP à l'hypoxie 127

II.3 Implications des cavéoles dans l'adaptation des cellules du NP à l'osmolarité du microenvironnement 129

II.4 Effet d'une modulation de l'activité de la voie de signalisation Shh sur la distribution de CAV1 ? 130

CHAPITRE V- CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 134

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 138

ANNEXES 172

Annexe 1 : Membranes de western blot réalisés à partir des explants de cellules de NP (P4) 173

Annexe 2 : Liste des formations suivies auprès de l'école doctorale Biologie-Santé 179

Annexe 3 : Attestation de formation à l'expérimentation animale 180

AVANT-PROPOS

Le disque intervertébral : chef d'orchestre de la mobilité du rachis

La colonne vertébrale chez l'Homme est composée de 24 vertèbres et 23 disques intervertébraux (DIV), situés entre deux vertèbres. Ces DIV sont répartis comme suit en 3 régions le long du rachis : 6 DIV en région cervicale, 12 DIV en région thoracique et 5 DIV en région lombaire. Les fonctions de la colonne vertébrale sont permises par la présence du DIV, qui constitue une articulation semi-mobile. En effet, sa position antérieure à la moelle épinière permet la protection de cette dernière. Le DIV assure le maintien du squelette, de la posture et de la mobilité du rachis, tout en ayant une action d'amortissements des chocs appliqués de manière répétée sur l'ensemble du corps. Il est composé de deux plateaux cartilagineux (PLC) établissant la jonction avec les vertèbres sus et sous-jacentes, de l'anneau fibreux ou *Annulus Fibrosus* (AF) qui encercle le cœur du DIV, le noyaux pulpeux ou *Nucleus Pulposus* (NP).

La lombalgie : problème majeur de santé publique

La lombalgie est aujourd'hui considérée comme le « mal du siècle » puisque selon l'OMS (organisation mondiale de la santé), 80% de la population des pays industrialisés sera touchée au moins une fois dans sa vie par des douleurs lombaires. L'apparition de ces douleurs est expliquée dans 60% des cas par des traumatismes ou par l'existence de pathologies sous-jacentes, et dans 40% des cas par une dégénérescence du disque intervertébral. La lombalgie constitue aujourd'hui un problème de santé publique et socio-économique majeur en France puisque son coût était estimé à plus d'un milliard d'euros/an en France (rapport de l'assurance maladie, Janvier 2017).

Prise en charge de la dégénérescence discale : vers des traitements symptomatiques

La prise en charge des douleurs les moins invalidantes peut se faire grâce à des traitements pharmacologiques (antalgiques et anti-inflammatoires). La chirurgie (fusion des vertèbres, remplacement d'un disque par un implant) constitue le traitement de référence pour les douleurs sévères. Ces traitements médicamenteux ou chirurgicaux ne sont cependant que symptomatiques et ne permettent pas au patient de retrouver une bonne qualité de vie et une mobilité complète. Dans ce contexte, il existe un véritable intérêt à développer de nouvelles approches curatives, afin de contrecarrer le déclenchement de la dégénérescence discale, ou bien restaurer le tissu, une fois la pathologie dépistée.

Perte des cellules notochordales matures : point de départ de la dégénérescence discale

Cette absence de thérapie efficiente s'explique par le manque de compréhension des mécanismes biologiques qui régissent l'apparition de la dégénérescence, mais également le développement et la croissance du DIV. En effet, dès la maturité squelettique, la perte progressive d'un des deux types cellulaires du NP selon des mécanismes inconnus entraine une dérégulation de l'homéostasie discale et l'apparition de la dégénérescence. La diminution de la cellularité au sein du NP constitue aujourd'hui un frein majeur à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des études sur le modèle murin ont démontré que les deux types cellulaires du NP proviennent d'un précurseur commun qu'est la notochorde embryonnaire. Les mécanismes de transformation de la notochorde en NP ainsi que la disparition des cellules du NP à la maturité squelettique font donc aujourd'hui encore l'objet de nombreuses questions. Des recherches récentes font émerger une action possible des cavéoles dans ces processus.

Structures cavéolaires : rôle dans l'homéostasie du tissu discal ?

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique en forme d'oméga inversé présentes dans la majorité des tissus. Elles sont décrites dans la littérature comme ayant un rôle de plateformes de modulation de diverses voies de signalisation. Les cavéoles jouent également un rôle dans de nombreuses pathologies liées au vieillissement comme l'arthrose, l'athérosclérose et la dégénérescence discale. En effet, dans le modèle murin, l'apparition d'une dégénérescence précoce du DIV est observée dès l'âge de trois mois en absence du gène *Cav1* (codant pour la protéine CAVEOLINE1 structurante des cavéoles). Chez l'Homme, une augmentation du niveau d'expression protéique de CAVEOLINE1 est détectée au sein d'un NP dégénéré en comparaison à un NP sain. Ces études mettent en évidence un rôle des cavéoles/cavéolines dans le processus de dégénérescence discale, mais les mécanismes d'actions moléculaires modulés par ces structures restent encore inconnus, ainsi que leur rôle dans un disque sain.

Mécanismes de formation et croissance du DIV : clé pour de nouvelles stratégies thérapeutiques ?

Il est aujourd'hui admis qu'une meilleure connaissance de l'origine des cellules du NP, de leurs marqueurs phénotypiques ainsi que de leur comportement est essentielle à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'objectif de ce travail de thèse a ainsi été d'améliorer la

compréhension des mécanismes biologiques qui régissent le développement, la croissance et la dégénérescence du DIV. Pour cela, les fonctions des cavéoles/cavéoline-1 au sein du DIV - du développement au vieillissement - ont été explorées *in vivo,* grâce à un modèle de souris invalidées pour le gène *Cav1*, et *in vitro* grâce à un modèle d'explants de cellules de NP murins.

Ce manuscrit est divisé en quatre grands chapitres: Une premier chapitre (I) faisant un état de l'art sur l'anatomie, la fonction et la composition du disque intervertébral (Parties I.1 et I.2), son développement embryonnaire (partie I.3), la description de la dégénérescence discale (partie II.1) avec l'étude des mécanismes cellulaires impliqués (partie II.2), des outils de diagnostics et traitements actuels (partie II.3) ainsi que le détail des nouvelles stratégies thérapeutiques émergentes (partie II.4).

Un second chapitre (II) faisant l'état des connaissances sur les cavéoles avec la description de leur composition (partie I), de leur biogenèse (partie II), de leurs fonctions dans les tissus (partie III) et la présentation de principales pathologies associées à des dysfonctions cavéolaires (partie IV).

Un troisième chapitre (III) présentant le rationnel de l'étude (partie I), les objectifs du projet de thèse (partie II, les résultats expérimentaux soumis dans le journal « Frontiers in Cell and Developmental Biology » sous la forme d'un article expérimental (partie III.1) et les résultats complémentaires obtenus durant cette thèse (parties III.2 et III.3).

Les chapitres IV- Discussion et V- Conclusions générales et perspectives, permettront de synthétiser l'ensemble des travaux réalisés durant cette thèse et de proposer de nouvelles perspectives de travail pour la suite de ce projet.

CHAPITRE I : DISQUE INTERVERTÉBRAL : DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE À LA DÉGÉNÉRESCENCE

I Le disque intervertébral

I.1 Généralités

Le DIV est une entité essentielle de la fonctionnalité de la colonne vertébrale. C'est une articulation semi-mobile située entre deux corps vertébraux successifs, conférant à la colonne ses propriétés de maintien de la posture et de mobilité (Humzah and Soames 1988). Le rachis humain compte 6 DIV en région cervicale, 12 en région thoracique et 5 en région lombaire, qui occupent un tiers de la longueur totale de la colonne (Pattappa et al. 2012) (***Figure 1***).

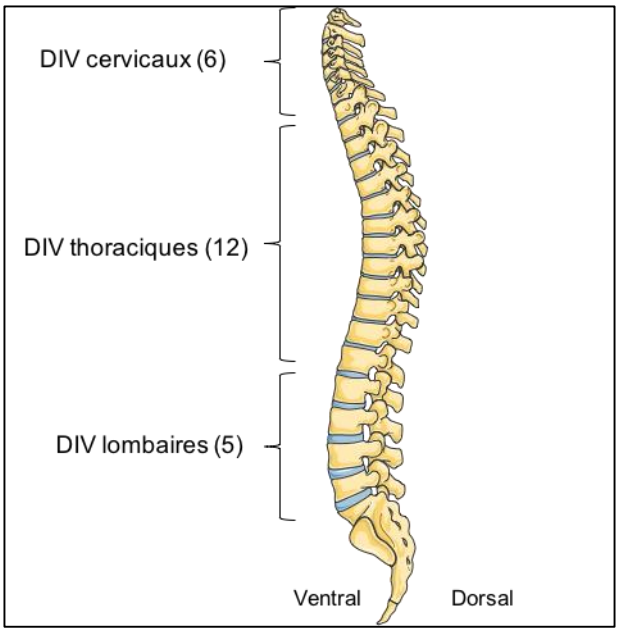


***Figure 1**: Représentation schématique de la localisation des disques intervertébraux (DIV) le long du rachis humain.*

Le DIV fourni six degrés de liberté de mouvements au rachis en réponse aux forces et déformations appliquées lors de mouvements volontaires ou perturbations extérieures, avec des mouvements de flexions, extensions, torsions ou rotations (Li et al. 2009; Hsieh and Twomey 2010). Le DIV présente un diamètre moyen de 4 cm et une épaisseur comprise entre 7 et 10 mm, en fonction de sa localisation le long de la colonne, les DIV lombaires présentant l'épaisseur la plus importante. (Urban and Roberts 2003). La forme du DIV diffère également légèrement en fonction de sa localisation puisque les DIV thoraciques sont ronds et les lombaires ovales. En revanche, quelle que soit leur localisation, leur structure reste similaire (Moore 2000). Chaque DIV est en effet constitué de trois structures essentielles : les plateaux cartilagineux (PLC), permettant la jonction avec les vertèbres sus et sous-jacentes, l'anneau

fibreux (*Annulus fibrosus*, AF) entourant le noyau pulpeux (*Nucleus pulposus*, NP) au cœur du DIV (Raj, 2008) (***Figure 2***).

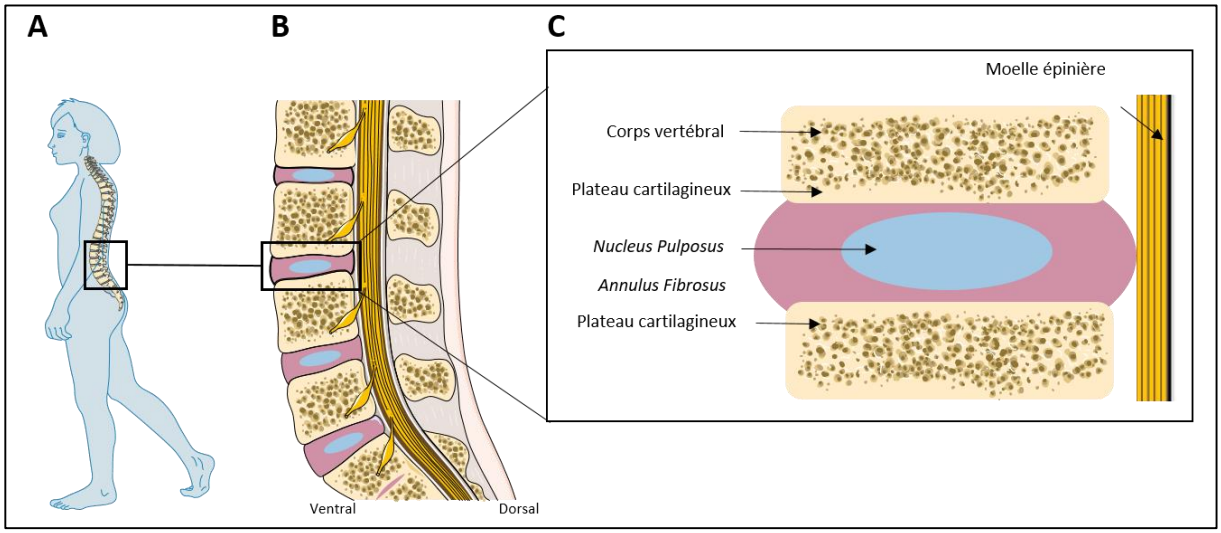


Figure 2: *Représentations schématiques de la colonne vertébrale humaine et de la structure des disques intervertébraux (DIV) la composant. (A) Colonne vertébrale humaine. (B.) Partie lombaire de la colonne vertébrale, avec isolation des DIV présents entre chaque vertèbre et situés en position ventrale par rapport à la moelle épinière. (C) Structure interne d'un DIV sain avec distinction des trois composants essentiels : les plateaux cartilagineux (PLC), l'anneau fibreux (AF) et le noyau pulpeux (NP). Adapté de la thèse de L. Frapin, 2019).*

De par sa position difficile d'accès au sein du corps humain (proche de la moelle épinière) et son microenvironnement, le DIV est considéré comme un tissu complexe. En effet ce dernier étant éloigné des vaisseaux sanguins, il est décrit comme le tissu le moins vascularisé du corps humain (Grunhagen et al. 2011; Pattappa et al. 2012). Cette infime vascularisation rend le passage d'oxygène et de nutriments difficile au sein du DIV, le définissant comme hautement hypoxique, et entraîne des adaptations cellulaires en réponse à ce microenvironnement « hostile » (Whatley and Wen 2012). Le très faible gradient de diffusion de l'oxygène au sein du NP est inversement corrélé au gradient du lactate, traduisant une utilisation majoritaire du métabolisme anaérobique par les cellules du NP (Holm et al. 1981). Ce recours restrictif à la glycolyse anaérobique engendre une acidification du milieu, présentant alors un pH inférieur au pH physiologique dans d'autres organes, compris entre 6,9 et 7,2 (Nachemson 1969). L'adaptation des cellules du DIV à ce microenvironnement hypoxique se traduit également par l'expression constitutive du facteur HIF-1α (hypoxia inducible factor-1 alpha) au sein du NP (et non de l'AF et des PLC). HIF-1α est aujourd'hui considéré comme un marqueur phénotypique des cellules du NP (Risbud et al. 2010). Il est également montré que, de manière différentielle au tissu cartilagineux, l'expression de HIF-1α est maintenue en normoxie, traduisant une adaptation de cellules du NP à ce microenvironnement unique (Risbud et al.

2006). Ajouté à l'hypoxie, les cellules du DIV doivent également s'adapter à l'osmolarité extracellulaire. En effet, plusieurs études rapportent que le DIV est hyper-osmotique en comparaison aux autres tissus, avec une pression osmotique comprise entre 430 et 500 mOSm/L dans un DIV sain et chutant à 300 mOsm/L dans un DIV dégénéré (Ishihara et al. 1997; Sadowska et al. 2018). Une étude montre que des cellules humaines de NP et d'AF cultivées dans un milieu à 500 mOsm/L présentent une augmentation du niveau d'expression de l'agrécane (ACAN) et du collagène de type II (COL2A) ainsi qu'une diminution du niveau d'expression du collagène I (COL1A) en comparaison à ces mêmes cellules cultivées dans un milieu à 400 mOsm/L (Wuertz et al. 2007). Ces données indiquent une régulation de la composition de la matrice extracellulaire (MEC) du DIV par l'osmolarité du microenvironnement.

I.2 Anatomie, composition et fonction des composants

Tous les DIV présentent la même structure et les mêmes composants essentiels : les plateaux cartilagineux, l'anneau fibreux et le noyau pulpeux. La structure et les fonctions de chaque zone du DIV est détaillée de manière distincte dans cette partie du manuscrit.

I.2.1 Les plateaux cartilagineux (PLC)

Les PLC correspondent à une fine structure (épaisseur moyenne <1 mm) permettant la jonction entre DIV et vertèbres et la distribution de la pression intra-discale (Brinckmann et al. 1976).

Les PLC dispersent les charges mécaniques sur le NP, qui les transmet en réponse de manière radiale à l'AF, qui va s'étendre afin de résister aux forces de tension (Neumann, 2010). Les PLC se composent de chondrocytes synthétisant de la MEC proche de celle du cartilage articulaire, riche en protéoglycanes (PG) et collagène de type II (Moore 2000). L'épaisseur des PLC et leur teneur en PG est plus importante dans la zone en contact avec l'AF que dans la zone en contact avec le NP (Roberts et al. 1989). Les PLC ont un rôle essentiel de diffusion des nutriments et solutés jusqu'au centre du DIV, mais également d'excrétion des déchets métaboliques, grâce à un réseau de fins vaisseaux sanguins (Urban et al. 1982) (***Figure 3***). En effet, les petites molécules telles le glucose ou le lactate diffusent à travers la MEC pour atteindre le NP, constituant un apport essentiel à la nutrition et l'homéostasie discale (Huang et al. 2014).

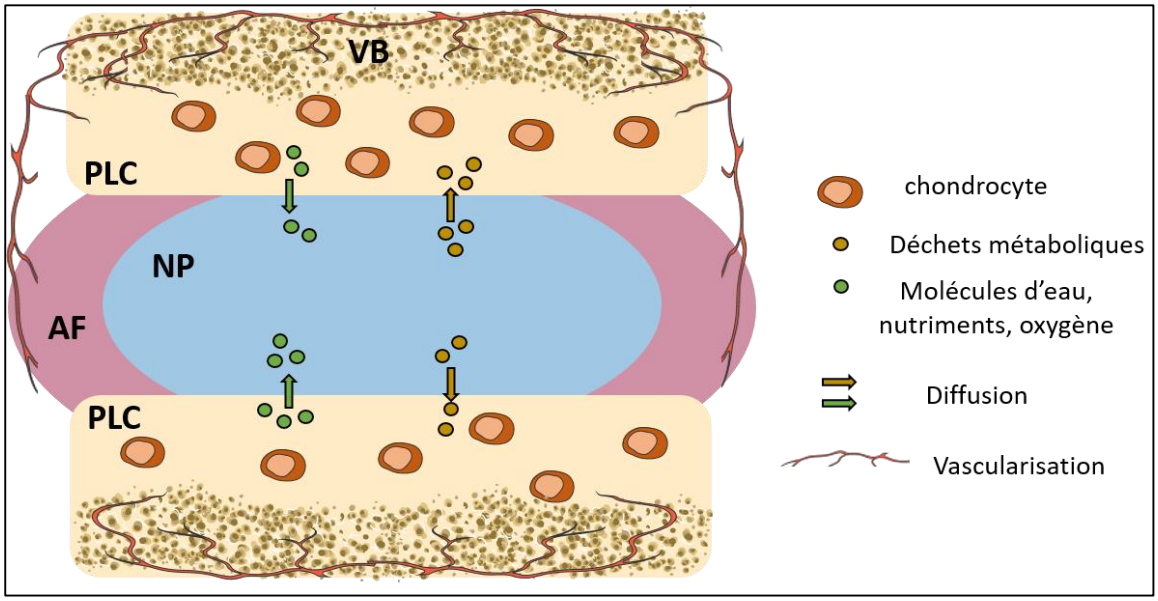


Figure 3: *Représentation schématique de l'implication des plateaux cartilagineux (PLC) dans la diffusion de molécules d'eau, de nutriments et d'oxygène ainsi que dans l'excrétion de déchets métaboliques au sein d'un DIV sain. AF : anneau fibreux ; NP : noyau pulpeux ; VB : vertèbre*

Ainsi, la perte de PG dans la MEC des PLC, entraîne une modification de l'apport en solutés jusqu'au centre du DIV, et une diminution des PG dans la MEC du NP (Roberts et al. 1996). Avec l'âge, l'expression des protéines de la MEC au sein des PLC ainsi que leur teneur en eau diminuent, déclenchant leur calcification (Bernick and Cailliet 1982; Bishop and Pearce 1993). Les mécanismes responsables de la dégradation de la composition des PLC ne sont pas encore élucidés, mais ces changements apparaissent de manière simultanée avec l'augmentation d'expression de marqueurs phénotypiques des chondrocytes hypertrophiques (Collagène X) (Aigner et al. 1998).

I.2.2 L'anneau fibreux (*Annulus Fibrosus*, AF)

L'AF est constitué d'un réseau de fibres de collagène organisées en 15 à 25 lamelles concentriques superposées les unes aux autres, en respectant une angulation précise. Les fibres d'une même couche sont ainsi alternativement orientées à ± 30° selon le respect de l'axe vertical (Cassidyet al. 1989) (***Figure 4***). Cette organisation structurale permet à l'AF de résister aux tensions et contraintes de cisaillement dues à la pression interne exercée par le NP (Raj 2008). L'AF est également caractérisé par ses deux régions distinctes : l'AF interne qui est une zone de transition entre le NP et l'AF, faiblement organisée et riche en collagène de type II, et l'AF externe qui est une zone plus rigide, plus organisée et abondante en collagène

de type I au sein de la MEC (80%), lui conférant ses propriétés de résistance (Bron et al. 2009; Johnstone et al. 1992).

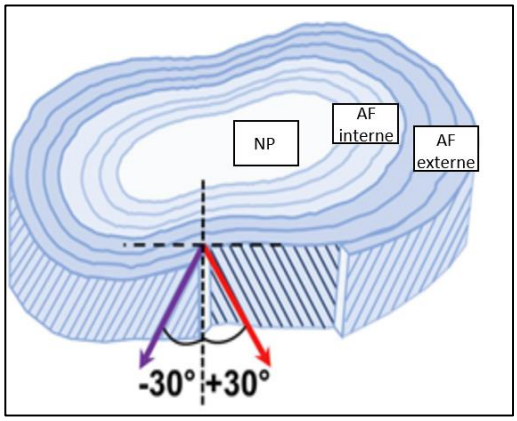


Figure 4: *Représentation schématique de la structure de l'anneau fibreux (AF), montrant l'orientation spécifique des fibres lamellaires de collagène. Les deux régions distinctes de l'AF sont indiquées ; l'AF interne, proche du NP, et l'AF externe, adjacent aux plateaux cartilagineux. (Adapté de Chong et al, 2019).*

L'AF possède une densité de 9000 cellules/mm^3. Ces cellules de type fibroblastique présentent une structure fine et allongée orientée parallèlement aux fibres de collagène (Whatley and Wen 2012). Elles sécrètent notamment des glycoprotéines telles l'agrécane, la lubricine, ou de la décorine, responsables de la lubrification, l'hydratation (60 à 70%) et la résistance aux contraintes de frottements (Tavakoli et al. 2016).

I.2.3 Le noyau pulpeux (*Nucleus Pulposus*, NP)

LE NP est localisé au centre du DIV. C'est une structure hautement hydratée (≥80% (w/w)) et présentant une faible densité cellulaire, environ 3000 cellules/mm^3 (Roberts et al. 1991). Chez l'Homme, avant la maturité squelettique (vers l'âge de 16 ans), deux populations cellulaires coexistent au sein du NP : les cellules notochordales matures (CNTs) et les nucléopulpocytes (NPcytes) (Chelberg et al. 1995) (***Figure5***). Les CNTs sont de grandes cellules rondes, possédant d'importantes vacuoles (occupant environ 80% de la surface des cellules), les distinguant des NPcytes également nommés « chondrocytes like cells » (CLCs), qui sont des cellules plus fines et allongées, possédant un phénotype proche de celui des chondrocytes articulaires (Clouet et al. 2009; Minogue et al. 2010b; Risbud et al. 2015). Cependant, les NPcytes et les chondrocytes articulaires diffèrent de par leur ratio de sécrétion de protéines matricielles tel le ratio ACAN/COL2 qui est de 27 : 1 pour les NPcytes et de 2 : 1 pour les chondrocytes articulaires (Mwale et al. 2004). Ces deux types cellulaires ont également des marqueurs phénotypiques qui les différencient comme CD24, ou OVOS2 (liste non

exhaustive), exprimés spécifiquement par les NPcytes (Risbud et al. 2015). La présence d'un dialogue cellulaire entre les CNTs et les NPcytes permet le maintien de l'intégrité matricielle et de l'homéostasie du NP (Bedore et al. 2013; Tran et al. 2013). En effet, *via* la sécrétion de facteurs tel CTGF/CCN2 (connective tissue growth factor) et Sonic Hedgehog (Shh), les CNTs favorisent la prolifération des NPcytes et leur synthèse de PG au sein de la MEC (Erwin et al. 2006; Erwin 2008). Les PG représentent 20 à 45% du poids sec du NP. Ces macromolécules sont de deux classes : les protéoglycanes agrégeant et les non agrégeant. Cette classification est réalisée selon leur capacité de liaison à l'acide hyaluronique (AH). Les PG sont constitués d'un corps protéique sur lequel sont greffés des glycosaminoglycanes (GAG) (Urban et al. 1980). La chondroïtine sulfate et le kératane sulfate sont les GAG présents au sein du NP. Grâce à un processus de sulfatation, ils deviennent chargés négativement, permettant ainsi la rétention des molécules d'eau au sein de la MEC. L'agrécane est un PG hautement synthétisé durant la croissance post-natale du NP (Cole et al. 1985; Oegema et al. 1983). Ce dernier est capable de s'associer à l'AH afin de former des agrégats de plus hauts poids moléculaires (Dudhia 2005), qui favorisent ainsi la rétention des molécules d'eau, conférant au NP à la fois sa résistance aux contraintes mécaniques, et sa capacité de déformabilité (Colombier et al. 2014) (***Figure 5***).

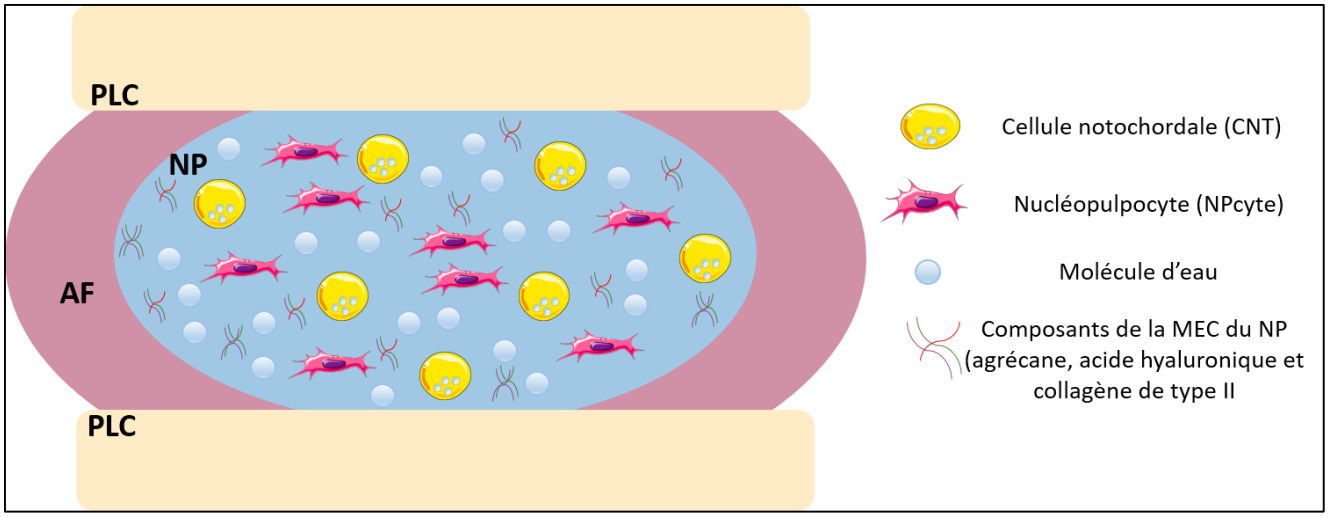


Figure 5: *Représentation schématique de la composition cellulaire et moléculaire du noyau pulpeux (NP) au sein du DIV humain sain juvénile. Au sein du NP juvénile, coexistent des cellules notochordales (CNTs) et des nucléopulpocytes (NPcytes) permettant le maintien de l'homéostasie de la MEC et de l'hydratation du NP. La rétention d'eau au sein du NP est possible grâce aux composants de la MEC tels l'agrécane, le collagène et l'acide hyaluronique. AF : anneau fibreux ; NP : noyau pulpeux ; PLC : plateaux cartilagineux (Adapté de Henry et al, 2014).*

En effet, le DIV est un amortisseur fibro-hydraulique qui répartit les chocs et contraintes mécaniques qui lui sont appliqués quotidiennement en adaptant sa forme et sa teneur en eau

(Takatalo et al. 2011). Le collagène de type II également présent au sein de la MEC, confère au NP ses propriétés de résistance grâce à sa structure en double hélice. Les fibres de collagène et les PG forment un réseau élastique permettant la répartition des charges mécaniques sur l'ensemble du DIV (Kempson et al. 1973). Cette déformabilité permet de modifier la hauteur discale lors de l'absorption des chocs de compression, par variation de la pression osmotique. La teneur en eau au sein de la MEC du NP est également modulée en fonction du rythme circadien. En effet, en position allongée, le NP se regorge d'eau (environ 25%), alors qu'en position debout et/ou en cas de contraintes prolongées, la teneur en eau diminue (Nachemson et al. 1964 ; Wilke et al. 1999) (***Figure 6***).

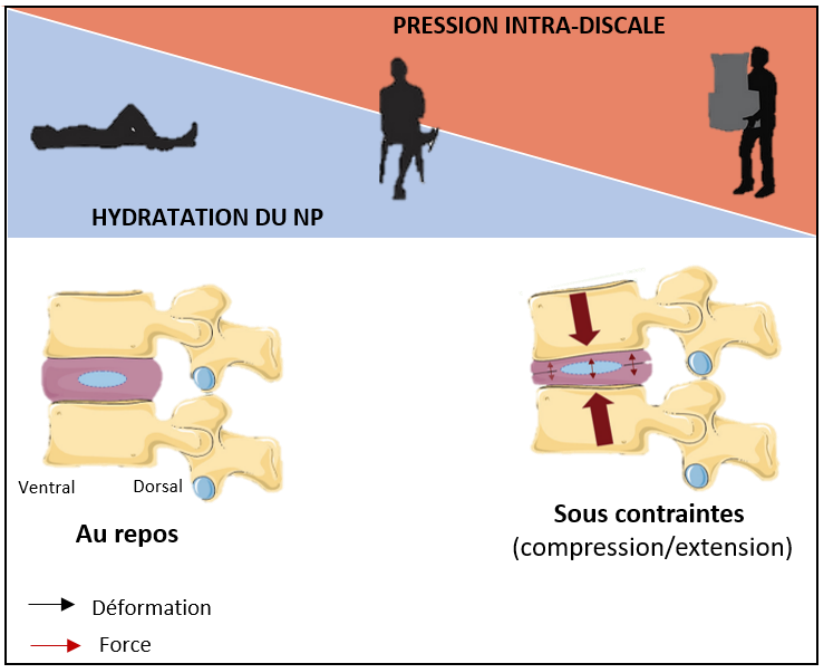


Figure 6: *Représentation schématique de la biomécanique du DIV sain au repos et sous contrainte. Le DIV est capable de se déformer pour compenser les contraintes appliquées, mais cela engendre une diminution transitoire de l'hydratation du NP et l'augmentation de la pression intra-discale. (D'après les données de Nachemson et al. 1964 et Wilke et al. 1999 ; adapté de Henry et al. 2014).*

Cette osmorégulation de la MEC du NP est possible grâce aux protéoglycanes, mais également aux vacuoles. En effet, durant un stress hypotonique, les vacuoles relarguent leur contenu dans le cytoplasme des cellules grâce à des pompes ioniques et restaurent ainsi la balance osmotique (Hunter et al. 2007). De plus, une étude propose l'hypothèse que les vacuoles seraient impliquées dans l'homéostasie du NP en activant les communications intercellulaires, le remodelage des protéines du cytosquelette et la fixation de l'AH sur son récepteur CD44, *via* la voie de signalisation YAP/TAZ (yes associated protein ; transcriptional coactivateur PDZ-binding motif) (Hong et al. 2019). L'augmentation des contraintes mécaniques inhiberait alors

ce rôle des vacuoles. Enfin, des études mettent également en évidence une implication des intégrines et des protéines du cytosquelette telles l'actine et la tubuline dans la mécanotransduction (Le Maitre et al. 2009; Li et al. 2008).

I.3 Développement du disque intervertébral

Dans cette partie seront développés les mécanismes de formation de la notochorde qui est le précurseur embryonnaire du NP mature. Ce dernier étant le tissu d'intérêt principal du projet de thèse, l'aspect développemental de l'AF est des PLC ne sera pas détaillé.

I.3.1 Formation de la ligne primitive, du nœud et de la notochorde chez l'embryon : E6-E8

La gastrulation a lieu chez l'homme lors de la troisième semaine de gestation et se définit comme l'apparition de la ligne primitive et la mise en place des trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. L'étude des premières étapes du développement embryonnaire étant difficilement réalisable chez l'Homme d'un point de vue éthique, selon l'article L.1241-5 du code de santé publique (2004), les évènements décrits dans cette partie proviennent de données obtenues chez la souris ou le poisson-zèbre.

Chez la souris, durant la gastrulation (jour embryonnaire 6.5 (E6.5)), les cellules de la périphérie du discoïde vont migrer vers son centre, créant une zone dense appelée la ligne primitive. Ce processus a été montré comme fortement dépendant de l'action du gène *Nodal* (Perea-Gomez et al. 2002). Durant le développement précoce, la ligne primitive s'allonge : la partie postérieure va donner naissance au mésoderme extra-embryonnaire, la partie médiane au mésoderme paraxial, intermédiaire et latéral et la partie antérieure génèrera le mésoderme axial. A la fin de la gastrulation (E7), l'élongation de la ligne primitive est maximale, les cellules terminent leur migration et forment alors le nœud primitif ou nœud de Hensen à l'extrémité de la ligne primitive. Le nœud primitif est considéré comme un centre organisationnel de l'embryon (Yamanaka et al. 2007). La partie dorsale du nœud conduira à la formation du plancher du tube neural et la partie ventrale formera la plaque notochordale (***Figure 7b***). Cette plaque va ensuite se détacher de l'endoderme afin de former la notochorde (E9) (***Figure 7d-e***). Les gènes responsables de la formation du mésoderme axial ont fait l'objet de nombreuses études. Une absence totale de formation du nœud primitif et du squelette

axial est observée en absence d'expression du gène *FoxA2* (*forkhead box protein A2*), mais pas du gène *T (Brachyury).* La disparition du nœud primitif conduit à une absence de latéralité (asymétrie gauche-droite), révélée par une expression de *Nodal* uniquement en partie ventrale et une position anormale de certains organes (Davidson et al. 1999 ; Lowe et al. 2001). L'invalidation seule de *T* entraîne tout de même des défauts de mise en place du nœud et de la partie caudale de la notochorde (Ang and Rossant 1994; Wilkinson et al. 1990).

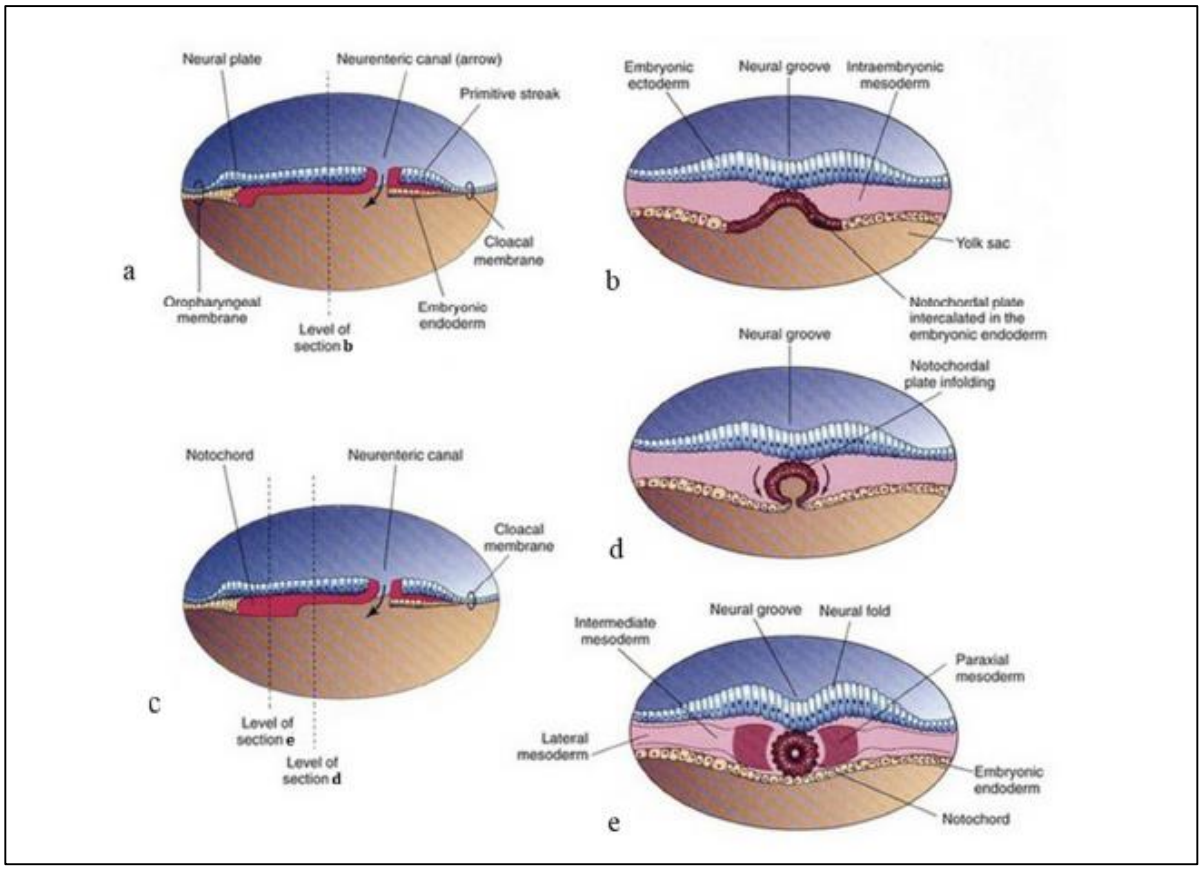


Figure 7: Développement embryonnaire de la notochorde. (a,c) Section médiane d'un embryon. (b,d et e) sections transverses dans différentes zones de l'embryon. (D'après Moore et al. 1998).

I.3.2 De la notochorde au disque intervertébral : E9.0-E18.5

I.3.2.1 E9.0 : formation de la notochorde et somitogenèse

A partir de E9.0, le nœud n'est donc plus visible et la notochorde est formée. Cette dernière est à ce stade sous forme d'une tige, étendue le long de l'axe rostro-caudal et entourée par les somites. Elle est située en position dorsale de l'embryon, avec en dessous le plancher du tube neural et au-dessus le toit du tube digestif (***Figure 10A a***). Chez la souris, l'élongation de la notochorde peut se faire grâce par des mouvements d'extensions convergentes, créant une intercalation des cellules sur la face ventrale de l'embryon. Des études mettent en évidence

que des mutations de la partie du gène *Noto* codant pour son domaine de liaison à l'ADN, entraînent un raccourcissement de la partie caudale de la notochorde, proposant ainsi pour la première fois un rôle de *Noto* dans l'élongation de la notochorde (Abdelkhalek et al. 2004). La notochorde est considérée comme une source majeure de signaux essentiels pour la formation des tissus adjacents (Stemple 2005; Yamada et al. 1993). En effet, elle va permettre le développement de l'ectoderme avec la formation du tube neural, le développement du mésoderme axial avec la formation du DIV, du cœur et du réseau vasculaire, ainsi que le développement de l'endoderme avec la formation de l'épithélium ou de organes gastro-intestinaux) (Corallo et al. 2015). Dans cette partie, sera développé le rôle de la notochorde dans la formation du mésoderme axial et du DIV.

En parallèle de la formation de la notochorde se met en place la somitogenèse à partir de la segmentation du mésoderme paraxial, dès E8. Les somites correspondent à des structures transitoires situées de part et d'autre du tube neural et de la notochorde. Ils sont à l'origine de l'organisation segmentée de l'embryon.

I.3.2.2 E10.0 : gaine péri-notochordale essentielle à l'intégrité des cellules notochordales

Dès E10.5, on voit apparaître une gaine autour de la notochorde, située alors en position centrale, appelée gaine péri-notochordale. Chez la souris, cette gaine est acellulaire et composée de protéines matricielles telles les collagènes ou l'agrécane. Une étude montre que la signalisation Shh est requise pour la formation de la gaine (Choi and Harfe 2011). En effet, une invalidation conditionnelle du gène *Smoothened* (codant pour le récepteur SMOOTHENED de Shh ; *Smo* $^{f/f}$) au sein des cellules notochordales entraîne une modification de la formation/structure de la gaine. Celle-ci est alors plus fine dans la partie rostrale, et n'est pas détectée dans la partie caudale à E11.5. Des études mettent également en évidence un rôle essentiel de la gaine dans le maintien de la notochorde et la formation du DIV. En effet, la perte de l'expression des gènes *Sox5* et *Sox6* au sein des cellules notochordales entraine une absence de formation de la gaine, associée à une diminution de l'expression génique de *Col2A1* et *Acan* (Smits and Lefebvre 2003). En accord, les souris invalidées pour le gène *Col2A1* $^{-/-}$ présentent une absence de formation de DIV (Aszódi et al. 1998).

I.3.2.3 E11.5 : différenciation des somites et segmentation du sclérotome

A E11.5 apparaît la différenciation des somites situés en position ventro-médiane en cellules du sclérotome. Le long de l'axe rostro-caudal, les somites matures sont polarisés, permettant leur séparation en un domaine dorsal et un domaine ventral (Christ and Wilting 1992). Le dermyotome (qui donnera naissance au derme et au myotome) sera formé par les cellules localisées dans le domaine dorsal des somites, et le sclérotome par les cellules localisées dans le domaine ventral (Cairns et al. 2008). Cette différenciation est guidée par l'existence d'un gradient compétitif de Shh/Wnt. En effet, un signal Shh ventral promeut la différenciation des somites en sclérotome, au contraire du signal Wnt dorsal qui promeut la différenciation en dermyotome (Cairns et al. 2008; Wagner et al. 2000) *(**Figure 8*** ; ***Figure 9A***).

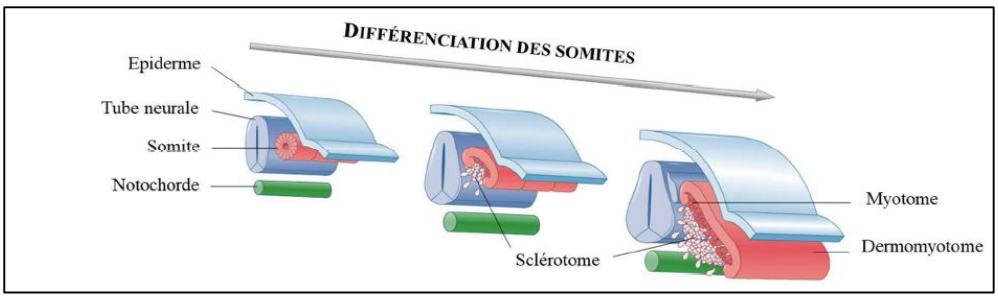


Figure 8: Différenciation des somites. Les somites de part et d'autre de la notochorde, vont se différencier en sclérotome, grâce au gradient Shh (Sonic Hedgehog) ventral, et en dermyotome, grâce à un gradient dorsal de (Adapté de Gilbert et al, 2006).

Une fois différenciées, les cellules du sclérotome expriment le gène *Pax1* (paired box 1), devenu un marqueur phénotypique de ce type cellulaire (Deutsch et al. 1988). Il a été montré que l'expression de Shh par les CNTs est suffisante pour maintenir l'expression de *Pax1* dans le sclérotome ventral (Choi et al. 2012). De manière intéressante, l'expression de *Pax1* est maintenue par les CNTs et/ou du plancher du tube neural (Wilting et al. 1995). De plus, l'expression de *Noggin* par les CNTs embryonnaires inhibe les signaux de BMP4 (bone morphogenic protein-4) participant à la différenciation de ces derniers en cellules du sclérotome médiée par *Pax1* (Stafford et al. 2011; Stafford et al. 2014).

A ce stade de développement, une segmentation du sclérotome est également visible. En effet, une alternance de zone dans lesquelles les cellules sont accumulées et des zones moins denses en cellules est observée le long de la gaine péri-notochordale. Les régions condensées en cellules du sclérotome vont être à l'origine de l'AF et les régions moins condensées constitueront les vertèbres (***Figure 9B-C ; Figure 10A b***). De manière intéressante, les cellules du sclérotome formant le futur AF expriment encore *Pax1*, au contraire des cellules formant

les vertèbres (DiPaola et al. 2005). De plus, la perte d'expression de *Pax1* dans le sclérotome conduit à une augmentation du diamètre de la notochorde et de la capacité prolifératives des CNTs, suggérant un rôle de *Pax1* dans la régulation de l'expansion de la notochorde et la formation du futur NP (Wallin et al. 1994). La signalisation TGF-β (transforming growth factor-bêta) joue également un rôle dans le processus de segmentation du sclérotome puisqu'une invalidation conditionnelle du récepteur au TGF-β2 au sein des cellules exprimant le collagène de type II, résulte en une formation incomplète du NP et de l'AF interne et une minéralisation partielle du tissu discal (Baffi et al. 2004).

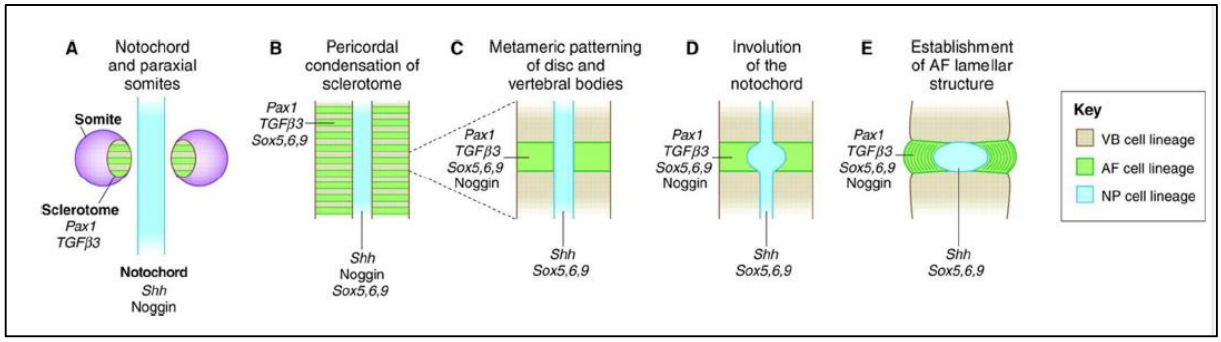


Figure 9: *Morphogenèse embryonnaire du disque intervertébral chez les mammifères. (A) Paire de somites, contenant des cellules de sclérotome, de part et d'autre de la notochorde. (B) et (C) Migration et condensation des cellules du sclérotome autout de la notochorde le long de l'axe rostro-caudal et segmentation avec apparition plus condensées (vertes) et moins condensées (brunes) qui donneront respectivement naissance au DIV et aux vertèbres. (D) Disparition de la notochorde dans les régions formant les futures vertèbtres et condensations des cellules notochordales dans les zones pormant le futur NP. (E) Etablissement des composants du DIV. (d'après Smith et al, 2011).*

I.3.2.4 E12.5 : Emergence des vacuoles au sein de la notochorde

A E12.5, on peut noter l'apparition d'un sillon au centre de la notochorde (***Figure 10A c***). Aucune donnée de la littérature ne permet à ce jour d'expliquer ce phénomène. De plus, l'expression de *FoxA2* s'éteint à partir de ce stade de développement, supposant un rôle de l'extinction de ce marqueur dans la formation du futur NP (Maier et al. 2013; Uetzmann and al. 2008).

A ce stade il est également possible d'observer l'émergence des vacuoles au sein des CNTs de manière rostro-caudale. Des études chez le poisson-zèbre montrent que le trafic post-Golgi contribue à la biogenèse et la maintenance des vacuoles (Ellis et al. 2013). De plus, la formation des vacuoles s'opère à ce stade de développement car la différenciation de somites, l'élongation de la notochorde et la formation de la gaine sont prérequis (Wang et al. 2017). Le contenu des vacuoles a fait l'objet de nombreuses interrogations. Des études histologiques dans plusieurs modèles animaux démontrent que les vacuoles présentes au sein de la

notochorde (mais aussi du NP mature) ne sont pas réfringentes et sont négatives aux colorations histologiques à l'Eosine, à l'Acide Périodique de Schiff /Bleu Alcian et Oil Red O, prouvant que leur contenu est aqueux et permettant de les distinguer de gouttelettes lipidiques (Ellis et al. 2013; Hunter et al. 2004; Hunter et al. 2007). Leur contenu en eau pourrait également faire des vacuoles un centre régulateur de l'osmolarité de la notochorde et la réponse au compressions mécaniques (Adams et al. 1990).

I.3.2.5 E13.5-E14.5 : Disparition surprenante de la notochorde dans les zones des futures vertèbres

A E13.5, la segmentation des cellules du sclérotome en zones plus ou moins condensées devient de plus en plus nette. De plus, la notochorde subit elle aussi un phénomène de segmentation, avec une régression dans la région où les sclérotomes sont moins condensés (régions qui formeront les futures vertèbres). *A contrario*, une accumulation des CNTs est visible au niveau des régions qui formeront le futur NP (Aszódi et al. 1998; Rodrigo et al. 2003; Lawson and Harfe 2017; Lefebvre 2019) (***Figure 9D ; Figure 10A d,e***). Ce phénomène impressionnant a fait émerger de nombreuses questions biologiques au sein de la communauté scientifique : cette segmentation est-elle due à une apoptose des CNTs au niveau de la zone de formation des futures vertèbres ? Ou à une prolifération plus importante dans la zone formant le NP ? Ou bien à une migration naturelle des cellules ? ou bien encore un déplacement cellulaire lié à des forces de compression ? L'hypothèse mécanistique a été la première proposée. Une étude suggère en effet qu'en réponse à des contraintes mécaniques émanent de la formation des autres tissus et organes, les CNTs pourraient se déplacer préférentiellement dans la zone du futur NP est être maintenues viables grâce à la gaine (Rufai and Ralphs 1995). Seulement, dans cette hypothèse, les mécanismes menant à la disparition de la notochorde dans la zone des futures vertèbres ne sont pas prouvés. Plus tard, il est d'ailleurs montré que la disparition des CNTs n'est pas due à une apoptose massive de ces cellules (Aszódi et al. 1998; Choi and Harfe 2011). A E14.5 la notochorde a totalement disparue de la zone des futures vertèbres. De E15.5 à la naissance, le futur DIV possède une structure identique à celle observée après la naissance avec les trois composantes que sont le NP, l'AF et les PLC *(**Figure 9E; Figure 10A f***).

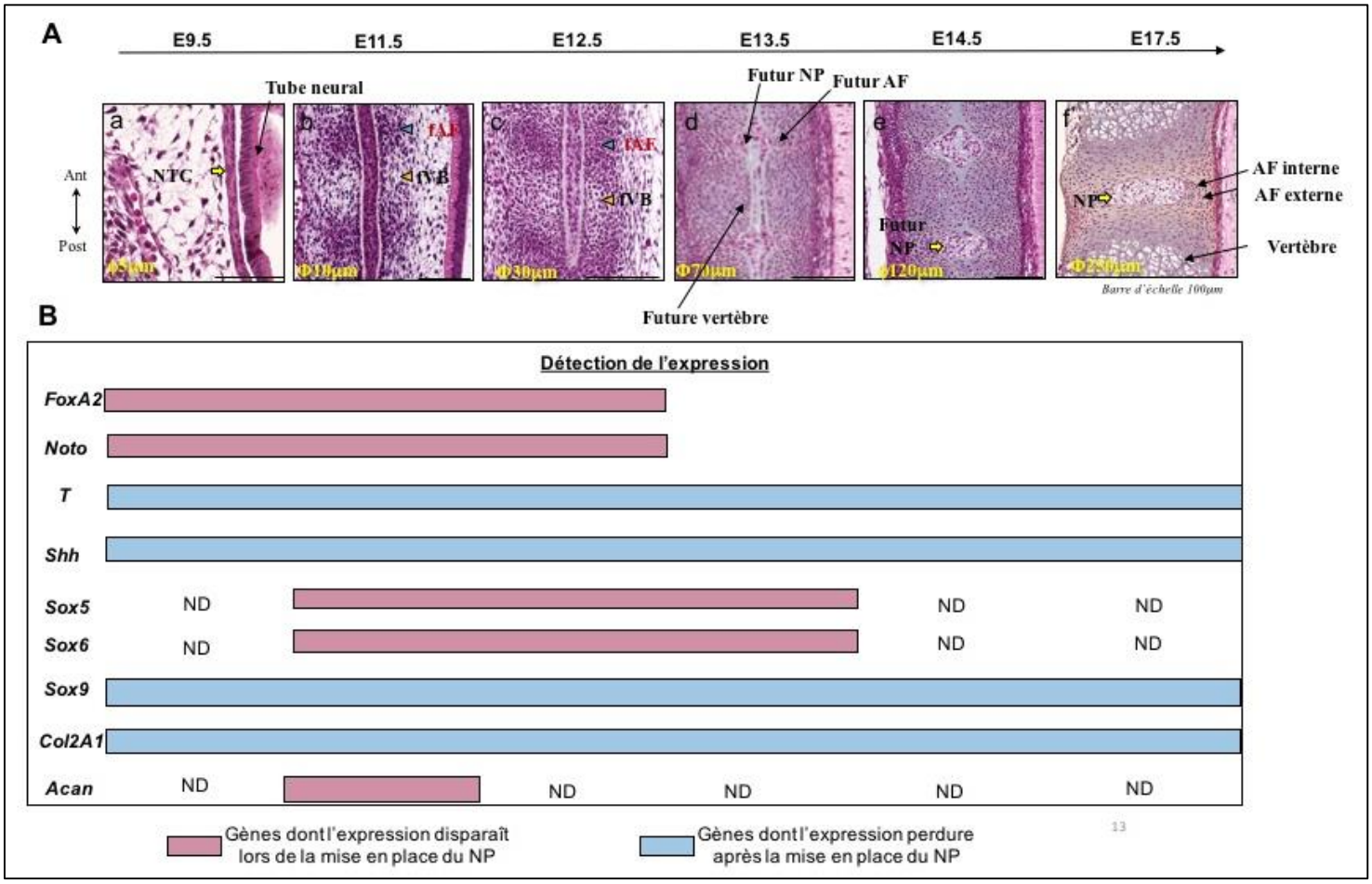


Figure 10: *Développement embryonnaire du DIV de E9.5 (jour embryonnaire 9.5) à E17.5 (stade prénatal) chez l'embryon de souris. (A) Des coupes histologiques d'embryons à E9.5, E11.5, E12.5, E13.5, E14.5 et E17.5 ont été réalisées au niveau thoracique et colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES). NTC : notochorde ; fAF : futur anneau fibreux ; fVB : future vertèbre ; NP : noyau pulpeux. Résultats non publiés de M. Dutilleul et A. Camus. (B) Evolution de l'expression des marqueurs présents durant le développement embryonnaire de E9.5 à E17.5. ND : expression non déterminée. (Adapté de la thèse de P. Colombier, 2016).*

I.3.3 Influence de la signalisation Shh du développement embryonnaire à la maturation du DIV

I.3.3.1 Généralités sur la signalisation HH et transduction de la voie de signalisation Shh

La voie de signalisation Hedgehog (HH) a pour la première fois été identifiée il y a une vingtaine d'année comme étant impliquée dans de nombreux processus durant le développement de la Drosophile (Hammerschmidt et al. 1997). Dans ce modèle animal, on retrouve uniquement l'expression du gène *Hh*. Chez les mammifères en revanche, les expressions de Sonic (*Shh*), Indian (*Ihh*) and Desert (*Dhh*) Hedgehog sont décrites. La voie Shh a un rôle dans la morphogenèse, la formation du tube neural et la différenciation des somites (Borycki et al. 1998; Ribes and Briscoe 2009). La voie Ihh régule la croissance et la différenciation des chondrocytes lors du développement du squelette endochondral (St-Jacques et al. 1999;

Vortkamp et al. 1996). Enfin, l'expression de Dhh est restreinte au sein des ovaires, des cellules de Sertoli et des testicules et est requis dans la spermatogenèse (Bitgood et al. 1996; Wijgerde et al. 2005).

Succinctement, l'activation canonique de la voie Shh, se fait par la liaison du ligand Shh sur son récepteur PTCH 1 au niveau de la membrane cellulaire. En réponse, l'effet inhibiteur de PTCH 1 sur le récepteur SMOOTHENED (SMO) est abolit, et ce dernier se transloque du pôle basal au pôle apical du cil primaire, permettant ainsi l'initiation de la cascade cellulaire. Smo régule alors la translocation des protéines de la famille des GLI (glioma associated protein family) dans le noyau, permettant la transcription de gènes cibles de la voie tels *Cyclin D*, *Cyclin E* ou *Myc*, *Noggin* et *Wnt* (***Figure 11***). *Ptch 1* et *Gli1* (glioma associated oncogene homolog 1) sont également des gènes cibles de la voie, permettant respectivement une boucle de régulation négative et positive de l'activité de la voie. Il est aujourd'hui admis que *Gli1* a toujours un rôle d'activateur transcriptomique, alors que *Gli2* et *Gli3* peuvent être activateurs ou répresseurs.

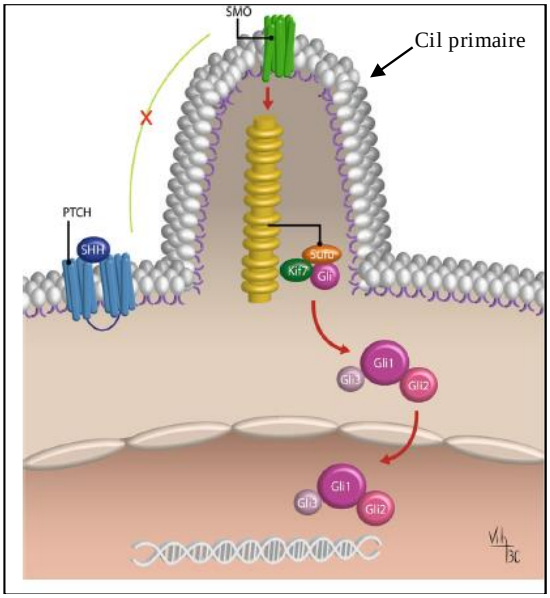


Figure 11: *Représentation schématique de l'activation et la transduction de la voie de signalisation Shh (Sonic Hedgehog) au sein du cil primaire. La fixation du ligand SHH sur son récepteur PTCH 1 abolie l'inhibition de Smo par PTCH 1 et permet ainsi l'activation de la voie. SMO est alors transloqué du pôle basal du cil primaire, au pôle apical, entrainant la translocation nucléaire des protéines de la famille des GLI, afin d'activer l'expression de gènes cibles. PTCH: PATCHED 1; SMO: SMOOTHENED; GLI: GLIOMA ASSOCIATED PROTEIN FAMILY. (Adapté de Carballo et al, 2018).*

I.3.3.2 Rôles de la signalisation Shh dans le développement embryonnaire du squelette axial et du DIV

La voie de signalisation Shh est présente très précocement durant le développement embryonnaire. En effet, les gènes *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* sont exprimés chez la souris durant la gastrulation et la neurulation (Hui 1994; Lee et al. 1997; Sasaki et al. 1997). De plus, l'expression de Shh est retrouvée au sein du nœud primitif. Une étude de traçage cellulaire montre que les cellules du nœud exprimant *Shh* sont également retrouvées au sein de la notochorde (mais pas du tube neural) (Jeong and Epstein 2003).

Le rôle de la signalisation Shh dans le développement embryonnaire a été mis en évidence par l'étude de Chiang et son équipe en 1996 (Chiang et al. 1996). Les souris invalidées pour le gène *Shh* présentent des défauts morphologiques dès E8.5, avec une absence de séparation des globes oculaires (cyclopie), une absence de formation du tube neural, des retards de croissance (E15.5), des malformations cardiaques, pulmonaires et intestinales (E18.5) ainsi qu'une réduction du volume du cerveau. De plus, des invalidations dans tous les tissus de *Smo* et *Ptch 1* entraînent une mort embryonnaire (Goodrich et al. 1997). De manière intéressante, des défauts du squelette axial sont également observés chez les souris $Shh^{-/-}$. En effet, à E9.5, l'expression de *T* au sein de la notochorde est totalement perdue, et la disparition de la notochorde est observée, montrant le rôle de la voie Shh dans le maintien de la notochorde (Chiang et al. 1996). L'analyse du rôle de Shh dans le développement embryonnaire reste cependant difficile, notamment car son expression est retrouvée au sein de la notochorde mais aussi du tube neural, et parce que son expression est maintenue dans le temps. Il était donc essentiel de pouvoir comprendre la relation entre les différents flux de Shh et la formation du squelette axial. Des études montrent tout d'abord que l'expression de Shh au sein de la notochorde est requise pour la formation du tube neural (Fan and Tessier-Lavigne 1994; Johnson et al. 1994). L'absence de formation du tube neural observée chez les embryons $Shh^{-/-}$ serait donc une conséquence de la perte de la notochorde (Chiang et al. 1996). Pour aller plus loin, une invalidation conditionnelle de *Smo* au sein de la notochorde et du tube neural à E8.5 et E9.5 (*Smo* $^{f/f}$; *Shhgfpcre)* conduit à la formation d'une gaine péri-notochordale plus fine (et presque non détectable en partie caudale) ainsi qu'à une diminution de la capacité proliférative des CNTs à E11.5 (Choi and Harfe 2011). De plus, à E14.5, les CNTs sont encore détectées au sein de la zone formant la vertèbre, contrairement aux embryons WT. La formation du NP reste cependant possible, mais sa taille est fortement

diminuée à la naissance et une dispersion des cellules est observée. L'AF est également capable de se former mais il ne semble pas contenir de fibres de collagène de type I orientées. De manière intéressante, une invalidation conditionnelle de *Shh* après la formation de la gaine (*Shh^{f}/ShhcreERT^{2}*) n'affecte pas la formation du NP (Choi and Harfe 2011). Ces résultats indiquent une action temporelle de la signalisation Shh, qui est requise pour le maintien de la notochorde, la formation de la gaine péri-notochordale et donc la formation du DIV. Ces études ne permettent en revanche pas de distinguer les rôles distincts des flux Shh émanant de la notochorde et du tube neural. Dans une étude publiée en 2012, des invalidations conditionnelles de Shh sont effectuées au sein de la notochorde et du tube neural (*Shh^{f}/ShhcreERT^{2}*), et uniquement au sein du tube neural (*Shh$^{f/f}$/FoxA2creERT^{2}*) (Choi et al. 2012). Dans les deux tissus, une invalidation à E7.5 entraîne une absence totale de formation de colonne vertébrale alors qu'une invalidation à E9.5 entraîne de sévères malformations de la colonne. En revanche, une invalidation à E9.5 uniquement dans le tube neural ne conduit pas à un phénotype visible. Ces données indiquent que l'expression de Shh par la notochorde est suffisante pour la formation du DIV.

Comme évoqué précédemment, la signalisation Shh est nécessaire à la formation du sclérotome, en maintenant l'expression de *Pax1*. Cependant, une étude met tout de même en évidence une compensation du tube neural en absence de la notochorde (Ando et al. 2011). Ainsi, les auteurs avancent que la perte de la notochorde à E10.5 n'affecte ni la formation du squelette axial, ni l'expression de *Pax1* par les cellules du sclérotome.

Pour conclure, l'ensemble des études portant sur la formation et la maintenance de la notochorde a permis d'établir une signature moléculaire précise de la notochorde tout au long du développement et d'identifier des gènes essentiels pour la formation du DIV. L'utilisation d'outils de traçage de lignages cellulaires et de mutations conditionnelles de gènes d'intérêt ont permis de mettre en évidence un rôle crucial de la voie de signalisation Shh dans ces processus (***Tableau 1***).

Tableau 1: *Identification des mutations des acteurs de la voie de signalisation Shh (Sonic Hedgehog) chez des embryons de souris et leurs conséquences sur la formation du squelette axial et du DIV. Smo : Smootened ; Ptch 1 : Patched 1 ; Gli : glioma-associated protein.*

Mutation	Stade induction	Phénotype	Stade d'apparition du phénotype du stade observé	Références
Shh $^{-/-}$	/	Perte d'expression de T dans la partie rostrale Pas de formation de vertèbre	E8.5-E9.5 E18.5	*Chiang et al. 1996*
Ptc1 $^{-/-}$	/	Létalité embryonnaire Ventralisation du tube neural	E9.5-E10.5 E8.5	*Goodrich et al. 1997*
Smo $^{-/-}$	/	Létalité embryonnaire (Défaut de la fonction cardiaque) Notochorde formée	E9.5	*Zhang et al. 2001*
Shh$^{f/f}$*/ShhcreERT*^{2}	E7.5 E9.5	Absence de formation de la colonne vertébrale Sévères malformations de la colonne	E18.5	*Choi et al. 2012*
Shh$^{f/f}$*/FoxA2creERT*^{2}	E7.5 E9.5	Absence de formation de la colonne vertébrale Formation normale de la colonne	E18.5	
Gli2 $^{zfd/zfd}$	/	Notochorde formée Défaut d'induction du plancher du tube neural	E12.5 et E14.5	*Ding et al. 1998*
Gli1 $^{zfd/zfd}$	/	/	ND	*Park et al. 2000*
Gli1 $^{zfd/zfd}$ *;Gli2* $^{zfd+}$	/	Absence de régression de la notochorde mort à la naissance non élucidée mais surement due à un défaut de structure de l'intestin	E12.5 et E14.5	

I.3.3.3 Le cil primaire : rôle dépendant et/ou indépendant de la signalisation Shh dans le développement embryonnaire ?

Le cil primaire joue un rôle dans de nombreux processus développementaux et un grand nombre de ciliopathies associées sont retrouvées aujourd'hui dans la littérature (Andreu-Cervera et al. 2021; Goetz and Anderson 2010; Norris and Grimes 2012; Schwartz and Hildebrandt 2011 ; Willaredt et al. 2013) Le cil est une protrusion de la membrane plasmique, composée d'un axonème (neuf doublets de microtubules) et d'un corps basal (centriole). Il est essentiel à la transduction de l'activité Shh dans de nombreux types cellulaires puisque les composants clés de la voie de signalisation sont enrichis au sein du cil (Fort and Bastin 2014; Huangfu and Anderson 2005; Goetz and Anderson 2010) De plus, des mutations de gènes codants pour des protéines dans le transport intra-ciliaire (protéines IFT ; intreflagellar transport protein), entraînent un phénotype similaire à celui observé en absence de ligand Shh (Huangfu and Anderson 2005). De manière intéressante, des mutations de protéines ciliaires chez l'Homme ou dans des modèles animaux sont associées à un phénotype de scoliose (Oliazadeh et al. 2017). Cependant, une majorité des cellules de l'embryon murin présentent des cils primaires, mais un nombre relativement faible d'entre elles sont capables de répondre au ligand Shh, indiquant que d'autres voies de signalisations impliquées dans le développement embryonnaire pourraient également déprendre du cil primaire. Des études rapportent qu'une invalidation *in vitro* de protéines ciliaires au sein de cellules embryonnaires

murines ou des embryons de poisson-zèbre augmente l'activation de la voie Wnt canonique et perturbe des processus dépendants de la voie Wnt non canonique (Corbit et al. 2005; Gerdes et al. 2007; Goetz and Anderson 2010). Le lien entre le cil primaire et la voie Wnt reste cependant controversé car les souris *Ift*$^{-/-}$ ne présentent pas de phénotype caractéristique des mutants de la voie Wnt (Goetz and Anderson 2010). Enfin, le cil primaire est capable de sentir les forces mécaniques mais aussi d'en générer (cil motile). L'étude du cil primaire pourrait ainsi permettre d'augmenter les connaissances quant à la mécano-biologie qui influerait le développement embryonnaire (Ishikawa and Marshall 2014).

I.3.4 Croissance post-natale du disque : P0-P21

I.3.4.1 CNTs matures : population cellulaire principale du NP durant les premières étapes de croissance

A la naissance, le DIV a déjà l'apparence phénotypique d'un disque mature. Chez la souris, la croissance du DIV s'étend jusqu'à 9 semaines, avec un maximum de croissance entre 2 et 4 semaines. Durant cette période, le NP subit d'importantes modifications, en comparaison à l'AF ou aux PLC (Dahia et al. 2012). Durant les premières étapes de croissance, les cellules du NP sont en grande majorité des CNTs dites matures et étant des vestiges des CNTs embryonnaires. Ces CNTs présentent un diamètre allant de 15 à 85 µm et de nombreuses vacuoles occupant environ 80% de leur volume. Les CNTs sont décrites comme ayant un appareil de Golgi fortement délimité, un réticulum endoplasmique (RE) imposant ainsi que des mitochondries « immatures » (Risbud et al. 2010). Différentes études ont permis l'établissement d'un consensus concernant marqueurs phénotypiques des CNTs au sein d'un NP juvénile sain qui sont répertoriés dans le tableau 2 (***Tableau 2***) (Minogue et al. 2010b; Richardson et al. 2017; Risbud et al. 2015). La persistance des CNTs au sein du NP est différente selon les espèces de mammifères. Chez la souris, le rat, le cochon et le chien, les CNTs matures sont en effet retrouvées au sein du NP après la maturation squelettique (Hunter et al. 2004). En revanche, les CNTs disparaissent durant les premières années de la vie chez le mouton, le bovin et l'Homme (maturité squelette aux alentours des 16 ans).

Tableau 2: *Marqueurs primaires proposés de cellules de NP juvéniles sains, et leur lien avec la physiologique cellulaire. (Adapté de Risbud et al. 2015).*

Marqueur phénotypique identifié	Lien avec la physiologie du NP	Espèces	Méthode
HIF-1/2 alpha	Nécessaire pour la survie des cellules du NP après la naissance	Homme Souris Rat brebis	Western Blot, IF, IHC, qPCR
GLUT-1	Transporteur du glucose exprimé dans les tissus hypoxiques. Expression contrôlée par HIF-1 alpha	Homme Rat	Western Blot, IHC, qPCR
Shh	Ligand nécessaire à la fonction post-natale des cellules du NP	Homme Souris Chien bovins	Western Blot, IF, hybridation *in situ*
Brachyury (*T*)	Facteur de transcription nécessaire pour la morphogenèse de la notochorde	Homme + autres	Western Blot, IHC, hybridation in situ, microarray, qPCR, cytométrie en flux
Agrécane/collagène de type II ratio >20	Teneur en PG élevée permettant l'hydratation du DIV pour la résistance aux compressions mécaniques	Humain Souris	Western Blot, IHC, qPCR
Anhydrase carbonique 3/12	Modulation de la balance acide/base	Homme Souris	Western Blot, IHC, qPCR, microarray
CD24	Non connue	Homme Souris Rat	IHC, qPCR, cytométrie en flux, microarray
Cytokératines-8,-18 et -19	Intégrité structurelle cellulaire	Homme Rat Bovins chien	IHC, microarray

I.3.4.2 Apparition des NPcytes : différenciation des CNTs ?

Parallèlement à la disparition des CNTs matures au cours de la croissance, l'apparition des NPcytes intervient. Des études de suivi de lignage cellulaire chez la souris, mettent en évidence que les deux populations cellulaires du NP sont issues d'un précurseur embryonnaire commun qu'est la notochorde (Choi and Cohn 2008; McCann et al. 2012). En revanche, aucune étude n'a encore montré formellement que les CNTs matures donnent naissance aux NPcytes par un processus de différenciation. Certaines hypothèses sont tout de même émises quant aux propriétés progénitrices des CNTs. En effet, une étude sur des NP humains de patients âgés de 18 à 26 ans, montre que les cellules du NP expriment les marqueurs de surface CD24 et TIE2 (tyrosine kinase endothéliale-2 ; marqueur des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) (Arai et al. 2004; Sakai et al. 2012). De plus, une transplantation de cellules $CD24^{+}$-$TIE2^{+}$ au sein de NP dégénérés de souris immunodéficientes permet une augmentation de la

synthèse du collagène de type II, indiquant la capacité de ces cellules à s'intégrer au tissu. Afin d'apporter des éléments de réponses supplémentaires, une étude réalisée chez les chiens non-chondrodystrophiques âgés de 8 mois (après la maturité squelettique) rapporte que seulement 1% des CNTs matures sont capables de se différencier en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes (Erwin et al. 2013). Par ailleurs, cette population cellulaire exprime des marqueurs de CSMs tels *Nestin* ou *CD133,* mais n'exprime pas *T*, marqueur phénotypique des CNTs. Ces données laissent à penser que ces cellules multipotentes présentes au sein du NP dériveraient de CNTs n'ayant pas maintenu l'expression de *T*. Enfin, la possible différenciation des CNTs en NPcytes a été étudié chez le cochon. L'application *ex vivo* de pressions mécaniques sur des NP juvéniles composés majoritairement de CNTs, conduit à l'apparition d'un deuxième type cellulaire montrant un phénotype similaire à celui des NPcytes (Purmessur et al. 2013). Cependant, l'étude n'investigue pas la caractérisation moléculaire de ces cellules. Grâce à l'ensemble de ces données, il est aujourd'hui proposé que les CNTs matures seraient capables de se différencier en NPcytes, pouvant sécréter de la MEC enrichie en PG et collagènes sous l'effet de contraintes mécaniques. Une étude démontre d'ailleurs que le dialogue entre les CNTs et les NPcytes a lieu grâce à la sécrétion de différents facteurs tel CFTG/CCN2 ou *via* des voies de signalisation activées dès la naissance au sein du NP telles Shh, TGF-ß et Wnt/ß-CATENINE (Dahia et al. 2009a) (***Figure 12***).

I.3.4.3 Implication des voies de signalisation TGF-ß et Wnt/ß-CATENINE

Les cellules du NP en croissance sont capables de sécréter du TGF-ß, mais la source de cellules qui en est à l'origine, CNTs ou NPcytes, n'est pas encore totalement identifiée. La littérature indique que l'activation de la voie TGF-ß entraîne une augmentation de l'expression de CTGF/CCN2 (Nerlich et al. 2005; Tran et al. 2013). De études montrent également que les cellules de NP juvénile expriment le CTGF et qu'une injection de CTGF dans le NP de chiens chondrodystrophiques permet l'augmentation du niveau d'expression de ACAN au sein de la MEC (Erwin et al. 2006; Erwin 2008). La transduction de la voie du CTGF décrite dans d'autres types cellulaires, permet d'émettre l'hypothèse que l'activation de la voie par la fixation de CTGF sur son récepteur, entraînerait la translocation du CTGF dans le noyau et ainsi l'activation de gènes cibles tels *Col2a1* et *Acan* au sein du NP (Gao and Brigstock 2003; Gao and Brigstock 2004).

L'activité de la voie Wnt/ß-CATENINE (voie canonique) est également détectée durant la croissance post-natale du DIV (Dahia et al. 2009a) (***Figure 12***). Dans le modèle murin, l'activité de la voie Wnt est présente uniquement au sein de l'AF et des PLC au stade prénatal E18.5 (Kondo et al. 2011). En revanche durant la croissance post-natale (P10), la voie est également fortement active dans le NP. De plus, dans le modèle canin, le gène *Axin2* (gène cible de la voie Wnt) est fortement exprimé au sein de NP riches en CNTs ou NPcytes, suggérant une activation de la voie Wnt possible par les deux types cellulaires (Smolders et al. 2012).

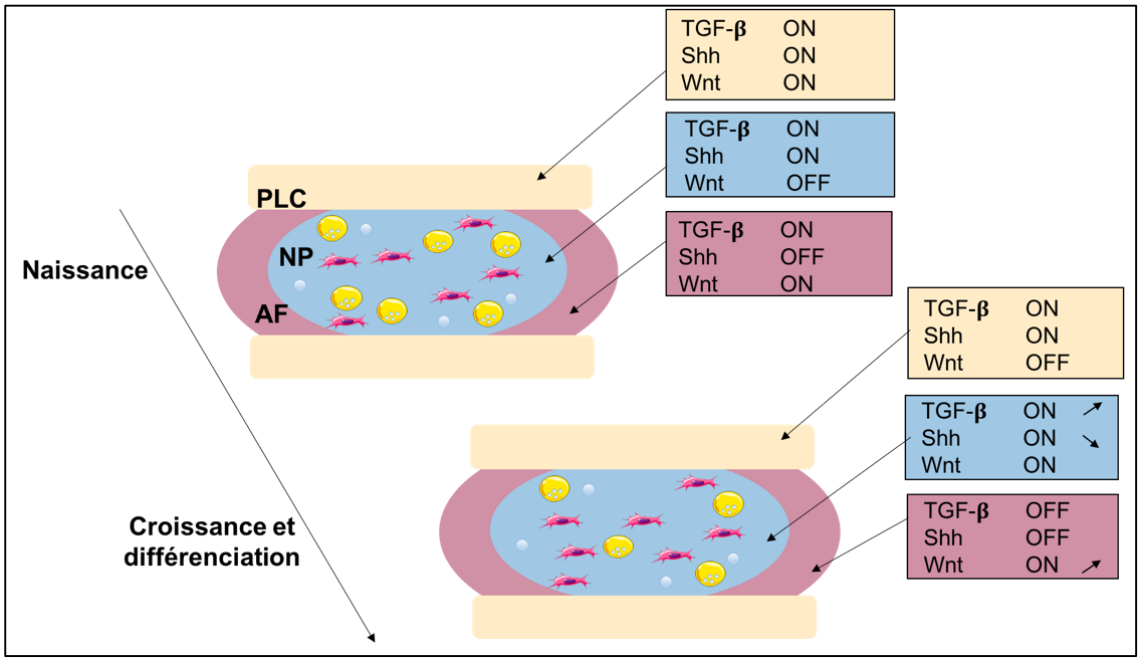


Figure 12: *Représentation schématique de l'évolution de l'activation de certaines voies de signalisations majeures au sein des différents composants du DIV, de la naissance à la croissance post-natale. NP : noyau pulpeux ; AF : anneau fibreux ; PLC : plateau cartilagineux ; Shh : Sonic Hedgehog ; TGF-ß : transforming growth factor beta. Flèche vers le haut : augmentation du niveau d'activité de la voie ; flèche vers le bas : diminution de l'activité de la voie. (Adapté de Dahia et al, 2009a).*

I.3.5 Continuité d'action de la voie Shh après la naissance

L'activité de la voie de signalisation Shh est retrouvée dès la naissance et jusqu'à 48 semaines au sein de NP murins situés en régions thoracique et lombaire (Dahia et al. 2009a). Malgré tout, le niveau d'expression de Shh au sein du NP est plus faible à P0 (jour de la naissance) qu'au sein des CNTs embryonnaires à E12.5 (Peck et al. 2017) et diminue avec la croissance et la maturation (***Figure 12***). De plus, une perte physiologique du ligand Shh au sein de NP situés dans la région du sacrum est observée après la naissance et entraîne une collapse des cellules discales (Bonavita et al. 2018). Une réactivation de la voie Shh est suffisante pour restaurer le phénotype discal (***Tableau 3***). Le NP est considéré comme la source majoritaire de Shh au sein

du DIV. Les cellules du NP sont également capable de répondre de manière directe au ligand Shh, tout comme les cellules des PLC mais contrairement aux cellules de l'AF qui n'expriment pas le récepteur PTCH 1 (Dahia et al. 2009a). Une inhibition de l'activité de la voie SHH *in vitro* et *in vivo* au sein du NP juvénile à P4 (quatre jours après la naissance) par la cyclopamine (inhibition de SMO) entraîne une collapse concomitante avec une perte des marqueurs de différenciation des cellules du NP (*T* et *Sox9*) (Dahia et al. 2012) (***Tableau 3***). Une diminution des marqueurs phénotypiques des cellules des PLC et de l'AF ainsi qu'une perte de l'orientation des fibres de collagène de l'AF sont observées, traduisant une action indirecte de Shh, par le contrôle d'autres voies de signalisation.

Tableau 3: *Identification des mutations des acteurs de la voie de signalisation Shh (Sonic Hedgehog) chez des souris et leurs conséquences sur le phénotype discal. Smo : Smoohtened ; CK19 : cytokératine 19 ; P4 : 4 jours après la naissance.*

Mutation	Stade induction	Phénotype	Stade d'apparition du phénotype du stade observé	Références
Inhibition pharmacologique de Smoothened (cyclopamine)	P4	Collapse des cellules du NP Perte des marqueurs phénotypiques (*Sox9, T*) Diminution de la prolifération	P5	*Dahia et al. 2012*
$CK19^{CreERT2/+};R26^{LSL\text{-}SmoM2\text{-}YFP/LSL\text{-}SmoM2\text{-}YFP}$	12 semaines	Augmentation de la taille du disque, augmentation de l'aire du NP, augmentation du nombre de cellules du NP, diminution du nombre de cellules en apoptose	14,5 semaines	*Bonavita et al. 2018*

Enfin, il est admis que la sécrétion de Shh par les CNTs permet la prolifération des NPcytes durant la croissance post-natale (Dahia et al. 2012). Seulement, le cycle cellulaire peut également être sous le contrôle de la voie Wnt (Kondo et al. 2011). De manière intéressante, des études mettent en évidence une interaction entre les voies Shh et Wnt. En effet, l'absence de Shh dans les cellules du NP entraîne une augmentation de Wnt alors qu'une absence de Wnt conduit à une diminution de l'expression de PTCH 1 et GLI mais pas de Shh (Winkler et al. 2014). Enfin, une réexpression de Shh est observée au sein des cellules du NP de souris âgées de 1 an. Cette réactivation tardive est induite par la voie Wnt/β-CATENINE et entraîne une augmentation de la synthèse de collagène de type I au sein de la MEC du NP, suggérant un rôle de cette voie dans l'apparition de la fibrose du NP (Dahia et al. 2009a; Winkler et al. 2014). Ces données traduisent un phénomène de boucles de rétrocontrôles entre ces deux signalisations au sein du NP. L'étude des mécanismes liant ces deux voies encore méconnus semble donc nécessaire pour augmenter les connaissances des mécanismes régissant la croissance discale.

I.3.6 Le cil primaire : rôle dépendant et/ou indépendant de la signalisation Shh au sein du DIV ?

La présence du cil primaire est montrée au sein des cellules du NP et de l'AF et une diminution de la taille du cil est corrélée avec l'apparition de la dégénérescence (Li et al. 2020). Zheng et son équipe montre qu'au sein des cellules du NP, le cil primaire agit comme un senseur du stress mécanique et qu'en réponse à ce stress, ce dernier permet l'activation de la signalisation de l'hormone PTH (hormone parathyroïdienne), participant au maintien de l'homéostasie discale *via* la réactivation de la signalisation TGF-β (Zheng et al. 2018). De manière intéressante, une invalidation sélective du gène codant pour la protéine IFT80 (requise pour la formation et la fonctionnalité du cil) au sein de cellules du DIV exprimant le collagène de type II induit une perte totale des cils dans les PLC, une diminution de la taille des PLC et de l'AF interne et une modification de la MEC du NP (Li et al. 2020). En revanche, cette même invalidation au sein de cellules exprimant le collagène de type I entraîne une diminution de la taille de l'AF externe et un désalignement des fibres de collagène. Enfin, la perte du cil entraîne une apparition massive de l'apoptose ainsi que la perte de marqueurs phénotypiques des cellules de types chondrogéniques du DIV (*Sox9*, *Acan*, *Col2*, *Gli1* et *Ptch 1*). L'ensemble de ces données traduit un rôle important du cil primaire dans le maintien de l'organisation structurale du DIV et dans la survie cellulaire, et suggère que la réponse du cil aux contraintes mécaniques entraine une modulation de la voie de signalisation Shh.

II Dégénérescence discale

II.1 Facteurs d'influence

Comme mentionné précédemment, on estime aujourd'hui que 40% des douleurs lombaires chroniques ont pour origine la dégénérescence discale lombaire (DDL). Ces lombalgies sont alors définies comme discogéniques (Andersson 1999; Borenstein 2013). La lombalgie a néanmoins une origine multifactorielle, avec des composantes génétiques, biomécaniques ou environnementales (Andersson 1999).

Tout d'abord, le polymorphisme génétique joue un rôle non négligeable dans l'apparition de la DDL puisqu'une revue de la littérature publiée en 2013 fait état d'une vingtaine de gènes identifiés comme potentiels facteurs de risque (Mayer et al. 2013) (***Figure 13***). Par exemple,

l'association entre le polymorphisme du récepteur à la vitamine D (VDR) et l'apparition de la dégénérescence discale est proposée, du fait du rôle de la vitamine D dans la régulation de l'homéostasie calcique, la minéralisation et le remodelage osseux (Videman et al. 1998). La fréquence d'apparition de la DDL est plus faible chez les femmes jusqu'à la ménopause, du au rôle protecteur des œstrogènes (Jin et al. 2020 ; Wang 2017). La prévalence de la DDL peut être augmentée par de nombreux facteurs environnementaux tels le tabagisme, la catégorie socio-professionnelle ou la sédentarité (Elmasry et al. 2015). L'apparition de certaines maladies métaboliques telles l'obésité, le diabète, l'athérosclérose ou encore des troubles hormonaux constitue également un facteur de risque du développement de la DDL (Ain et al. 2012; Kauppila 2009; Russo et al. 2019).

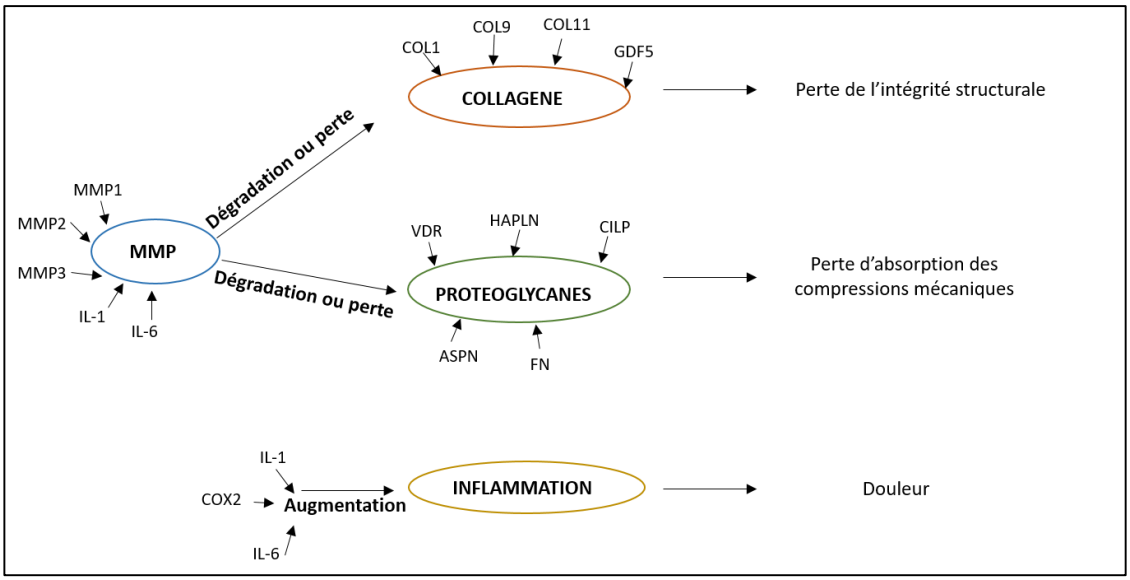


Figure 13: *Représentation schématique des différents gènes identifiés comme potentiels facteurs de risques de développement de la dégénérescence discale lombaire (DDL) (Adapté de Mayer et al. 2013).*

Les infections bactériennes semblent également impliquées dans l'apparition des symptômes de DIV dégénérés douloureux (Arndt et al. 2012). Enfin, une étude met en évidence l'association entre la présence de troubles psychologiques (anxiété, dépression, surmenage) et l'apparition de la DDL (Andersson 1999).

II.2 Modifications phénotypiques et mécanismes cellulaires de la dégénérescence discale

La DDL, contrairement au vieillissement, est un processus accéléré défini comme une situation pathologique due à une réponse aberrante des cellules du DIV suite à des phénomènes traumatiques ou inflammatoires. D'un point de vue cellulaire, le vieillissement et la

dégénérescence peuvent être distingués par l'étude des mécanismes de sénescence (Freemont 2009). En effet, la « sénescence réplicative » retrouvée au cours du vieillissement est un processus naturel de raccourcissement des télomères au niveau des chromosomes, menant à un arrêt irréversible du cycle cellulaire. La « sénescence prématurée » est quant à elle induite en réponse à des stress oxydatifs ou à des cytokines et conduit au vieillissement accéléré du tissu (Kim et al. 2009; Le Maitre et al. 2007).

II.2.1 Déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme

Que ce soit dans un contexte physiologique de vieillissement ou dans un contexte pathologique de dégénérescence, le DIV subit un déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme, entraînant une cascade d'événements allant de la diminution d'activité de voies de signalisation détectées pendant la croissance post-natale, à la production de cytokines pro-inflammatoires et la dégradation de la MEC (Henry et al. 2014 ; Risbud and Shapiro 2014). La perte de la cellularité du NP et les altérations quantitatives et qualitatives des composants de la MEC, conduisent à une déshydratation et une perte progressive de l'aspect gélatineux du NP. De plus, la diminution de la quantité de fibres de collagènes de type II au profit de collagène de type I, ainsi que la perte d'agrécane entraînent l'apparition d'une fibrose au sein du NP (Antoniou et al. 1996) (***Figure 14***). Ces atteintes cellulaires et phénotypiques du DIV peuvent être considérées comme étant à l'origine de l'apparition des symptômes douloureux (Vergroesen et al. 2015).

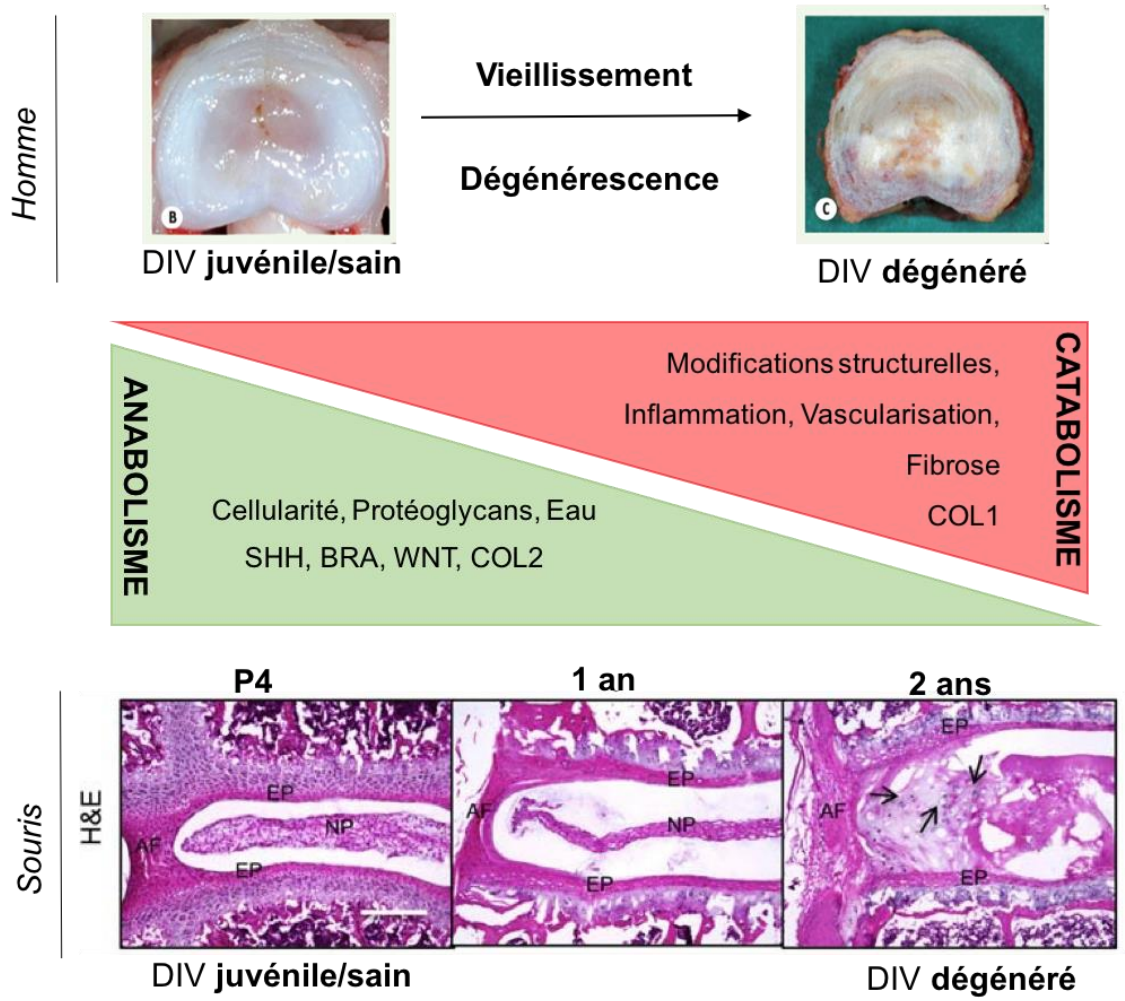


Figure 14: *La dégénérescence discale. (A) Vue macroscopique d'un DIV humain juvénile/sain et d'un DIV dégénéré. (B) Représentation schématique de l'évolution des composants du DIV et de l'inversion de la balance anabolisme/catabolisme durant la dégénérescence. (C) Sections histologiques de rachis de souris âgées de 4 jours (P4 ; DIV juvénile/sain), 1 an et 2 ans (DIV dégénéré), colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E). Shh : Sonic Hedgehog ; T : Brachyury. (Adapté de Henry et al. 2018 et Mohanty et al. 2019).*

II.2.2 Disparition des CNTs : balance prolifération/apoptose affectée

Comme évoqué précédemment, la principale hypothèse quant à l'initiation de la dégénérescence discale, concerne la disparition des CNTs dès la maturité squelettique, conduisant à une perte de dialogue avec les NPcytes et ainsi à une modification de l'homéostasie du NP. Cette perte cellulaire peut dans un premier temps s'expliquer par la différenciation des CNTs en NPCytes. Cependant, l'activité de la voie Wnt durant la croissance post-natale du DIV permet la maintenance de ces CNTs, n'expliquant donc pas totalement leur disparition (Smolders et al. 2012). De plus, l'activité de la voie Shh est essentielle à la prolifération des NPcytes. La diminution de son activité au cours du temps pourrait alors participer à la perte cellulaire au sein du NP. La diminution de la cellularité durant la

dégénérescence est également une conséquence de l'augmentation de l'entrée en apoptose des cellules. En effet, les CNTs ayant un effet protecteur vis à vis de ce mécanisme, leur disparition entraîne un déclin des NPcytes.

Au sein des NP dégénérés, l'apoptose est également un mécanisme secondaire lié aux modifications structurales du DIV, empêchant la résistance aux contraintes mécaniques, stress oxydatif ou l'hypoxie (An et al. 2006; Kohyama et al. 2000). Enfin, cette mort programmée des cellules est associée à l'activation du facteur de transcription NF-κB (nuclear factor κappa-beta), impliqué dans la réponse au stress cellulaire et l'inflammation (Zhongyi et al. 2015).

II.2.3 Dégradation de la MEC, inflammation et néo-innervation

De manière intéressante, l'activation de la voie Wnt/ß-CATENINE conduit à une augmentation de l'expression des gènes *Mmp13* et *Adamts5* codant pour les metalloprotéinases MMP-13 et ADAMTS-5 (agrécanase), montrant un rôle dans le processus de dégradation de la MEC (Wang et al. 2012). De plus, l'application de stress mécaniques sur le NP conduit à une activation excessive de la vie du TGF-ß médiée par les intégrines αv-β6, entraînant alors une diminution de la densité des vacuoles au sein des CNTs de NP de souris âgées de quatre semaines et une diminution de la synthèse de PG de la MEC (Bian et al. 2017). La production de cytokines pro-inflammatoires telles l'INTERLEUKINE-1 (IL-1) et le TNF-**α** (tumor necrosis factor alpha) au sein d'un DIV dégénéré diminue la synthèse de composants de la MEC et augmente la production d'autres enzymes cataboliques telles les métalloptrotéinases (MMP-1, -2, -7, -8, -9, -10 et -14) et agrécanases (ADAMTS-1, -4, -5 -9 et -15) , formant ainsi une boucle de régulation aggravant le phénotype de dégradation de la MEC (Johnson et al. 2015 ; Le Maitre et al. 2005 ; Le Maitre et al. 2007 ; Pockert et al. 2009 ; Weiler et al. 2005). Enfin, le TNF-**α** stimule la synthèse de VEGF (vascular endothelial growth factor), responsable de l'apparition de néo-vascularisation au sein du DIV (Ohba et al. 2009). Par ailleurs, cette néo-vascularisation s'accompagne d'une néo-innervation, *via* l'expression de NGF (nerve growth factor) par les cellules endothéliales vasculaires entrainant la neurogenèse (Kepler et al. 2013). Cette neurogenèse serait en partie responsable de l'inflammation et des douleurs liées à la DDL (Freemont 2009).

II.2.4 L'AF et les PLC : acteurs non négligeables de la dégénérescence

La dérégulation de l'homéostasie du NP est un facteur déclencheur de l'apparition de la dégénérescence, mais le NP n'est pourtant pas le seul composant conerné. Au sein de l'AF, les fibres de collagène deviennent plus fines et irrégulières, fragilisant la structure. Dans certains

cas de DDL, un déchirement de l'AF est même observé, entrainant une expulsion du NP (hernie discale) et l'apparition de fortes douleurs, liées au pincement des nerfs environnants (Gluais et al. 2019). Cette fragilisation de la structure de l'AF entraîne également des altérations de la répartition des contraintes mécaniques conduisant à l'apoptose des cellules de l'AF (Rannou et al. 2004). Avec l'âge et l'apparition de la DDL, on observe également une hypertrophie des chondrocytes composant les PLC, entrainant une calcification du tissu (Aigner et al. 1998; Huanget al. 2014). Cette calcification modifie les propriétés mécaniques et de diffusion des PLC, entrainant un apport nutritionnel insuffisant pour les cellules du NP (Shirazi-Adl et al. 2010). De plus, l'accumulation des déchets métaboliques au sein des PLC engendre une acidification du milieu impactant la survie cellulaire et l'intégrité de la MEC en stimulant la production de MMP-3 (Gunja-Smith and Woessner 1993).

II.2.5 Sénescence/autophagie : mécanismes adaptatifs aggravant la DDL ou derniers remparts de protection ?

Toutes ces modifications phénotypiques et cellulaires du DIV conduisent à l'activation de mécanismes tels la sénescence ou l'autophagie, considérés respectivement comme des facteurs aggravants ou comme des mécanismes de protection des cellules résidentes du DIV. Au sein du DIV, la sénescence peut être activée par le stress oxydatif, la présence de cytokines pro-inflammatoire ou une réponse cellulaire altérée aux compressions mécaniques (Feng et al. 2016). Une augmentation de l'expression de $p16^{INK4A}$ (biomarqueur de la sénescence) est montrée au sein de DIV humains dégénérés et est corrélée avec une augmentation du catabolisme (Le Maitre et al. 2007). De plus, dans un modèle murin de dégénérescence induite, la hauteur discale et l'expression des protéines de la MEC sont restaurées par une délétion de p16 (Che et al. 2020). L'ensemble de ces données indiquent une implication de la sénescence dans le processus de dégénérescence discale.

L'autophagie a un rôle central dans la réponse et l'adaptation des cellules du NP au stress cellulaires (hypoxie, compression mécanique, acidification du milieu) (Jiang et al. 2014). Dans un disque dégénéré, les gènes associés à l'apoptose voient leur expression augmentée (Tang et al. 2019; Ye et al. 2011). Dans ce contexte, l'autophagie inhibine l'apoptose et régule le métabolisme énergétique du tissu discal afin de freiner la dégénérescence. En revanche, le niveau d'autophagie doit être régulé afin de maintenir la viabilité cellulaire et ne pas engendrer des effets négatifs. Le rôle de l'autophagie dans la DDL et son association avec la

sénescence font encore aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches (Lan et al. 2021; (Takeoka et al. 2020; Zhang et al. 2020).

La dégénérescence discale est un processus complexe, faisant intervenir de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires (***Figure 15***). Malgré les connaissances actuelles sur la DDL, de nombreux mécanismes impliqués dans le processus dégénératif restent encore peu décrits. Aujourd'hui, la diminution de la cellularité du tissu discal constitue un frein majeur à la recherche de nouveaux traitements efficaces, puisque la disponibilité des cellules natives du NP, les CNTs, et la capacité d'auto-renouvèlement du tissu sont limitées à une fenêtre de temps très restreinte. De plus, la DDL est décrite comme une pathologie multifactorielle, ne facilitant pas sa prise en charge, qui se fait malheureusement souvent trop tardivement, une fois la sensation de douleur apparue chez les patients.

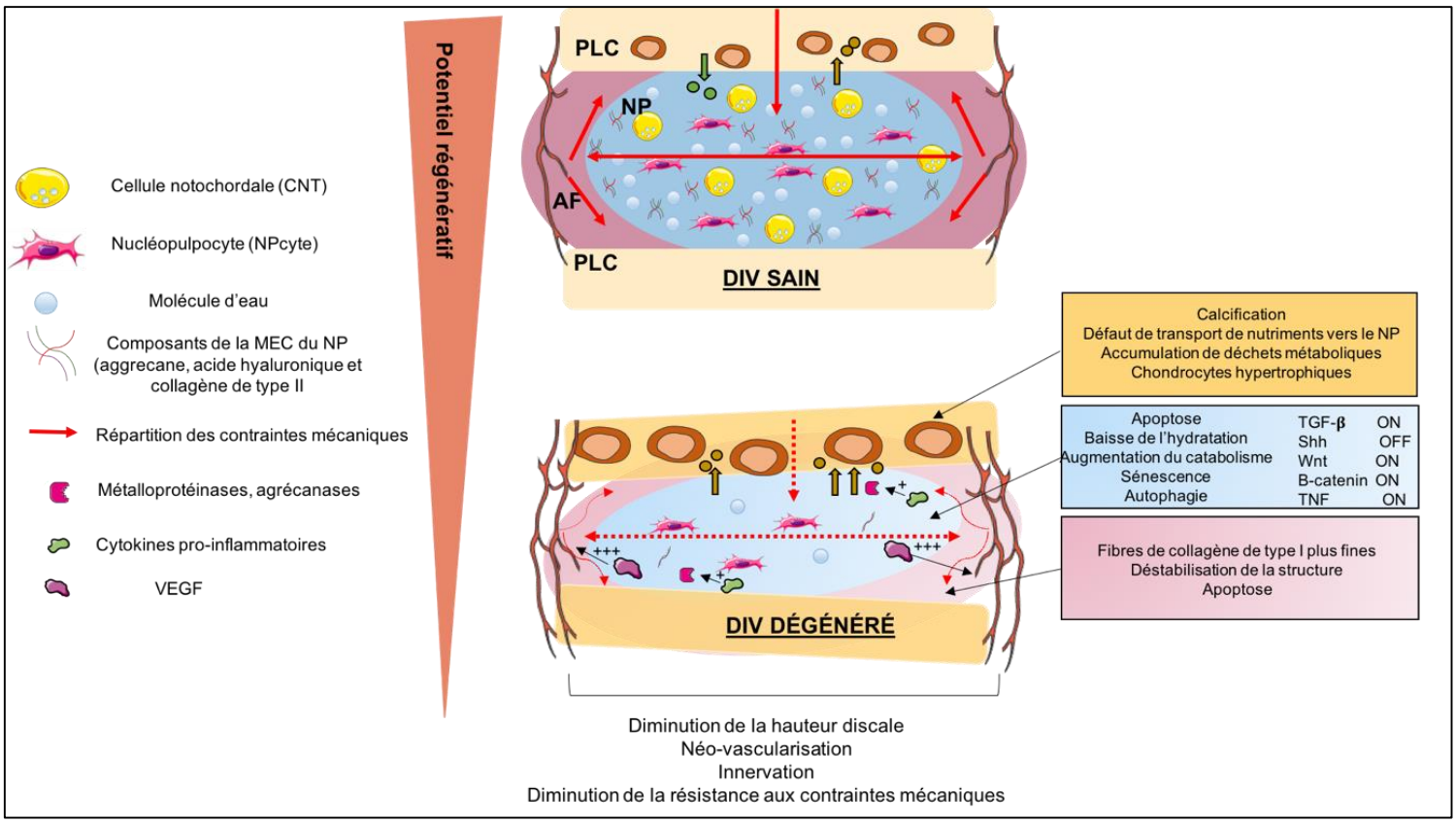


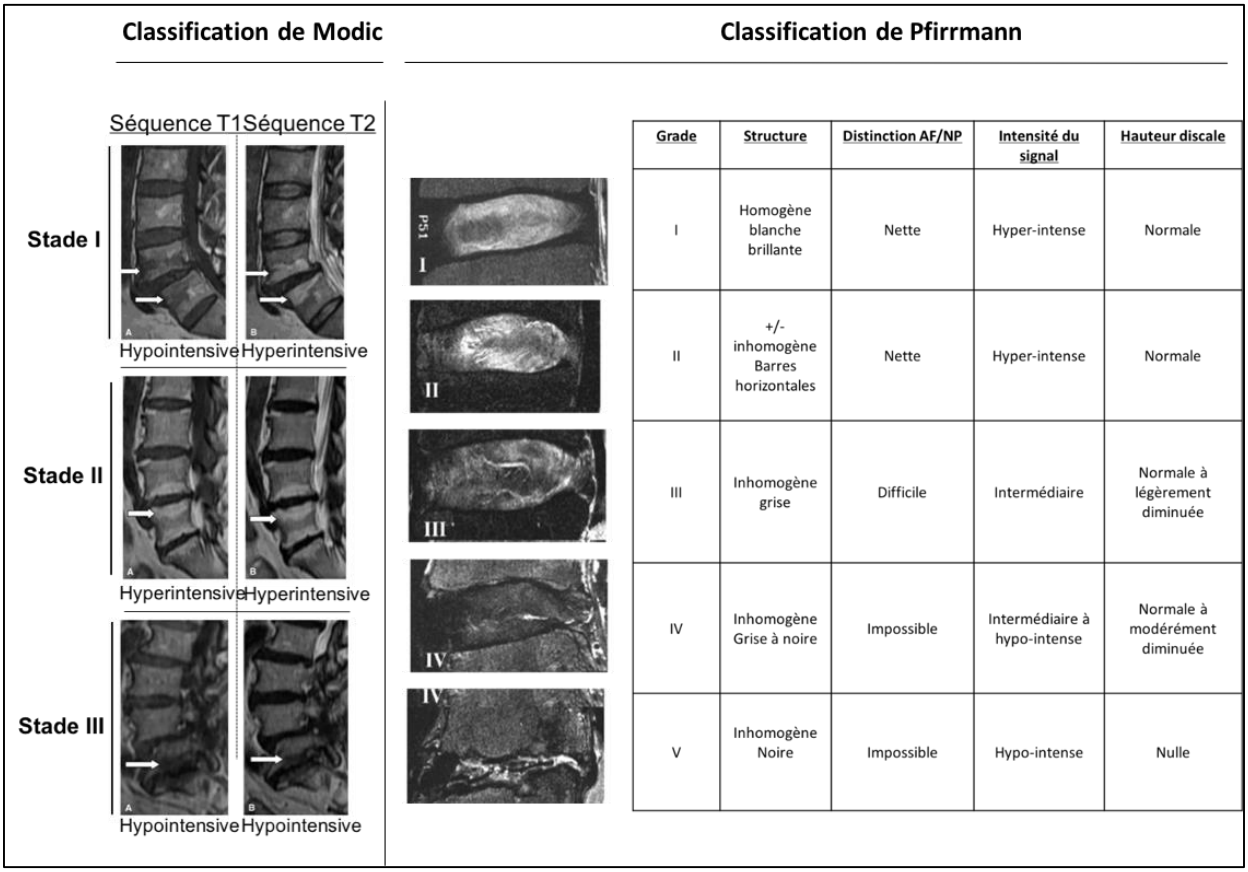
Figure 15: *Représentation schématique de la dégénérescence discale. La cascade d'évènements cellulaires et moléculaires (perte de la cellularité, hypertrophie des chondrocytes des plateaux, augmentation du catabolisme, modification de l'activité des voies de signalisations) sont représentées. Celles-ci conduisent à des modifications tissulaires et biomécaniques telles une diminution de la hauteur discale, une inflammation, une perturbation de la répartition des contraintes mécaniques. L'ensemble de ces modifications/perturbations définissent la dégénérescence discale. (Adapté de Dahia et al. 2009a et Tessier et al. 2020).*

II.3 Outils de diagnostic et de qualification de la dégénérescence et traitements disponibles

II.3.1 Prise en charge et outils de diagnostic de la DDL

D'un point de vue clinique, les lombalgies discogéniques se manifestent par des sensations de douleurs dans les membres, de fourmillements rachidiens, une perturbation de la sensibilité ainsi que des difficultés locomotrices (Luoma et al. 2000). Les symptômes évoluent avec le temps, puisqu'à un stade plus tardif sont retrouvés des sténoses (rétrécissement du canal lombaire) ou des hernies discales entraînant une compression des racines nerveuses et de fortes douleurs (Adams et al. 2015). La confirmation du diagnostic se fait grâce à l'association de différentes techniques d'imagerie :

- La radiographie, qui permet une mesure de la hauteur discale et de la calcification
- Le scanner, qui permet de visualiser la morphologie du DIV et sa perte de densité
- L'imagerie à résonnance magnétique (IRM), qui permet de différencier le tissu discal sain du dégénéré en estimant les modifications des PLC et la déshydratation du tissu. (classification de Modic) (Modic et al. 1988) (***Figure 16***).



Grade	Structure	Distinction AF/NP	Intensité du signal	Hauteur discale
I	Homogène blanche brillante	Nette	Hyper-intense	Normale
II	+/- inhomogène Barres horizontales	Nette	Hyper-intense	Normale
III	Inhomogène grise	Difficile	Intermédiaire	Normale à légèrement diminuée
IV	Inhomogène Grise à noire	Impossible	Intermédiaire à hypo-intense	Normale à modérément diminuée
V	Inhomogène Noire	Impossible	Hypo-intense	Nulle

Figure 16: *Classification de Modic (gauche) et classification de Pfirrmann (droite) de la dégénérescence discale basées sur l'IRM. (Adapté de Pfirrmann et al, 2001 et Zhang et al, 2011).*

La classification de Modic permet la distinction des patients symptomatiques des patients asymptomatiques grâce à la classification de la dégénérescence en trois stades. L'interprétation du score de Pfirrmann permettant d'apprécier la couleur du NP, la distinction entre le NP et l'AF ainsi que la hauteur discale, constitue un second outil de qualification de la DDL (Pfirrmann et al. 2001) (***Figure 16***).

II.3.2 Progression de la DDL : quels traitements à disposition ?

La DDL étant une pathologie multifactorielle, l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation de la Santé) préconise une prise en charge complète et multidisciplinaire (Anaes 2000), allant de l'utilisation de traitements non pharmacologiques, à celle de traitements pharmacologiques et chirurgicaux.

Contrairement aux idées reçues, il est fortement conseillé aux patients de maintenir une activité sportive modérée et régulière qui diminuera la sensation de douleur et améliorera la fonctionnalité discale (Williams et al. 1991). L'obésité étant un facteur de risque d'apparition de la DDL, la pratique sportive peut également intervenir à visée de perte de poids. Ces recommandations d'hygiène de vie sont le plus souvent associées à la prise de traitements pharmacologiques tels des anti-inflammatoires et antalgiques visant encore une fois à soulager la douleur. Dans le cas où ces traitements ne seraient pas suffisants pour compenser la perte de fonction du DIV, la chirurgie est alors envisagée. A l'heure actuelle, il existe deux chirurgies de référence que sont l'arthrodèse et l'arthroplastie (***Figure 17***). Brièvement, l'arthrodèse est une intervention permettant la fusion des vertèbres sus et sous-jacentes au DIV dégénéré dans le but d'immobiliser définitivement l'articulation. Cette technique permettrait la diminution de la douleur dans 70 à 80% des cas (Deyo and Mirza 2006). Cependant, une perte de la mobilité au niveau de étages traités est rapportée consécutivement à la fusion et dans 30% des cas, cette altération constitue un facteur de risque d'apparition de la dégénérescence d'un/des DIV inférieur(s) adjacent(s) quelques années après l'opération (Harrop et al. 2008). Cette approche est donc efficace, mais reste encore à optimiser. Dans ce contexte, l'idée de remplacer le DIV par un implant (arthroplastie) est apparue (***Figure 17***).

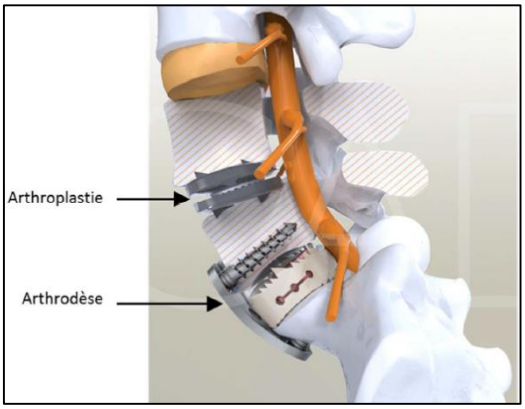


Figure 17: *Arthrodèse et arthroplastie de deux DIV lombaires. L'arthrodèse consiste à la fusion de deux vertèbres sus et sous-jacentes au DIV lésé. L'arthroplastie consiste quant à elle à implanter une prothèse discale totale ou partielle. (Source iconographique : Centre aquitain du Dos ; http://www.cad-fr.com/interventions/prothese-discalelombaire).*

Il existe aujourd'hui sur le marché des prothèses totales (SB Charité III®, PRODISC-L®) permettant un remplacement complet du DIV, et des prothèses partielles (Prosthetic Device Nucleus (PDN®)) permettant de remplacer uniquement le NP. Le recul clinique est encore faible à ce jour concernant cette approche chirurgicale, mais elle reste néanmoins prometteuse du fait de son efficacité antalgique et du retour rapide des patients à leur activité professionnelle (Guyer et al. 2004).

Même si ces approches chirurgicales sont devenues courantes, elles restent néanmoins des interventions lourdes et invasives, notamment du fait de la localisation anatomique du DIV. Enfin, aucun traitement préconisé ne permet réellement de restaurer le tissu et la fonction discale. Ainsi, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques constitue un nouveau challenge essentiel pour la communauté scientifique.

II.4 Stratégies thérapeutiques innovantes pour la réparation du DIV

La médecine régénératrice du DIV a pour but de restaurer les fonctions discales et l'intégrité du tissu. Pour ce faire, on trouve aujourd'hui deux grands types de stratégies : la stratégie anti-catabolique, qui vise a diminuer la cascade d'évènements conduisant à la dégradation de la MEC et l'inflammation, et les stratégies pro-anaboliques, qui quant à elles visent une re-cellularisation du NP et la synthèse d'une nouvelle MEC aux caractéristiques les plus proches possibles de la MEC native du NP. Pour mener à bien ces objectifs, trois catégories d'approches sont envisageables : i) la thérapie génique, ii) la thérapie moléculaire, et iii) la thérapie

cellulaire. Ces différentes approches font d'ores et déjà l'objet de nombreuses revues (Clouet et al. 2018; Henry et al. 2018 ; Matta and Erwin 2020; Sakai et al. 2018).

Il est premièrement à noter que ces stratégies doivent se confronter à la localisation anatomique du DIV qui nécessite des stratégies d'injections mini-invasives des agents thérapeutiques (Elliott et al. 2008). Deuxièmement, la progression de la pathologie fait que la libération des différents agents pharmacologiques devra être prolongée et contrôlée dans le temps.

II.4.1 Thérapie génétique

Dans l'objectif de repeupler le NP et inhiber la dégradation de la MEC, la thérapie génique peut être utilisée. Une modification génétique des cellules résidentes du NP par l'intégration de gènes thérapeutiques au sein de leur génome permet d'assurer la synthèse de protéines manquantes ou corrigées. La cellularité du NP étant de plus en plus diminuée avec la progression de la dégénérescence, la thérapie génique directe (introduction d'un vecteur contenant le gène) serait envisagée plutôt pour des stades précoces, alors que la thérapie génique indirecte (prélèvement et modification *in vitro* des cellules puis réimplantation) conviendrait mieux pour des stades sévères (Henry et al. 2018). De manière intéressante, l'utilisation de vecteurs adénoviraux codant pour BMP-2 (bone morphogenic protein-2) et TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1), conduit à une augmentation de la synthèse de PG dans le MEC de NP humains dégénérés (Wallach et al. 2003). En parallèle, un intérêt grandissant est porté au miARN (micro-ARN). En effet des dérégulations de ces petits ARN non codants constituent des acteurs clés de la dégénérescence discale, en déclenchant l'apoptose cellulaire et la dégradation de la MEC (Clouet et al. 2018; Seki et al. 2009; Zhou et al. 2017). La thérapie génique peut donc être très intéressante pour la restauration de la balance anabolisme/catabolisme au sein du DIV, même si, du fait de la diminution de la cellularité au sein du NP dégénéré, l'efficacité de de ce type d'approche reste encore à clarifier.

II.4.2 Thérapie moléculaire

La thérapie moléculaire est basée sur la stimulation du microenvironnement discal dégénéré par l'apport exogène de molécules afin de rééquilibrer la balance anabolisme/catabolisme au sein du DIV. Tout d'abord, l'inhibition directe de l'activité des enzymes cataboliques (MMP et ADAMTS) ou une régulation de la synthèse de leurs médiateurs inflammatoires (IL-1 et le TNFα) semble possible dans le cas de la DLL car cette stratégie est d'ores et déjà appliquée

dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Freemont 2009). L'apport de facteurs anaboliques tel TGF-β est également envisagé, car ce dernier stimule la production de la MEC par les NPcytes dans un NP juvénile (Gao and Brigstock 2003; Gao and Brigstock 2004). De manière intéressante, le TGF-β permet le maintien de l'expression du CCN2, contrecarrant les effets de l'IL-1β (Tran et al. 2014). Des études sur le facteur GDF-5 (growth differenciation factor 5) (impliqué dans le développement précoce du DIV et la prolifération des NPcytes) montrent qu'il est capable d'agir en synergie avec le TGF-β dans le processus de différenciation *in vitro* de cellules stromales adipeuses (CSA) humaines en cellules de type NPcytes. L'action de ces deux facteurs stimule alors l'expression de marqueurs phénotypiques et de composants de la MEC (Colombier et al. 2016). Il existe quatre essais cliniques en cours portant sur le potentiel régénérateur du GDF-5 dans le traitement de la DDL (NCT01182337, NCT01158924, NCT01124006, NCT00813813 ; www.clinicaltrial.gov) (Henry et al. 2018).Une étude récente montre le potentiel d'injection d'acide hyaluronique au sein de DIV humains, en permettant d'enrailler le processus de dégénérescence *via* la diminution de l'inflammation (Yamamoto et al. 2020). Enfin, l'ensemble des stratégies de libération de ces facteurs bioactifs (liposome, nanoparticules, micelles, hydrogels) fait l'objet d'une revue de la littérature (Colella et al. 2020).

Enfin, nous avons mentionné précédemment le rôle prépondérant qu'exerce la signalisation Shh durant la croissance post-natale du DIV (mis en évidence grâce aux différentes mutations des acteurs de la voie dans divers modèles animaux) qui explique l'intérêt grandissant qu'on lui porte pour la médecine régénératrice. De manière intéressante, le ligand Shh produit par les cellules du NP durant la croissance exerce une action sur les cellules des trois composants du DIV. Un contrôle de la différenciation et de la prolifération des cellules du NP, de l'AF et des PLC serait donc possible grâce à l'utilisation d'agonistes ou antagonistes spécifiques de la voie Shh. Cependant, une identification de toutes les cibles de la voie et des signalisations régulées par Shh est alors nécessaire. Une meilleure compréhension de la boucle de régulation existante au sein du NP entre les voies Shh et Wnt, pouvant être réalisée par le biais de l'étude du cil primaire, permettrait d'établir une hiérarchie de l'activation de ces voies, nécessaire pour la création de nouvelles stratégies thérapeutiques.

II.4.3 Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire est basée sur l'apport de cellules *in situ* (injection de cellules exogènes) afin de remplacer ou enrichir la population cellulaire défaillante du tissu. Les différentes stratégies envisagées sont présentées ci-dessous :

II.4.3.1 Transplantations de cellules de NP et chondrocytes articulaires initialement envisagées

Les études cliniques menées sur l'utilisation des cellules du NP autologues (Eurodisc ; Novocart) rapportent une diminution de la douleur et un maintien de la hauteur discale des patients 2 ans post-implantation (Hohaus et al. 2008). Les études sur l'utilisation de chondrocytes montrent quant à elles une amélioration globale de la qualité de vie des patients après transplantation, malgré une absence de modification du signal discal à l'IRM et de la hauteur discale (Coric et al. 2013). Cependant, l'utilisation de ces deux types cellulaires a rapidement été abandonné du fait de leur faible disponibilité et capacité prolifératives, et de leur tendance à se dédifférencier durant la culture *in vitro* (Hu et al. 2011; Wang et al. 2001).

II.4.3.2 Potentiel des cellules souches mésenchymateuses (CSM)

La caractérisation des CSM et la mise en évidence de leurs capacités régénératrices a été démontrée depuis des années, notamment au sein de la moelle osseuse (Friedenstein et al. 1966; Friedenstein et al. 1974; Dominici et al. 2006). Ces CSM sont notamment caractérisées par leur capacité à se différencier dans les voies adipo-, ostéo- et chondrogéniques, attestant de leur multipotence (Friedenstein et al. 1968). La capacité de différenciation des CSM en cellules du NP a fait l'objet de plusieurs études relatant l'influence de l'hypoxie, du TGF-β et du GDF-5 dans ce processus (Gantenbein-Ritter et al. 2011; Stoyanov et al. 2011). Les CSM ont également des capacités modulatrices de la réponse inflammatoire tissulaire *via* la sécrétion de molécules anti-inflammatoires telles l'IL-6 ou l'IL-10 (Nauta and Fibbe 2007). Ces propriétés sont d'ores-et-déjà exploitées dans le cas de pathologies à composante inflammatoire telles que l'arthrose ou la sclérose en plaque, et font des CSM de cellules propices pour la régénérescence du DIV (Karussis et al. 2008). La première étude préclinique réalisée chez le lapin, montre que l'injection de CSM non différenciées au sein de DIV dégénérés conduit à un ralentissement du processus dégénératif ainsi qu'au maintien des niveaux de PG au sein de la MEC, jusqu'à 8 semaines post-injection (Sakai et al. 2003). De plus, des expériences de co-culture de cellules souches/stromales mésenchymateuses humaines avec des cellules de NP humains dégénérés rapportent une augmentation du niveau d'expression de marqueurs

phénotypiques des cellules du NP tel *SOX9*, *ACAN*, *COL2A* et des facteurs TGF-β, GDF-5 et CTGF (Strassburg et al. 2010; Yang et al. 2008). L'ensemble de ces données montrent un rôle protecteur des CSM sur les cellules du NP mais ne permettent pas de prouver formellement la différenciation des CSM en NPcytes. Pour une utilisation discale, des approches consistant à injecter des CSM directement au sein d'un DIV dégénéré ou des approches d'ingénierie tissulaire permettant l'association de CSM et de biomatériau sont envisagées (Clouet et al. 2018; Henry et al. 2018 ; Sakai and Andersson 2015).

II.4.3.3 Potentiel régénératif du sécrétome des cellules notochordales

Les cellules notochordales étant considérées comme les cellules progénitrices du DIV et étant capable de sécréter des facteurs permettant la différenciation et la prolifération des NPcytes, de nombreuses études se penchent sur leur sécrétome. Dès 1999, une expérience de co-culture de NPcytes bovins de grade 3 de dégénérescence avec des CNTs et NPcytes de grade 1 montre une augmentation de la synthèse de PG due à la production de facteurs solubles par les CNTs (Aguiar et al. 1999). Depuis, plusieurs études de co-culture de milieu conditionné de CNTs et de NPcytes provenant de DIV dégénérés réalisées sur différents modèles (bovin, porcin, canin, humain), montrent des effets anaboliques, pro-prolifératif, anti-apoptotique, anti-angiogénique et anti-neurogénique du milieu conditionné de CNTs (Bach et al. 2016a; Cornejo et al. 2015; Erwin et al. 2006; Potier et al. 2014b). Enfin, le traitement de CSM humaines avec du milieu conditionné de CNTs entraine une accumulation de GAG et favorise la différenciation des MCS en un phénotype de NP (Korecki et al. 2010; Purmessur et al. 2011). Toutes des données montrent donc que les facteurs ou molécules sécrétées par les CTNs pourraient constituer une altérative prometteuse à l'injection de CSM pour la réparation du disque.

II.4.3.4 Différenciation de cellules pluripotentes induites en cellules de type notochordales

Du fait que les cellules du NP dérivent de la notochorde embryonnaire, les cellules souches embryonnaires (cellules ES) présentent un potentiel intéressant pour la médecine régénératrice du DIV. Les cellules ES pluripotentes sont issues de la masse cellulaire interne des blastocystes (entre 5 et 7 jours après la fécondation chez l'Homme) et sont capables d'autorenouvèlement. Leur utilisation pose néanmoins un problème éthique important, puisqu'elle nécessite la destruction d'un embryon humain. Afin de palier à l'utilisation de cellules ES, les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont aujourd'hui disponibles. Ces

cellules proviennent de la reprogrammation de cellules somatiques (essentiellement des fibroblastes de la peau) par l'expression forcée de facteurs de transcription spécifiques de l'état de pluripotence (Takahashi et al. 2007). Des études montrent que le transcriptome des cellules iPS reprogrammées est difficilement distinguable des cellules ES, traduisant des comportements cellulaires très proches (Guenther et al. 2010). Cependant il existe une variabilité à ne pas négliger entre les clones d'iPSC, étant majoritairement due au profil génétique du donneur (Laurila et al. 2014; Rouhani et al. 2014). La différenciation de cellules iPS reprogrammées est un processus délicat, et de nombreuses variations dans l'efficacité des différenciations entre les iPSC humaines et les ES sont rapportées dans la littérature, faisant émerger l'importance d'une uniformisation des protocoles de reprogrammation et de culture des iPSC (Cai et al. 2010; Hu et al. 2011; Koehler et al. 2011; Osafune et al. 2008). Au niveau du tissu discal, les CNTs ayant un potentiel de cellules souches et permettant le maintien de l'homéostasie discale, la différenciation de cellules iPS en CNTs est donc un challenge très intéressant dans la perspective de médecine régénératrice. Aujourd'hui, il existe très peu d'études relatant de l'efficacité de la différenciation d'iPSC en CNTs. Néanmoins, ce processus se fait *via* la formation de progéniteurs mésodermiques, grâce à l'utilisation de l'Activine A et du ligand Wnt3A (Loh et al. 2006 ; Vallier et al. 2009). De plus, des études récentes montrent une différenciation possible des iPSC humaines en cellules de type notochordales en présence d'une matrice tissulaire de NP porcins, et soulignent l'importance des temps d'application de facteurs permettant une expression plus importante de marqueurs phénotypiques des CNTs (Liu et al. 2014; Tang et al. 2018) . Cependant, ces protocoles restent à optimiser pour permettre un engagement unique des iPSC humaines vers le lignage du mésoderme axial/notochorde, et ainsi obtenir une purification des cellules obtenues. Dans ce contexte, une étude montre que la transfection des iPSC avec l'ARNm de *Noto* est essentielle dans l'engagement en lignage notochordal et souligne l'importance de *Wnt* et *Nodal* dans ce processus (Colombier et al. 2020) (***Figure 18***).

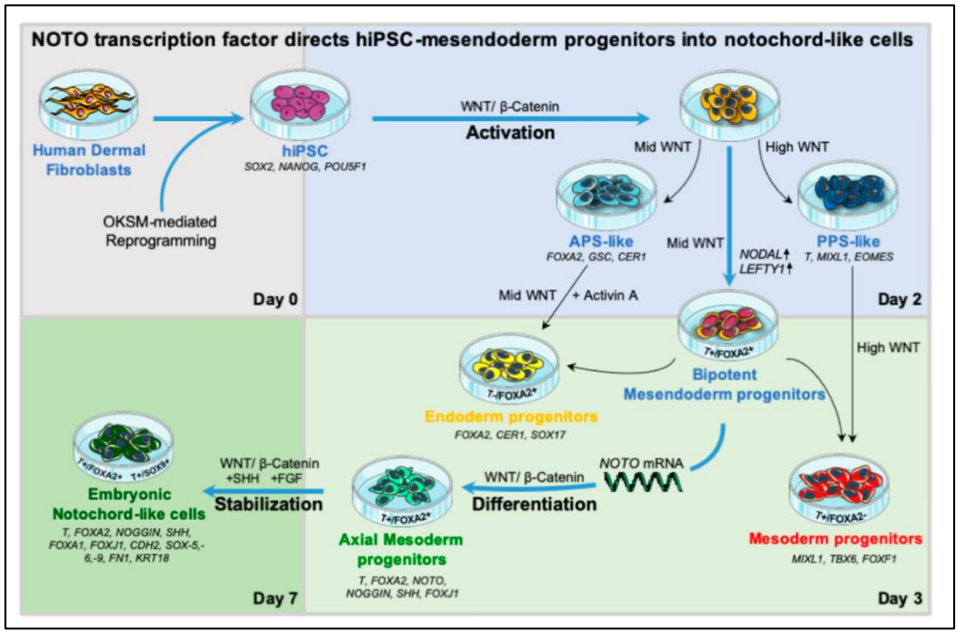


Figure 18: *Représentation schématique du protocole de différenciation de cellules iPS (induced puripotent stem cells) humaines en cellules de type cellules notochordales embryonnaires.(d'après Colombier et al. 2020).*

Les différentes approches énumérées ont toutes pour but de restaurer l'homéostasie discale afin de contrer le processus de dégénérescence discale. En outre, ces dernières années, émerge l'hypothèse de devoir combiner ces différentes approches afin d'obtenir des thérapies plus efficaces et adaptées au stade de progression de la pathologie. C'est dans ce contexte qu'est apparue l'ingénierie tissulaire. Cette dernière consiste en une combinaison de facteurs moléculaires et/ou cellules et un biomatériau, qui permettrait ainsi la protection des facteurs d'intérêt au sein du tissu (Henry et al. 2014). Les différents biomatériaux envisagés en fonction de leur caractéristiques physiques et chimiques font l'objet d'une revue récente (Schmitz et al. 2020). De plus, une stratégie de libération séquentielle est également proposée. Dans un premier temps, une libération de cytokines anti-cataboliques permettrait de réduire l'hostilité du tissu dégénéré et de potentialiser les effets thérapeutiques des agents pro-anaboliques. Un apport de cellules et de facteurs de croissance permettrait la re-cellularisation du NP et la stimulation de l'activité pro-anabolique des cellules résidentes ou apportées préalablement (Frapin et al. 2019). Cependant, la mise en place de toutes ces stratégies est un défi de plus pour la communauté scientifique et s'avère très complexe à développer (Binch et al. 2021).

CHAPITRE II : CAVÉOLES, CAVÉOLINE1 ET FONCTIONS ASSOCIÉES

Les cavéoles sont des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingolipides, constituant une sous-classe de « radeaux lipidiques (ou lipid rafts) ». Leur composition lipidique singulière leur confère notamment une propriété de résistance aux détergents. Ces invaginations de la membrane plasmique de 60 à 80nm de diamètre ont initialement été observées en microscopie électronique à transmission (MET) par Palade en 1953 (Palade 1953), et peuvent apparaître isolées à la membrane plasmique, ou bien regroupées en rosettes ou encore avoir une forme tubulaire, traduisant le fait que ce sont des structures dynamiques (***Figure 19***). Bien que présentes dans la majorité des types cellulaires, elles sont très abondantes dans les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les adipocytes, où elles peuvent représenter jusqu'à 30% de la surface cellulaire (Razani et al. 2002).

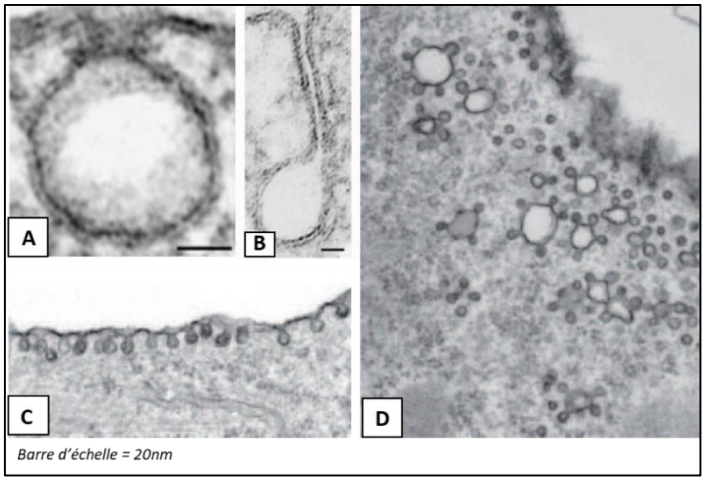


Figure 19: *Morphologie des cavéoles. Les cavéoles sont décrites comme des invaginations de la membrane plasmique en forme d'oméga inversé (A et C). Cependant, elles peuvent également être retrouvées en forme tubulaire (B) ou être assemblées en rosettes (D). (A-B) cavéoles détectées au sien de cellules endothéliales. (C-D) Cavéoles détectées au sein de cellules de la lignée adipocytaires 3T3-L1. (Adapté de Predescu et al. 2003 et Parton and Simons. 2007).*

I Composition et structure des cavéoles

Les cavéolines regroupent trois isoformes (CAVEOLINE1 à -3), clonées dans les années 1990, et dont l'invalidation respective a permis d'établir leur rôle nécessaire et structurant aux structures cavéolaires (Kurzchalia et al. 1992; Rothberg et al. 1992). Les cavines (regroupant quatre isoformes, CAVINE1 à -4), formant une seconde famille de protéines identifiée plus récemment, sont également nécessaires à la formation des cavéoles. Les cavéolines et les cavines forment ainsi le manteau protéique de la cavéole (***Figure 20***).

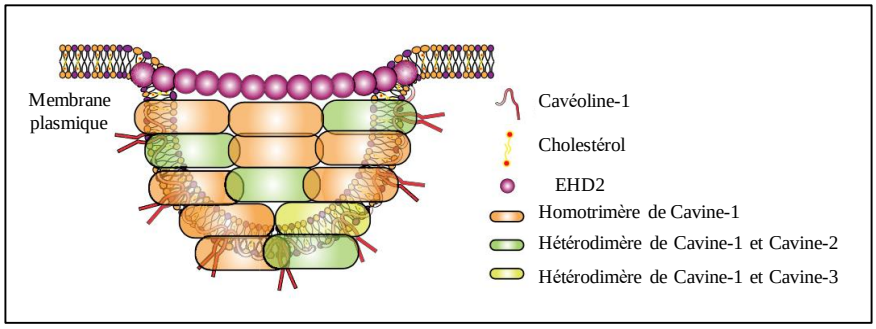


Figure 20: *Structure des cavéoles. Les cavéoles constituent un sous-type de radeaux lipidiques à la membrane plasmique enrichis en cholestérol et sphingolipides. Les oligomères de cavéolines, associés aux homodimères ou hétérodimères de cavines, forment le manteau de la cavéole. (Adapté de Parton et al. 2020a).*

I.1 Protéines de structure des cavéoles

I.1.1 Les cavéolines

La CAVEOLINE1 (CAV1) présente une structure en épingles à cheveux avec des extrémités N- et C-terminales cyctosoliques, et un domaine transmembranaire (***Figure 21***). Un domaine d'oligomérisation permet la formation d'oligomères de haut poids moléculaire par homo ou hétéro-oligomérisation. Un « *scaffolding domain* » d'une vingtaine d'acides aminés (82-101) permet à CAV1 d'interagir avec d'autres cavéolines mais aussi avec d'autres protéines telles des protéines G (Lisanti et al. 1994). Les résidus 101-126 sont amphiphiles et donc intégrés dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique.

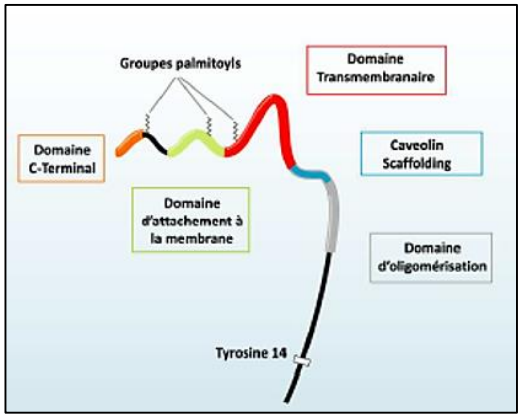


Figure 21: *Structure des cavéolines. La CAVEOLINE1 présente une structure en épingles à cheveux avec les extrémités N- et C- terminales cytoplasmiques. Elle présente différents domaines permettant son insertion à la membrane ainsi que son interaction avec d'autres protéines et son oligomérisation. (D'après la thèse de N. Briand, 2012).*

A l'extrémité C-terminale, la palmitoylation de trois résidus est impliquée dans la stabilisation des cavéoles à la membrane (Dietzen, Hastings, and Lublin 1995). CAV1 peut être phosphorylée sur Tyr14 par les familles de tyrosine kinases Src ou Abl en réponse à des

facteurs de croissance, des stimulations hormonales ou un stress oxydatif (Lee et al. 2000; Sanguinetti and Mastick 2003). Cette phosphorylation jouerait notamment un rôle dans le processus d'endocytose (cf paragraphe III.1.1). CAV1 peut également être phosphorylée sur Ser80. Bien que cette phosphorylation soit moins caractérisée, une mutation phospho-mimétique de cette sérine en acide glutamique provoque la rétention de CAV1 dans l'appareil de Golgi (Kirkham et al. 2008), suggérant un rôle de la phosphorylation de CAV1 dans le transport des cavéolines vers la membrane plasmique.

L'expression des isoformes de cavéolines est fonction des types cellulaires. CAV1 est une protéine de 178 acides aminés exprimé de manière ubiquitaire. Son expression est particulièrement forte dans les cellules endothéliales, les adipocytes et les cellules musculaires lisses (Scherer et al. 1994). Deux isoformes de CAV1 (CAV1α et CAV1β) sont produits par épissage alternatif, CAV1α étant majoritaire. CAV1 est essentielle à la formation des cavéoles, puisque l'invalidation du gène *Cav1* chez la souris entraîne une absence de formation de cavéoles dans tous les tissus (Drab et al. 2001). De plus, l'expression *de novo* de CAV1 sein des cellules est suffisante pour induire la formation des cavéoles (Fra et al, 1995). Cependant, une surexpression de CAV1 ne modifie pas la densité des cavéoles à la membrane de cellules endothéliales (Bauer et al. 2005), suggérant l'existence d'autres facteurs limitants à la formation des cavéoles, identifiés plus tardivement comme étant les cavines.

La CAVEOLINE2 (CAV2) est capable d'interagir avec CAV1 afin de former des hétéro-oligomères, et présente le même profil d'expression que cette dernière (Scherer et al, 1996). CAV2 n'est pas nécessaire à la formation des cavéoles, mais sa co-expression avec CAV1 permet la formation de cavéoles plus uniformes, plus profondes et plus abondantes (Fujimoto et al. 2001; Lahtinen et al. 2003; Li et al. 1998). Enfin, l'absence de CAV1 conduit à une rétention de CAV2 au sein de l'appareil de Golgi (elle ne peut plus être recrutée à la membrane) et sa dégradation *via* le protéasome (Mora et al. 1999 ; Razani et al. 2001).

La CAVEOLINE3 (CAV3) est spécifiquement exprimée dans les cellules musculaires. De manière analogue à CAV1, son invalidation conduit à une absence de cavéoles dans les cellules du muscle squelettique (Galbiati et al. 2001). CAV3 n'est cependant pas dépendante de CAV1 ni pour son recrutement à la membrane, ni pour la formation d'oligomères (Li et al. 1998). De manière intéressante, les cavéolines jouent probablement un rôle indépendamment de leurs

fonctions au sein des cavéoles. En effet, CAV1 est exprimée dans des types cellulaires dépourvus de cavéoles tels les neurones, les macrophages et les lymphocytes (Cameron et al. 1997; Head and Insel 2007). De plus, les lymphocytes et macrophages bovins expriment CAV1 et CAV3 uniquement dans des pools intracellulaires. L'existence de ces pools de cavéolines intracellulaires (au niveau de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique (RE) est aujourd'hui admise dans de nombreux tissus (Gkantiragas et al. 2001; Smart et al. 1994).

I.1.2 Les cavines

Le rôle des cavines dans la formation des cavéoles n'a été mis en évidence qu'en 2008 (Hill et al. 2008). Cette famille est composée de 4 protéines : CAVINE1/PTRF (polymerase and transcript release factor), CAVINE2/SDPR (serum deprivation protein response), CAVINE3/SRBC (src-related gene product that binds to c-kinase) et CAVINE4/MURC (muscle-restricted coiled-coil protein), exprimées de manière différentielle selon les types cellulaires. Les cavines 1 à 3 contiennent au moins un domaine riche en résidus leucine (leucin zipper) (***Figure 22***). Des expériences de mutagenèse dirigée démontrent que ce domaine est nécessaire à la localisation cavéolaire des CAVINES-2 et -3 au sein de fibroblastes humains (McMahon et al. 2009). Toutes les cavines présentent un domaine riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine (PEST), qui pourrait jouer un rôle dans leur dégradation protéolytique (Bastiani et al. 2009). Les cavines possèdent également de nombreux domaines de phosphorylation (Aboulaich et al. 2004). Enfin, seule la CAVINE1 a une activité de stimulation de la transcription de gènes, grâce à ses deux séquences de localisation nucléaire (143-157 et 196-210) et sa fonction de terminaison de la transcription (Jansa et al. 1998).

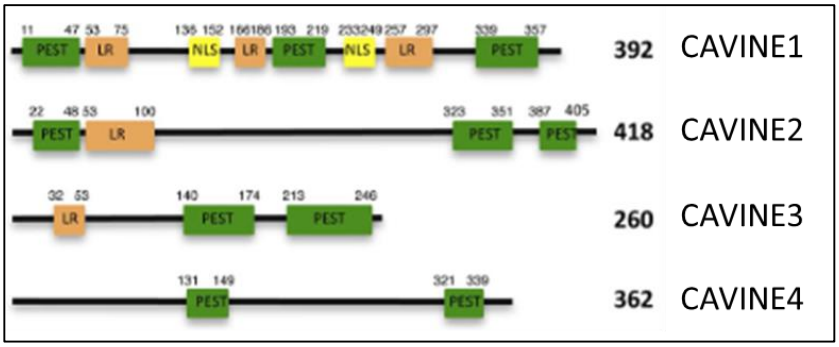


Figure 22: *Structure des protéines cavines humaines. Toutes les cavines présentent plusieurs séquences riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine (PEST). Les cavines 1 à 3 possèdent également des séquences riches en leucine (LR). En revanche, seule la CAVINE1 présente deux séquences de localisation nucléaire (NLS : nuclear localisation signal). (Adapté de Bastiani et al. 2009).*

La localisation de CAVINE1 au sein des cavéoles est connue depuis 2001 (Vinten et al. 2001), mais ce n'est qu'en 2008 que son rôle dans leur formation et leur stabilisation a été mis en évidence (Hill et al. 2008; Liu and Pilch 2008). Les autres cavines ont ensuite pu être identifiées par homologie de séquence (Bastiani et al. 2009; Hansen et al. 2009; McMahon et al. 2009). Une étude réalisée sur des cellules PC3 (lignée de cellules de cancer prostatique) exprimant fortement CAV1 mais pas CAVINE1, a permis de montrer que l'expression de CAVINE1 suffit à générer des cavéoles (Hill et al. 2008). De plus, des souris invalidées pour le gène *Cavine1* présentent une absence de formation de cavéoles au sein des tissus analysés et une diminution de l'expression de CAV1 (et des CAVINES2-3 (Bastiani et al. 2009; Liu et al. 2008). L'expression de CAVINE1 et de CAV1 corrèle fortement avec l'abondance des cavéoles (Vinten et al. 2005; Voldstedlund, Vinten, and Tranum-Jensen 2001) et des expériences de FRET (fluorescence resonnance energy transfert) ont mis en évidence la proximité entre ces deux protéines à la membrane (Hill et al. 2008). A l'inverse, un désassemblage des cavéoles réduit leur interaction, suggérant que celle-ci soit indirecte et s'opère *via* les lipides membranaires (Liu and Pilch 2008).

L'association de CAVINE2 avec les cavéoles a été mis en évidence dès 1998 (Mineo et al. 1998) puis son implication dans la formation des cavéoles a été prouvée une dizaine d'années plus tard (Carsten G Hansen et al. 2009). Une diminution de l'expression de CAVINE2 au sein de cellules HeLa (lignée cellulaire cancéreuse) entraîne la perte d'expression de CAVINE1 et de CAV1, et diminue la densité des cavéoles membranaires. Cette étude démontre cependant que la surexpression de la CAVINE2 dans les Hela, ne conduit pas à une augmentation de la densité cavéolaire, mais entraine une déformation des cavéoles qui adoptent une forme tubulaire.

La localisation de CAVINE3 au sein des cavéoles a été confirmée par des expériences de protéomique et d'immunofluorescence, et est dépendante de l'expression de CAV1 (Aboulaich et al. 2004; McMahon et al. 2009). Enfin, CAVINE3 est associée aux cavéoles internalisées, et son absence d'expression altère le trafic intracellulaire de CAV1 (McMahon et al. 2009), suggérant que CAVINE3 régulerait la mobilité des cavéoles.

La CAVINE4 est spécifiquement exprimée au sein des cellules musculaires, et présente une localisation intracellulaire similaire à celle de CAV3 (Ogata et al. 2008). La distribution de

CAVINE4 semble dépendante de l'expression de CAV3 puisqu'elle est modifiée chez des patients présentant une mutation du gène *Cav3* (Bastiani et al. 2009).

Toutes ces données montrent donc l'existence d'interdépendances entre les cavéolines et les cavines qui semblent essentielles au maintien de la stabilité de ces protéines.

I.2 Protéines accessoires

L'existence d'autres « protéines accessoires », car considérées comme non-essentielles à la formation des cavéoles, ont également été mise en évidence :

- Les protéines DYNAMINE2 et EHD2 (Eps15 homology domain-containing protein 2), qui sont respectivement une GTPAse et une ATPase, sont localisées au niveau du col de la cavéole (Ludwig et al. 2013; Oh et al. 1998; Stoeber et al. 2012). La DYNAMINE2 est impliquée dans l'internalisation des cavéoles, tandis que EHD2 contrôle la dynamique des cavéoles et leur stabilisation à la membrane (Morén et al, 2012) (***Figure 23***).
- La protéine PACSINE2 (protein kinase C and casein subtstrate in neurons), aussi nommée SYNDAPINE2, permet la régulation et la détection des mouvements de courbures membranaires (Hansen et al. 2011; Senju et al. 2011).

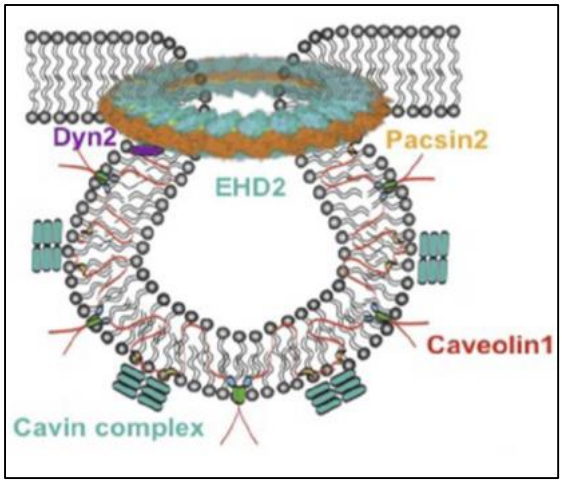


Figure 23: *Représentation schématique d'une cavéole. Ici, la CAVEOLINE1 (CAV1) et les cavines constituent le manteau de la cavéole, au niveau du bulbe. Les protéines accessoires DYNAMIN2 (DYN2), PACSIN2 et EHD2 (eps15 homology domain-containing protein 2) sont localisées au niveau du col de la cavéole. (D'après Lian et al, 2019).*

II Biogenèse des cavéoles

Succinctement, la formation des cavéoles débute par la synthèse des cavéolines et leur oligomérisation dans le RE, où elles acquièrent leur structure en épingles à cheveux (Monier et al. 1995). Ces oligomères de bas poids moléculaire (7 cavéolines) sont ensuite exportés vers l'appareil de Golgi, *via* des vésicules COPII. (Hayer et al. 2010). Elles y subissent alors une seconde oligomérisation (144 cavéolines) et une palmytoilation avant d'être adressées à la membrane plasmique. La sortie des oligomères de l'appareil de Golgi peut être inhibée par une déplétion du cholestérol au sein des cellules, ou à l'inverse accélérée par une supplémentation en ce stérol, soulignant l'importance du cholestérol dans la maturation des oligomères de cavéolines et leur export (Pol et al. 2005). La maturation de la cavéole se fait ensuite par le recrutement des cavines. Ces dernières sont associées dans le cytoplasme sous formes d'oligomères (60-80 cavines) (Bastiani et al. 2009). Ce complexe, est ensuite recruté à la membrane plasmique par CAV1, et la structure cavéolaire se finalise par le recrutement des protéines accessoires (***Figure 24***).

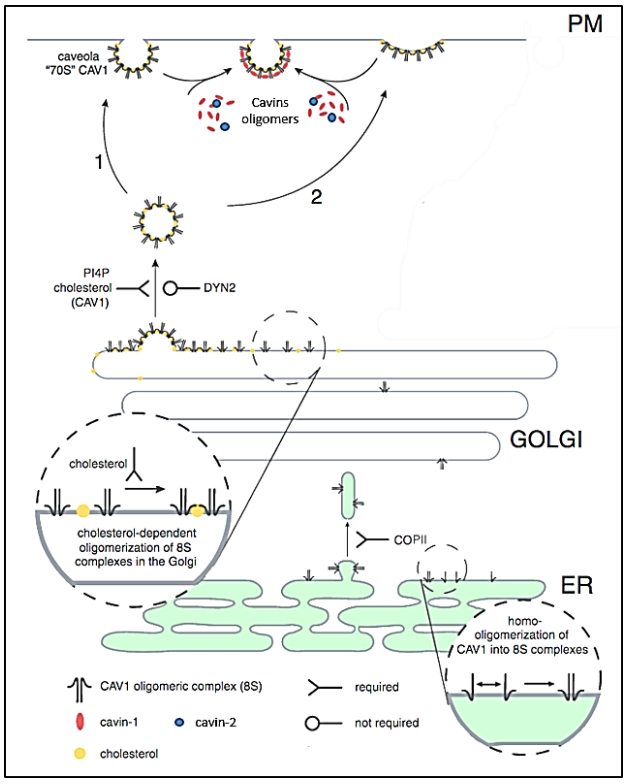


Figure 24: *Modèle de transport des protéines cavéolaires et d'assemblage des cavéoles à la membrane plasmique (PM). L'assemblage des cavéoles implique de multiples oligomérisation de la CAVEOLINE1 (CAV1) et son transport via l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (ER). Deux modèles sont proposés pour l'assemblage des cavines : elles pourraient stabiliser les invaginations cavéolaires (1) ou permettre la formation des cavéoles invaginées à partir de domaines membranaires plats associés aux cavéolines (2). Dyn2 : dynamin2. (Adapté de Hayer et al. 2010).*

III Fonctions des cavéoles

L'utilisation de modèles de souris déficientes pour le gène *Caveolin1* (*Cav1*) a permis de mettre en évidence les différents rôles des cavéoles dans de nombreux processus cellulaires et moléculaires physiologiques au sein de nombreux tissus (Cheng and Nichols 2016). En effet, l'absence de *Cav1* conduit à l'apparition de deux phénotypes majeurs : une lipodystrophie (anomalie de répartition des lipides) associée à une hyperlipidémie (taux élevé de graisse dans le sang) ainsi qu'une altération de la fonction cardiaque liée à un dysfonctionnement endothélial (Drab et al. 2001; Razani et al. 2001).

III.1 Endocytose et transcytose cellulaire

III.1.1 Mécanisme et rôle de l'endocytose cavéolaire

Par analogie aux puits de clathrine, la fonction d'endocytose a été la première attribuée aux cavéoles (Montesano et al. 1982). La machinerie moléculaire impliquée dans ce processus fait encore l'objet de nombreuses études aujourd'hui (Cheng and Nichols 2016). La présence de CAVINE3 réduit la stabilité de la cavéole à la membrane, et pourrait ainsi contrôler la dynamique des cavéoles (Liu et al. 2014; Mohan et al. 2015). De plus, EHD2 permet la stabilisation des cavéoles à la membrane plasmique en réprimant leur scission, *via* un mécanisme dépendant de l'ATP (Hoernke et al. 2017). A l'inverse, l'absence d'EHD2 entraîne quant à elle l'endocytose cavéolaire augmentant ainsi la dynamique des cavéoles membranaires (Morén et al. 2012). Enfin, PACSINE2 permet le recrutement de DYNAMINE2 pour la fission cavéolaire (Senju et al. 2011).

Les cavéoles ont été identifiées comme porte d'entrée de certains virus dans les cellules, à l'image du virus simien SV40 ou des streptocoques de groupe A décrit comme utilisant l'endocytose dépendante des cavéoles pour pénétrer au sein des cellules (Pelkmans et al. 2001; Rohde et al. 2003; Stang et al. 1997). Elles sont également des cargos d'endocytose pour d'autres molécules/protéines telles le récepteur à l'insuline, la toxine du choléra, le cholestérol ou l'albumine (Parton and Richards 2003; Nichols 2003). Cependant, de récentes études suggèrent que ces cavéoles endocytées (cavéosomes) font en fait partie de la machinerie classique d'endocytose et peuvent être définies comme des endosomes tardifs modifiés par une surexpression de *Cav1* dans l'attente de leur dégradation (Hayer et al. 2010).

Les cavéoles ont également été décrites comme pouvant fusionner avec des endosomes plus précoces ou des corps multivésiculaires (CMV). La présence de CAV1 au sein de ces CMV permettrait la génération de vésicules extracellulaires (VEs) contenant CAV1 (Shvets et al. 2015). Ces études illustrent donc la complexité du lien entre cavéoles et endocytose, et remettent également en question la fonction d'endocytose des cavéoles, qualifiée de fonction première il y a quelques années. En effet, une étude de quantification du flux d'endocytose au sein de cellules NIH3T3 révèle finalement que seulement 5% des cavéoles seraient capables d'être endocytées (Kirkham et al. 2005).

III.1.2 Transcytose cavéolaire : transports de molécules

Plusieurs travaux ont en outre démontré un rôle des cavéoles dans le phénomène de transcytose au sein des cellules endothéliales et ainsi participer au transport de lipides du pôle apical vers le pôle basolatéral (Bendayan and Rasio 1996; Ghitescu et al. 1986; Oh et al. 1998; Vasile et al. 1983). Ce processus n'est pas encore totalement élucidé et reste également controversé (Rippe et al. 2002). Cependant, la viabilité des cellules déficientes en *Cav1* suggère un mécanisme alternatif ou compensatoire de transcytose. CAV1 est également capable d'interagir avec le récepteur CD36 des LDL (low density lipids) et médit la transcytose des LDL (Franck and al. 2002).

Ces différentes recherches ont donc permis de faire avancer les connaissances sur la fonction des cavéoles mais laissent tout de même de nombreuses questions en suspens concernant leur dynamique, les stimuli engendrant l'endocytose des cavéoles et les mécanismes moléculaires du transport de molécules.

III.2 Homéostasie lipidique

Les cavéoles peuvent réguler la composition de la membrane plasmique, grâce aux affinités des composants cavéolaires pour certains lipides, qui permet l'organisation de ces derniers au sein de la membrane. Ainsi, la perte des cavéoles altère la distribution de phosphatidylserine au sein de la membrane plasmique, en relation avec une perturbation spatiale de la protéine RAS (Ariotti et al. 2014). De plus, les cavéoles régulent également la composition lipidique de la membrane plasmique *via* l'internalisation de sphingolipides (Shvets et al. 2015). Elles sont également capables de lier le cholestérol et les acides gras *in vitro* et peuvent s'associer aux gouttelettes lipidiques dans les adipocytes et autres types cellulaires (Blouin et al. 2008;

Murata et al. 1995; Pol et al. 2001; Trigatti et al. 1999). Les études réalisées chez les souris déficientes en *Cav1* ont également permis d'appuyer le rôle des cavéoles dans le métabolisme lipidique. En effet, ces souris présentent une lipoatrophie caractérisée par une adiposité moindre accompagnée d'une hyperlipidémie (Razani et al. 2002). Les mécanismes moléculaires conduisant à l'apparition de cette lipoatrophie sont encore étudiés aujourd'hui. Néanmoins certaines études suggèrent que le phénotype lipoatrophique en absence de *Cav1* résulterait d'un défaut de stockage des lipides, qui conduirait à une augmentation des acides gras libres et des triglycérides dans le sérum (Cohen et al. 2004; Le Lay et al. 2006). Une récente étude montre que les souris invalidées pour le gène codant pour EHD2 présentent une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques au sein du tissu adipeux et une augmentation du nombre de cavéoles détachées de la membrane dans les tissus adipeux brun et blanc, suggérant un rôle de EHD2 dans le stockage des acides gras dépendant des cavéoles (Matthaeus et al. 2020).

III.3 Plateformes de signalisations cellulaires

CAV1 à historiquement été décrite comme substrat de la famille de kinases Src et de nombreuses autres protéines G retrouvées dans les microdomaines riches en CAV1, traduisant ainsi l'implication des cavéoles dans la régulation de signalisations cellulaires (Lisanti and Scherer 1994). De plus, de par son domaine CSD « caveolin scaffolding domain », CAV1 peut interagir de manière directe avec d'autres protéines, possédant un domaine CBD (Caveolin Binding Domain) telles la eNOS (endothelial nitric oxide synthase) ou le récepteur à l'insuline, conférant aux cavéoles ce rôle de plateformes de modulations de voies de signalisation (Karlsson et al. 2002; Shaul et al. 1996; Scherer et al. 1997). La détection de liens directs entre CAV1 et de nombreuses protéines de voies de signalisation est rapporté dans la littérature (Krajewska and Maslowska 2004) (***Figure 25***) et quelques exemples seront illustrés dans cette partie.

Voies de signalisations cellulaires	
Adenylyl cyclase	Neurothrophin receptor p75
Adrenergic receptor β_2 (β_2AR)	Neu (c-Erb2)
Androgen receptor (AR)	Neutral sphingomyelinase (nSMase)/ceramide
Btk, Bmx	eNOS
Cox-2	nNOS
Csk	PDGF receptor (PDGFR)
EGF receptor (EGFR)	PI3K
Estrogen receptor α (ERα)	PKA
Fak	PKC isoforms
G-protein α subunits	PLC
G-protein-coupled receptor kinase (GRK 1, 2, 5)	PLD
	Prion protein cellular form (PrP^c)
Grb7	Prostacyclin synthase (P61S)
Hedgehog receptor	Src
H-Ras	Src-family kinases (Fyn, Lck, Lyn, Yes)
Insulin receptor	TGFβ receptor type I (TGFβRI)
Integrins	Trp1/$G\alpha_{q/11}$/IP_3 receptor
MEK/ERK	TNF receptor associated factor 2 (TRAF2)
Nerve growth factor receptor (TrkA)	VEGF receptor 2 (VEGFR-2)

Figure 25: *Tableau récapitulant les interactions de la CAVEOLINE1 avec les protéines de voies de signalisations cellulaires. (Adapté de Krajewska and Maslowska, 2004).*

III.3.1 Rôle majoritairement inhibiteur de CAV1 sur l'activité des voies de signalisation

La liaison à CAV1, a de manière générale, un effet inhibiteur sur les protéines de signalisations. C'est par exemple le cas pour les récepteurs EGFR (epidermal growth factor receptor) et PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) (Couet et al, 1997 ; Yamamoto et al, 1999). C'est également le cas pour la eNOS, localisée dans les cavéoles au sein des cellules endothéliales (García-Cardeña et al. 1996; Shaul et al. 1996). La eNOS est une enzyme membranaire permettant la production d'oxyde nitrique (NO). La synthèse de NO, régulateur de la pression artérielle de par son effet vasodilatateur, est ainsi augmentée dans des cellules endothéliales dépourvues de *Cav1* (Drab et al. 2001). Cette production de NO conduit à la phosphorylation de la CAV1 sur Tyr14 médiée par les kinases de la famille Src, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif. Cette dérégulation de la production de NO est associée à des dysfonctions vasculaires caractérisées comme causes de l'apparition des troubles cardiovasculaires observés en absence de *Cav1* (Kollur et al. 2010; Zhao et al. 2002).

III.3.2 Rôle activateur de CAV1 nouvellement décrit

Toutes les protéines se liant à CAV1 ne possèdent pas de domaine CSD, et cette liaison n'est pas systématiquement inhibitrice (Czarny et al. 1999). C'est le cas de la signalisation insulinique. Le récepteur à l'insuline ne possède pas de domaine CSD, mais sa présence au niveau du col des cavéoles a été observée dans les adipocytes (Foti et al. 2007; Gustavsson et al. 1999; Yamamoto et al. 1998). Comme précédemment évoqué, l'invalidation de *Cav1* chez

la souris résulte en l'apparition d'une lipoatrophie liée en partie à un stockage altéré des graisses adipeuses du fait d'une insulino-résistance liée à une altération de la voie insulinique (Razani et al. 2002). Ce phénotype se retrouve chez l'Homme, puisqu'une mutation non-sens homozygote sur le gène codant *CAV1* conduit à l'apparition du syndrome BSCL (lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip), caractérisé par une lipodystrophie et une insulino-résistance (Kim et al. 2008) (cf paragraphe IV.3 de ce chapitre). Une étude chez les souris *Cav1*$^{-/-}$ montre une diminution importante de l'expression protéique du récepteur à l'insuline, sans modification de son niveau d'expression génique (Cohen et al. 2003). L'ensemble de ces données suggèrent donc une déstabilisation du récepteur à l'insuline en absence de cavéole qui entrainerait alors un défaut de la signalisation insulinique pouvant expliquer le stockage lipidique altéré. CAV2 pourrait également participer à moduler certaines voies de signalisation, incluant l'activation du récepteur aux œstrogènes par l'œstradiol 17-β (Totta et al. 2016). Des études ont également mises en évidence une dualité de l'action de CAV3 dans la différenciation des myoblastes. En effet, l'activation du récepteur IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor) en réponse à l'IGF dépend de son interaction avec CAV3. Dans le même temps, CAV3 interagit avec le récepteur de la myostatine, entrainant l'inhibition de la voie de signalisation régulant la croissance du muscle (Ohsawa et al. 2006). De manière cohérente, la perte de CAV3 au sein de ces cellules entraîne une atrophie musculaire.

III.4 Réponse aux stress cellulaires

Les cavéoles sont enrichies au sein de cellules soumises à des contraintes mécaniques, à l'image des cellules endothéliales ou musculaires. De plus, les cavéoles sont fortement reliées au cytosquelette puisque la technique d'immunofluorescence révèle un alignement du marquage de CAV1 et CAVINE1 avec les fibres de stress d'actine (Parton et al. 2020a). De plus, une perturbation du cytosquelette d'actine entraine un regroupement des cavéoles et empêche leur endocytose. Ces observations ont conduit à l'étude de l'action des cavéoles/cavéolines dans la réponse à l'exposition des cellules aux stimuli mécaniques. L'exposition chronique de cellules endothéliales à des contraintes des cisaillements entraine l'activation de la voie de signalisation ERK dépendante des cavéoles (Boyd et al. 2003; Park et al. 2000; Rizzo et al. 2003). De plus, au sein de cellules musculaires lisses, un stress cyclique peut causer des interactions directes entre certaines kinases et CAV1 (Sedding et al. 2005). Cependant, dans ces études le rôle des cavéoles dans la réponse au stress n'est considéré que

secondaire, *via* la modulation des voies de signalisation. Mais depuis plusieurs années, un nouveau modèle est proposé, dans lequel les cavéoles répondraient de manière primaire au stress et serait donc considérées comme des senseurs de tensions de membrane. C'est pourquoi de récentes études s'intéressent aux effets de stress cellulaires (hypoxie, contraintes mécaniques, osmolarité) sur la structure et la densité des cavéoles.

III.4.1 Rôle des cavéoles dans la réponse au stress mécanique

L'étude pionnière réalisée par l'équipe de Christophe Lamaze a démontré un désassemblage partiel des cavéoles à la membrane plasmique dans des cellules soumises de manière aiguë à un choc hypo-osmotique ou des contraintes de cisaillement unilatérales (Sinha et al. 2011) (***Figure 26***). Ce désassemblage fait suite à la perte d'interaction entre CAV1 et CAVINE1, entrainant ainsi leur relargage au sein du cytoplasme des cellules. Ce phénomène est assez rapide, et se fait de manière indépendante de l'actine et de l'ATP. Cette étude montre également la capacité des cavéoles à se reformer à la membrane durant un retour à l'état basal. Ce dernier processus est quant à lui lent, et dépendant de l'actine et de l'ATP. De plus, l'absence de cavéoles au sein de myotubes de patients souffrant de dystrophies musculaires augmente la fragilité des membranes soumises à des stress mécaniques. Toutes ces données confortent l'hypothèse selon laquelle les cavéoles seraient des réservoirs de membrane permettant d'absorber les tensions de membrane en réponse à des contraintes mécaniques

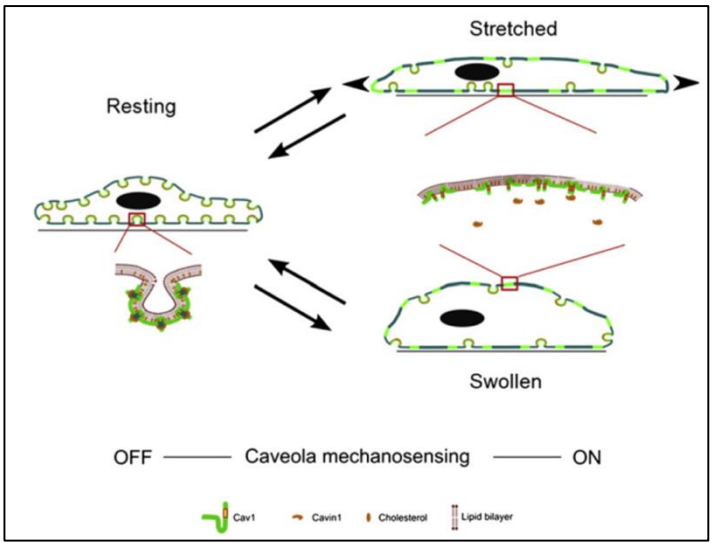


Figure 26: *Réponse cellulaire au stress mécanique par désassemblage rapide et réassemblage des cavéoles à la membrane plasmique. (D'après Sinha et al, 2011).*

Implication de la protéine EHD2 dans la réponse des cavéoles au stress mécanique

Une étude a en outre mis en évidence le rôle de EHD2 dans la reformation des cavéoles après l'application de contraintes de cisaillement (Yeow et al. 2017). Cette étude montre également que les protéines EHD1 et EHD4 peuvent être recrutées au sein de la cavéole. De manière intéressante, l'absence de *Ehd1,2* et *4* au sein de cellules soumises à des contraintes prolongées mène à une déstabilisation des cavéoles, qui présentent une taille du col diminuée, et à une membrane proche de la rupture. Ces données mettent donc en évidence un rôle des cavéoles dans la mécanoprotection. Néanmoins, les mécanismes par lesquels l'aplatissement des cavéoles à la membrane contrôle la mécanotransduction restent encore sujets à débats et questionnements (Nassoy and Lamaze 2012). Une hypothèse émise est que CAVINE1 serait relarguée lors de l'aplatissement des cavéoles et jouerait un rôle indépendamment des cavéoles (Torrino et al. 2018) (***Figure 27***). Rappelons en effet que cette protéine était initialement nommée PTRF (polymerase-I transcript realease factor) et entraîne une augmentation de la transcription de gènes ribosomaux (Jansa et al. 1998). Par des interactions au sein du cytoplasme ou une activation de la transcription de gènes cibles au sein du noyau, CAVINE1 pourrait ainsi réguler la mécanoprotection liée à l'aplatissement des cavéoles.

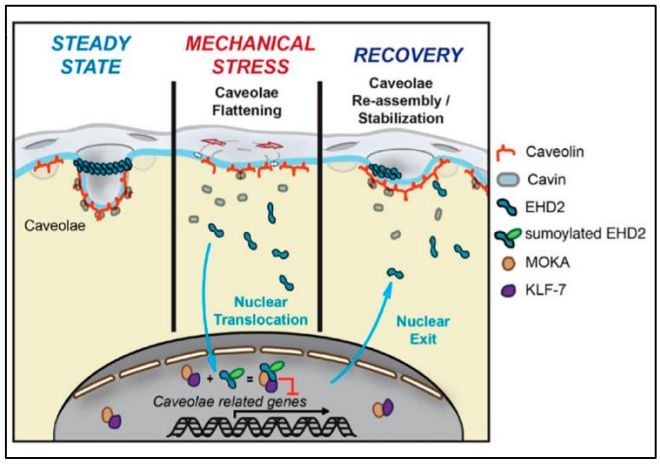


Figure 27: *Rôle de EHD2 dans la réponse des cavéoles au stress mécanique. En réponse à des contraintes mécaniques, CAV1, CAVINE1 et EHD2 sont relargués des cavéoles aplaties à la membrane. EHD2 est SUMOylé et transloqué dans le noyau pour contrôle la transcription de gènes cibles. Durant un retour à l'état basal, EHD2 n'est plus dans le noyau et est requis pour la stabilisation du réservoir de cavéoles à la membrane plasmique. CAV1 : CAVEOLINE1 ; EHD2 : EPS15 HOMOLOGY DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2. (D'après Torrino et al, 2018).*

L'étude de la mécanoprotection des cavéoles est difficile, d'autant plus qu'il semble y avoir une boucle de rétrocontrôle positif de la disparition partielle des cavéoles dans certaines conditions. En effet, l'application de contraintes de cisaillement sur des cellules endothéliales

conduit à l'activation de l'intégrine-β1 de manière dépendante des cavéoles, conduisant à une augmentation de la phosphorylation de CAV1 sur Tyr14 par la kinase Src. Ce phénomène entraîne en processus de compensation, une augmentation de la densité des cavéoles à la membrane (Joshi et al. 2012).

Réponse au stress mécanique médiée par la voie de signalisation Hippo YAP/TAZ

Une étude récente démontre que les cavéoles facilitent la réponse cellulaire aux contraintes de cisaillement *via* la voie de signalisation Hippo (Rausch et al, 2019). Succinctement, la voie Hippo est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose ou la régulation de la taille des tissus (Zhao et al. 2007). Chez les mammifères, l'activation de la voie Hippo entraîne une cascade moléculaire résultant en la phosphorylation des protéines YAP (yes-associated protein) et TAZ (transcriptional coactivateur PDZ-binding motif) et conduisant à leur translocation du noyau vers le cytoplasme dans lequel elles seront séquestrées puis dégradées (Zhao et al. 2010) . *A contrario*, YAP et TAZ non phosphorylées s'accumulent dans le noyau et activent la transcription de gènes cibles tels les gènes codant pour le CTGF et CYR61 (cysteine-rich angiogenic inducer 61) *via* leur domaine TEAD (TEA domain protein) de liaison à l'ADN (Piccolo et al. 2014) (***Figure 28***).

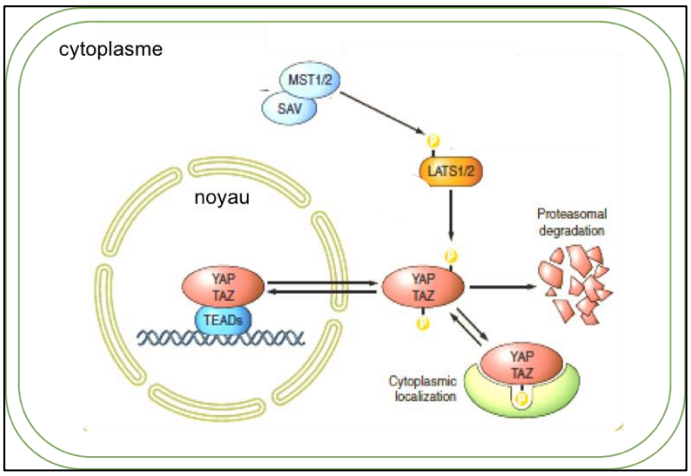


Figure 28: *Représentation schématique de la voie de signalisation Hippo chez les mammifères. L'activation de la voie résulte dans la fixation des kinases MST1/2 sur leur protéine régulatrice SAV1, conduisant à la phosphorylation et l'activation des kinases LATS1/2. La phosphorylation des protéines YAP et TAZ par les kinases LAST1/2 conduit à leur translocation du noyau vers le cytoplasme dans lequel elles seront séquestrées puis dégradées.* A contrario*, YAP et TAZ non phosphorylées s'accumulent dans le noyau et entrainent la transcription de gènes cibles* via *leur domaine TEAD de liaison à l'ADN. LATS1/2 : large tumor supressor 1/2 ; YAP : yes-assiociated protein ; TAZ : transcriptional coactivateur PDZ-binding motif : SAV1 : salvador1 (Adapté de Piccolo et al, 2014).*

La voie de signalisation Hippo est impliquée dans la mécanotransduction impactant le devenir cellulaire de manière dépendante à la rigidité de la MEC (Dupont et al. 2011). La culture de

CSM au sein d'une MEC rigide entraîne une accumulation de YAP/TAZ dans le noyau et une différenciation en ostéoblastes. A l'opposé, une MEC moins rigide conduit à une dégradation de YAP/TAZ et une différenciation des CSM en d'autres types cellulaires tels les adipocytes (Dupont et al. 2011). Une étude montre que CAV1 module cette réponse à la rigidité de la MEC et la phosphorylation de YAP *via* le contrôle de la polymérisation de l'actine (Moreno-Vicente et al. 2018). De plus, l'invalidation de *Cav1* au sein de cellules U2OS entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ/TEAD, montrant une régulation de CAV1 sur l'activité de la voie Hippo YAP/TAZ. De manière intéressante, *Cav1* et *Cavine1* sont des gènes cibles de la voie Hippo puisqu'une invalidation du domaine TEAD chez le poisson zèbre conduit à une diminution de l'expression protéique de CAV1 et CAVINE1 (Rausch et al. 2019) (***Figure 29***). Dans le même sens, une invalidation totale de *Yap* et *Taz (yap $^{-/-}$/taz$^{-/-}$)* chez le poisson-zèbre, mène à la perte des cavéoles à la membrane plasmique des cellules de l'épiderme (stade 12 somites).

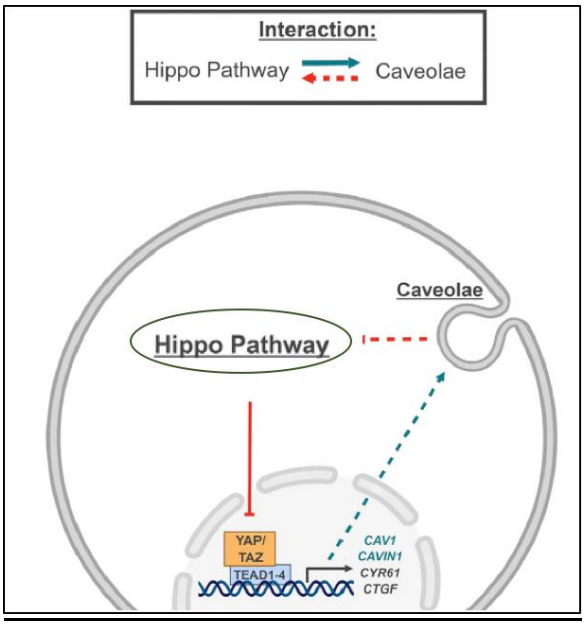


Figure 29: *Représentation schématique du lien entre les cavéoles et la voie de signalisation Hippo. Les protéines cavéolaires cavéoline1 et cavine1 sont des cibles directes de la voie Hippo. De plus, les cavéoles sont également capables de réguler la voie Hippo en augmentant l'activité transcriptionnelle du complexe YAP/TAZ/TEAD dans le noyau et donc l'expression des gènes cibles (CAV1, CAVIN1, CYR61, CTGF). YAP: yes-assiociated protein; TAZ: transcriptional coactivateur; CAV1: caveolin1; TEAD: TEA domain protein; CYR61: cysteine-rich angiongenic inducer 61; CTGF: connective tissue growth factor. (Adapté de Rausch et al, 2019).*

III.4.2 Rôle des cavéoles dans la réponse au stress hypoxique

La communauté scientifique s'intéresse également à la réponse des cavéoles au stress hypoxique. L'oxygène est requis pour le maintien de la physiologie de la majorité des cellules

et tissus du corps humain. En condition hypoxique, les cellules doivent adapter leurs réponses métaboliques afin de limiter leur consommation d'oxygène. Dans ce contexte, l'hypoxie induit une diminution de la prolifération, un engagement des cellules vers un métabolisme anaérobique afin de promouvoir par exemple la synthèse d'acides gras et l'angiogenèse pour augmenter l'apport en oxygène (Forsythe et al. 1996; Kim et al. 2006 ; Wise et al. 2011). Des études montrent que l'hypoxie présente durant l'obésité entraîne une dysfonction du tissu adipeux ainsi que le développement d'une résistance à l'insuline (He et al. 2011; Hosogai et al. 2007; Trayhurn 2013). Chez la souris, l'hypoxie induite par ligature de l'artère spermatique, conduit à une diminution du nombre de cavéoles membranaires au sein des adipocytes et à une diminution du niveau d'expression protéique des CAVINES1 et 2, dépendante de HIF-1α (Regazzetti et al. 2015). La diminution de l'expression de ces mêmes CAVINES est retrouvée chez des patients atteints d'obésité et de diabète, ce qui impacte la signalisation insulinique. De plus, des souris soumises à une hypoxie intermittente chronique (HIC, mimant le syndrome d'apnée obstructive du sommeil) pendant six semaines présentent une insulino-résistance systémique (Varela-Guruceaga et al. 2020). Cette étude montre également que l'HIC conduit à une diminution de la densité des cavéoles membranaires et une augmentation de leur largeur, traduisant un aplatissement des cavéoles. Ces résultats s'accompagnent d'une diminution de l'expression génique et protéique de CAVINE1, CAVINE2 et EHD2 au sein du tissu adipeux, expliquant la résistance à l'insuline détectée chez les patients souffrant d'apnée du sommeil. Enfin, une étude chez le lapin, montre une diminution de l'expression de CAV3 au sein de myocardes soumis à l'hypoxie pendant neuf jours. Cette diminution jouerait un rôle dans l'augmentation de l'expression de la NOS3 (nitric oxide synthase3), résultant en une production majeure de NO et une augmentation de la résistance à l'ischémie (Shi et al. 2000).

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance du rôle des cavéoles dans la réponse à différents stress cellulaires, dans de nombreux types cellulaires. Même si tous les mécanismes moléculaires ne sont pas encore élucidés à ce jour, les différentes implications des cavéoles dans le maintien de l'homéostasie cellulaire *via* la régulation des tensions membranaires et le rôle des protéines cavéolaires dans la formation et le maintien de ces structures, ouvrent de nouvelles perspectives de recherches pour l'étude des pathologies associées à des dysfonctions des cavéoles.

IV Principales pathologies associées à des dysfonctions cavéolaires

Des mutations des gènes codant pour les cavéolines et cavines sont aujourd'hui associées à l'apparition de diverses pathologies chez l'Homme telles les cancers, les dystrophies musculaires, les lipodystrophies et les pathologies du vieillissement, prouvant encore une fois le rôle majeur des cavéoles dans la physiologie humaine et l'homéostasie des tissus.

IV.1 Les cancers

Les changements de morphologie ou de densité des cavéoles altèrent les fonctions et les signalisations cellulaires et induisent une hétérogénéité entre les différents types de cancers (Martinez-Outschoorn et al. 2015). *CAV1* peut ainsi se comporter comme pro-oncogène ou anti-oncogène selon le types de cancers (Ketteler and Klein 2018). *CAV1* a en effet un rôle anti-oncogène dans les cancers gastriques, pancréatiques et les mélanomes (Jia et al. 2014; Wu et al. 2011; Zhao et al. 2013). CAV1 inhibe la migration et l'invasion tumorale *via* la suppression de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules pancréatiques (Salem et al. 2011) et peut également inhiber la capacité métastatique des cellules cancéreuses du colon (Nimri et al. 2013). De plus, l'absence du gène *CAV1* au sein des CAFs (cancer-associated fibroblasts) est considérée comme un marqueur de mauvais pronostic pour les patients souffrant de cancers associés. En effet, le stress oxydatif subit par ces cellules entraîne la dégradation de CAV1 par autophagie créant une boucle de rétrocontrôle positive aggravant ainsi le stress oxydatif et l'autophagie (Martinez-Outschoorn et al. 2010). Ce phénomène est par exemple retrouvé dans le cancer du sein, puisqu'une absence de *CAV1* est associée à un mauvais pronostic pour les patients, avec la formation de métastases et la résistance au tamoxifène (Sloan et al. 2009 ; Witkiewicz et al. 2009). Des études réalisées chez l'Homme ne permettent cependant pas de conclure totalement sur ce rôle anti-oncogène de *CAV1*. Des mutations de *CAV1* sont retrouvées dans 19% des cancers du sein dans une étude de 2006, mais une étude réalisée en 2011 sur une cohorte plus importante de patients n'a pas permis de détecter de mutations de *CAV1* dans ce type de cancers (Li et al. 2006; Patani et al. 2012). En réalité, il semble que le rôle de *CAV1* soit différent selon le stade de progression du cancer, pouvant donc devenir un pro-oncogène dans des stades tardifs (Raudenska et al. 2020) (***Figure 30***). En effet, l'expression de CAV1 apparaît augmentée dans les cellules des cancers de la prostate et pulmonaires ainsi que dans les mélanomes ou carcinomes rénaux dans

lesquels elle favoriserait la progression et la migration (Fecchi et al. 2012; Joo et al. 2004; Li et al. 2009). Des études récentes mettent en évidence que les microvésicules extracellulaires (VEs) provenant de cellules de cancers du sein, de la prostate et de cellules de mélanomes contiennent CAV1 (Campos et al. 2018 ; Llorente, et al. 2004; Logozzi et al. 2009).

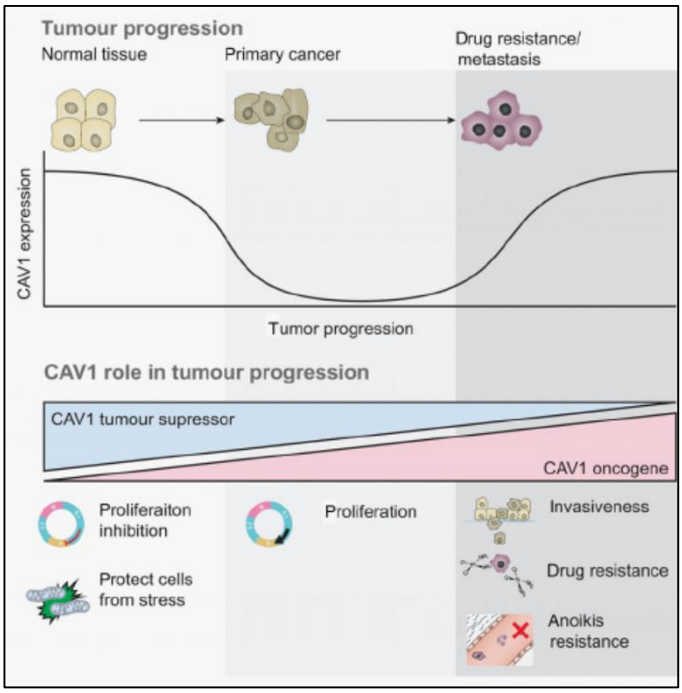


Figure 30: *Proposition de l'évolution de l'expression de la CAVEOLINE1 (CAV1) dans les cancers. CAV1 aide au maintien d'une signalisation normale au sein de cellules et inhibe leur prolifération excessive. Quand l'expression de CAV1 diminue, les cellules perdent l'effet suppresseur de tumeur de CAV1, deviennent sensibles au stress oncogénique et initient la prolifération et leur transformation en cellules malignes. A des stades avancés du cancer, ou sous l'effet de traitements cytotoxiques, CAV1 peut être ré-exprimée et aider les cellules cancéreuses à échapper à la mort cellulaire en induisant leur résistance aux traitements et leur capacité métastatique. (D'après Raudenska et al. 2020).*

Ces résultats ouvrent de nouvelles hypothèses, notamment celles du relargage de VEs contenant CAV1 par les cellules cancéreuses qui pourraient participer à la formation de métastases. Enfin, la voie de signalisation YAP/TAZ joue également un rôle dans les cancers (Moroishi et al. 2016) et la mécanotransduction médiée par les cavéoles au sein des cancers fait aujourd'hui l'objet d'études (Lamaze and Torrino 2015; Singh and Lamaze 2020).

Le rôle des cavines dans les cancers est également étudié. Une diminution de l'expression de la CAVINE3 est retrouvée dans des lignées de cancers du sein, des ovaires et des poumons (Xu et al, 2001). L'expression de CAVINE1 est quant à elle réduite dans les tumeurs de la prostate et les tumeurs mammaires, lui conférant un rôle anti-oncogène (Bai et al. 2011).

Toutes ces données démontrent donc la complexité des mécanismes mis en jeu dans l'implication des cavéoles et protéines cavéolaires dans les cancers, ne permettant pas à l'heure actuelle de les considérer comme des cibles thérapeutiques facilement modulables.

IV.2 Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires constituent un groupe de myopathies héréditaires caractérisées par une dégénérescence musculaire progressive et le remplacement du muscle par un tissu conjonctif. La colocalisation de CAV3 avec la dystrophine (protéine impliquée dans la myopathie de Duchenne) au sein du muscle squelettique a conduit à rechercher des mutations de *CAV3* dans des pathologies musculaires chez l'Homme (Song et al. 1996).

La myopathie de Duchenne est la dystrophie musculaire la plus commune et la plus sévère. C'est une pathologie récessive avec une prévalence d'1 garçon sur 3500 nouveau-nés liée au chromosome X, sur lequel de nombreuses mutations du gène *DMD* codant pour la DYSTROPHINE sont identifiées (Emery 1998). Le complexe que forme la DYSTROPHINE avec les dystroglycanes et sarcoglycanes (glycoprotéines) permet la stabilisation mécanique et la signalisation cellulaire *via* ses interactions avec le cytosquelette, la membrane plasmique et la MEC. L'absence du gène *Dmd* conduit à une fragilité membranaire, menant à l'apparition du phénotype de perte des fibres musculaires au profit de l'apparition d'un tissu conjonctif. Une colocalisation de CAV3 et du complexe DYSTROPHINE/glycoprotéines est observée dans les myocytes (Song et al. 1996). Chez les patients souffrant de myopathie de Duchenne, CAV3 est surexprimée et les cavéoles membranaires apparaissent plus larges (Bonilla et al. 1981; Repetto et al. 1999). Cependant, tous les mécanismes conduisant à une surexpression de CAV3 en absence de dystrophine ne sont pas élucidés.

IV.3 Les lipodystrophies

Les lipodystrophies constituent un groupe de maladies génétiques caractérisées par une lipoatrophie complète ou partielle, qui affecte tous les dépôts adipeux et conduit à une redistribution anormale du tissu adipeux. La recherche de mutations impliquées dans ces pathologies chez l'Homme a conduit à l'identification de mutations de gènes codant pour CAV1 et les cavines.

Le syndrome BSCL est une maladie autosomale récessive rare définie par une hypertrophie musculaire et une absence quasi-totale de tissu adipeux entrainant une résistance à l'insuline

et une hypertriglycéridémie. Dans 95% des cas, elle est due à une mutation du gène codant pour l'AGPAT2 (l-acylglycérol-3-phosphate-O-acyltransféerase), une enzyme qui catalyse la synthèse d'acide phosphatidique qui constitue un intermédiaire essentiel pour la synthèse des triglycérides et phospholipides (Agarwal et al. 2002). Une étude met en évidence une patiente présentant une mutation homozygote non-sens du gène *CAV1* (Kim et al. 2008). Cette patiente présente une absence de cavéole dans les tissus non musculaires, une absence de tissu adipeux, une insulino-résistance, une dyslipidémie ainsi qu'une résistance à la vitamine D. En revanche, elle ne présente aucun trouble du système cardiovasculaire ni de phénotype pulmonaire.

Deux mutations sur le gène *CAVINE1* sont également associées à des phénotypes de lipodystrophies (Hayashi et al. 2009; Liu 2020). La protéine mutée n'est plus localisée à la membrane plasmique et n'interagit donc plus avec les cavéolines, conduisant à une diminution de l'expression de CAV1 et de la densité cavéolaire. Le phénotype lipodystrophique pourrait donc être expliqué par la déficience secondaire en *CAV1*.

L'ensemble de ces données détermine le rôle majeur des cavéoles dans la fonction de stockage lipidique du tissu adipeux chez l'Homme.

IV.4 Pathologies liées au vieillissement

CAV1 joue également un rôle dans des pathologies liées au vieillissement telles l'arthrose, l'athérosclérose et la dégénérescence discale, plus récemment démontré. Les cavéoles seraient majoritairement impliquées dans ces pathologies de par leur modulation de voies de signalisation cellulaires conduisant notamment à l'autophagie ou la sénescence.

IV.4.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est une atteinte fréquente qui se développe avec l'âge et d'autant plus chez les personnes exposées à certains à des comportements liés au style de vie (sédentarité, tabagisme) et présentant des facteurs de risques cardiovasculaires (hypercholestérolémie, hypertension artérielle). Cette pathologie se caractérise par la formation de plaques d'athérome constituées de lipides et de cellules inflammatoires au sein de la paroi des artères, conduisant à un épaississement des artères et une altération de leur fonction.

Une étude montre que des cellules endothéliales de patients fumeurs souffrant d'athérosclérose, présentent des marqueurs de sénescence induite par le stress oxydatif

(stress-induced senescence), dont une augmentation de l'expression de CAV1, en comparaison à des cellules endothéliales de non-fumeurs (Farhat et al. 2008). L'hypercholestérolémie est également un facteur de risque pour le développement de l'athérosclérose. Il est connu dans la littérature que la densité cavéolaire peut être régulée par le taux de cholestérol au sein des cellules (Fielding and Fielding 1996). De plus, ce taux de cholestérol est augmenté avec l'âge et dans les pathologies liées au vieillissement, notamment de par son augmentation au sein des cellules sénescentes (Park et al. 2000). La modulation du taux de cholestérol grâce à des adaptations de l'alimentation ou l'utilisation d'agents pharmacologiques pourrait donc affecter l'expression de CAV1 et ainsi restaurer le phénotype des cellules sénescentes (Cho and Park 2005). La génération d'un modèle murin de double invalidation de *Cav1* et *ApoE* (*Apoliprotein E*) a mis en évidence un profil protecteur de la perte de *Cav1* dans la formation de la plaque d'athérome, avec une réduction de 70% des lésions vasculaires chez ces animaux, en comparaison au souris *ApoE* $^{-/-}$ (Frank et al. 2004). Une étude démontre également que l'hyperglycémie entraîne une réduction de la dégradation autophagique de CAV1, entrainant une transcytose accrue des LDL au sein des cellules endothéliales ainsi qu'une rétention lipidique (Bai et al. 2020). Ces données démontrent donc le rôle de CAV1 dans le développement de l'athérosclérose, engendré par les facteurs de risques tels le tabagisme ou l'hypercholestérolémie, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à décrypter.

IV.4.2 Arthrose

L'arthrose est la maladie articulaire la plus répandue. Elle se caractérise par une destruction du cartilage qui s'étend à toutes les structures de l'articulation (os subchondral, tissu synovial). Elle peut toucher les petites articulations comme celles de la main, et les articulations de taille plus importante comme celle du genou et de la hanche. L'arthrose résulte d'une combinaison de multiples facteurs de risques, le vieillissement et l'obésité étant les principaux. Au niveau tissulaire et moléculaire, sont observés dans la pathologie une érosion du cartilage, une infiltration vasculaire au niveau de l'os, une fibrose de la membrane synoviale, une hypertrophie des chondrocytes articulaires, une modification de la balance formation/destruction de l'os, une composante inflammatoire (activation des macrophages) et une sénescence des chondrocytes articulaires (Glyn-Jones et al. 2015; Martel-Pelletier et al. 2016). Cette sénescence va participer à l'augmentation du stress oxydatif et la production

de cytokines, impliquées dans la médiation de l'inflammation (Martin and Buckwalter 2002). De manière intéressante, l'IL-1β et le peroxyde d'hydrogène augmentent le niveau d'ARNm et d'expression protéique de CAV1, induisant la sénescence prématurée des chondrocytes articulaires (Dai et al. 2006). Ces données suggèrent l'implication de CAV1 dans l'arthrose *via* la médiation de la sénescence cellulaire.

IV.4.3 Dégénérescence discale

Comme détaillé précédemment, les douleurs lombaires apparaissant avec l'âge peuvent être reliées à une dégénérescence du disque intervertébral. CAV1 semble être impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires au sein du DIV et des divergences persistent quant à son rôle dans la physiopathologie discale.

Tout d'abord, CAV1 est exprimée à la membrane des cellules de NP sains chez le chien, la souris et l'Homme (Bach et al. 2016b; Heathfield et al. 2008; Smolders et al. 2013). Les chiens non-chondrodystrophiques comme chondrodystrophiques présentent un niveau d'expression génique de *Cav1* supérieur au sein de NP riches CNTs matures, qu'au sein de NP riches en NPcytes traduisant une diminution de l'expression de CAV1 avec l'âge (Smolders et al. 2013). Cette même étude met en évidence que l'invalidation totale de *Cav1* chez la souris entraîne une dégénérescence précoce du DIV, observée dès 3 mois, avec une diminution drastique de la cellularité, l'apparition de corps apoptotiques ainsi qu'une modification de la composition matricielle au sein du NP. Ces résultats sont complétés par une étude publiée en 2016, montrant chez la souris une diminution de la cellularité du NP apparaissant dès 1,5 mois et s'accompagnant d'une augmentation de l'apoptose (Bach et al. 2016b). Les résultats de ces deux études suggèrent donc un rôle de CAV1 dans la protection des CNTs. L'étude de Smolders et son équipe montre que la protection des CNTs est due au maintien des contacts intercellulaires, caractéristiques des CNTs, *via* la modulation de la voie Wnt/β-CATENINE par CAV1. De plus, une diminution de l'activité de la voie Wnt est observée avec le déclenchement de la dégénérescence discale (Smolders et al. 2013). Cependant, des auteurs mettent en évidence des données divergentes, en indiquant notamment une augmentation de l'expression de CAV1 au sein de DIV dégénérés, associée au phénomène de sénescence. En effet, les mécanismes moléculaires de la dégénérescence discale ne sont pas encore tous élucidés, mais la sénescence cellulaire est proposée comme contributeur à cette dégénérescence (Gruber et al. 2007; Le Maitre et al. 2007; Roberts et al. 2006). Dans ce

contexte, l'expression de CAV1 est augmentée dans des DIV humains dégénérés, en comparaison à des DIV sains, et est corrélée avec le niveau d'expression de p16 (marqueur de la sénescence) (Heathfield et al. 2008). Une étude *in vitro* démontre en outre l'implication de CAV1 dans la sénescence induite par le stress oxydatif *via* la voie de signalisation p53/p21 (Ding et al. 2017). La divergence entre toutes ces données pourrait s'expliquer par le fait que l'étude réalisée chez l'Homme, se focalise sur des stades avancés de dégénérescence, impliquant des DIV contenant uniquement des NPcytes, contrairement aux deux autres études, qui s'intéressent à des stades plus précoces, impliquant la transition entre un NP riche en CNTs et un NP riche en NPcytes. De plus, les DIV identifiés comme sains chez l'Homme, proviennent de patients âgés au minimum de 30 ans. Cela peut introduire un biais à l'étude car il est aujourd'hui admis que la disparition des CNTs dès la maturité squelettique (vers l'âge de 16 ans) constitue le point de départ de la dégénérescence discale. L'ensemble de ces données peut également suggérer un rôle différent de CAV1 dans le temps, et selon le stade de dégénérescence discale. En accord, une expression augmentée de CAV1 est retrouvée au sein de DIV canins dégénérés, accompagnée d'une forte apoptose (Bach et al. 2016b). Une invalidation de *Cav1 in vitro* conduit à la diminution de la teneur en GAG au sein d'agrégats de NPcytes. Ce phénotype est restauré par un traitement avec un milieu chondrogénique en association avec un peptide du domaine « scaffolding » de CAV1, *via* une augmentation de l'expression de TGF-β/pSMad2. Enfin, l'expression de CAV1 est induite par les cytokines IL-1β et TNF-α dans des cellules de NP de rats en réponse à l'apoptose induite (Wang et al. 2016). Toutes ces données suggèrent que l'augmentation de l'expression de la CAV1 dans des stades tardifs de dégénérescence discale constituerait un ultime mécanisme de protection des cellules qui reste encore à élucider (***Figure 31***).

D'autres perspectives d'études sont également possibles. En effet, le DIV est soumis quotidiennement à l'application de contraintes mécaniques, et l'apparition de la dégénérescence entraîne des modifications cellulaires, moléculaires et structurelles du DIV conduisant à une altération de la réponse et de la répartition de ces contraintes au sein du tissu. Il serait alors possible d'envisager une modulation de la structure ou de la densité des cavéoles en réponse à ces contraintes mécaniques.

Enfin, des mutations du gène *CAV1* chez l'Homme sont associées à un syndrome de lipodystrophie, mais aucune étude ne s'est intéressé au phénotype du disque intervertébral chez ces patients.

	Disque juvénile (riche en CNTs)	**Disque mature** (CNTs et Npcytes)	**Disque dégénéré** (riche en NPcytes)	**Conséquence sur le disque d'une invalidation de *Cav1***
 Heathfield et al., 2008	ND	Expression	Surexpression Corrélation avec expression de p16 (sénescence)	ND
 Smolders et al., 2013	Expression	Diminution de l'expression	Diminution/augmentation de l'expression *Selon le stade de dégénérescence ?*	<u>*In vitro*</u> Diminution de la teneur en GAG de la matrice extracellulaire au sein d'agrégats de NPcytes
 Bach et al., 2015 Smolders et al., 2013	Expression Rôle protecteur sur les contacts intercellulaires	Expression	ND	<u>*In vivo*</u> Perte de la cellularité à 1,5 mois Augmentation du niveau d'apoptose à 1,5 mois Altération du contenu de la matrice extracellulaire Dégénérescence précoce à 3 mois
 Wang et al, 2016	ND	Expression	Surexpression en réponse à l'apoptose induite par des cytokines	ND

<u>Figure 31:</u> *Tableau indicatif de l'expression de CAVEOLINE1 au sein d'un disque intervertébral juvénile, mature et dégénéré dans différents modèles (l'Homme, le chien, la souris et le rat. Les conséquences d'une invalidation du gène Cav1 dans ces modèles sont également rapportées. ND : non défini ; CNTs : cellules notochordales ; NPCytes : nucléopulpocytes.*

CHAPITRE III : FONCTIONS DE LA CAVÉOLINE1 DANS LE DISQUE INTERVERTEBRAL : DU DEVELOPEMENT EMBRYONNAIRE A LA CROISSANCE POST-NATALE

I Rationnel de l'étude

La recherche de nouvelles stratégies de médecine régénératrice du DIV constitue à l'heure actuelle un réel challenge. En effet, la communauté scientifique doit faire face au phénomène de perte des cellules notochordales dès la maturité squelettique selon des mécanismes, qui malgré des années de recherche, restent encore méconnus. Cette perte de cellularité rend ainsi la disponibilité des cellules natives du DIV limitée à une faible fenêtre de temps. La capacité d'auto-renouvellement ou d'auto-réparation du tissu s'en voit également restreinte (Liebscher et al. 2011) (***Figure 32***). De plus, il existe une réelle difficulté aujourd'hui à réaliser des protocoles robustes, notamment pour les stratégies de différenciation de cellules iPS humaines en CNTs, à visée de thérapie cellulaire.

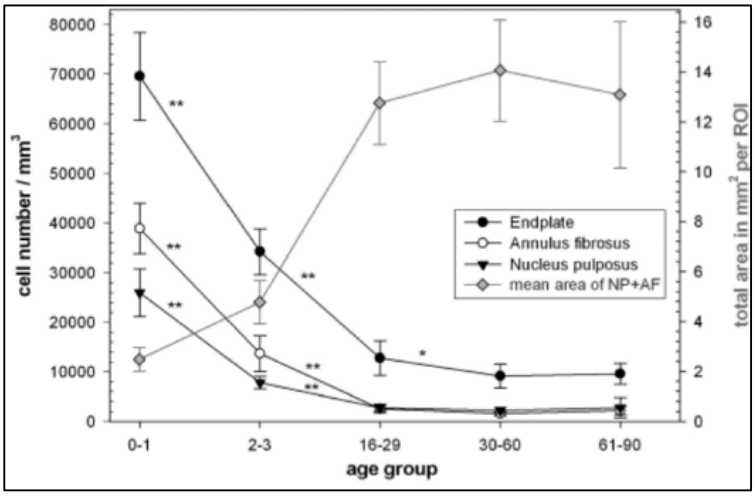


Figure 32: *Variation de la densité cellulaire du disque intervertébral en fonction de l'âge. Une diminution significative de la densité et observée au sein de l'AF et du NP de la naissance à l'âge juvénile (16 ans) et jusqu'à 30 ans dans les plateaux cartilagineux. *P<0.01, **P<0.001. NP : nucleus pulposus ; AF : annulus fibrosus. (D'après Liebscher et al. 2011).*

Il est aujourd'hui admis qu'une meilleure connaissance de l'origine des cellules notochordales matures, de leurs marqueurs phénotypiques ainsi que de leur comportement est essentielle à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques (Mohanty and Dahia 2019). Des études de traçage de lignées cellulaires et de mutagenèse dirigée ont tout de même permis de réelles avancées des connaissances, notamment en permettant l'identification de gènes essentiels à la formation et la maintenance de la notochorde embryonnaire ainsi qu'au maintien de l'homéostasie discale après la naissance tels *T*, *Sox9* ou *Shh* (liste non exhaustive) (Barrionuevo et al. 2006; Chiang et al. 1996; Choi and Lee 2012; Zhu et al. 2016). L'indentification de ces gènes constituent un premier pas pour l'établissement de stratégies de thérapie ciblée. En

effet, l'infection *in vitro* de cellules primaires de DIV humains dégénérés par un vecteur adénoviral recombinant exprimant *Sox9* montre une augmentation de l'expression de COL2A (Paul et al. 2003). Cette même infection *in vivo* chez le lapin préserve l'apparence phénotypique du NP. De plus, de récentes avancées sur la biologie des CNTs démontrent que ces cellules sont capables de sécréter des facteurs permettant le maintien des NPcytes (Erwin et al. 2006; Erwin 2008).

Durant la croissance post-natale, le DIV doit s'adapter à de nombreux changements notamment biomécaniques et biochimiques. La communauté scientifique s'intéresse également aujourd'hui à comprendre comment ces changements contribuent à l'apparition de la dégénérescence (Smith et al. 2011). Dans ce contexte, ce projet a pour but d'augmenter les connaissances sur le développement embryonnaire et la croissance post-natale du DIV. Pour se faire, ce projet se base sur l'étude des fonctions des cavéoles et de la protéine CAVEOLINE1 (CAV1), du développement à la croissance du DIV. Comme décrit précédemment, CAV1 joue un rôle dans la protection des CNTs matures du NP, puisque des souris invalidées pour le gène *Cav1* présentent une dégénérescence précoce dès 1,5 mois (Bach et al. 2016; Smolders et al. 2013). Cependant, les études chez l'Homme et chez le chien, mettent en avant des résultats divergents avec une expression de CAV1 augmentée dans des disques dégénérés (Bach et al. 2016b; Heathfield et al. 2008). Tout comme dans les cancers, il semble que la fonction du gène *Cav1* soit complexe, pouvant varier selon le stade de croissance ou de dégénérescence. Ces différents travaux posent des bases sur la compréhension de l'implication de *Cav1* dans l'homéostasie discale, mais les mécanismes d'actions moléculaires restent encore à définir.

II Objectifs de la thèse

Ce projet vise donc à décrypter les fonctions des cavéoles/CAVEOLINE1 au sein du DIV, de son développement à son vieillissement chez la souris. Un premier pan d'étude *in vivo* a pour but d'analyser le développement embryonnaire et la croissance post-natale du DIV en étudiant tout d'abord la distribution de CAV1 et la densité cavéolaire au sein de la notochorde embryonnaire (E14.5) et du NP de souris de la croissance à la maturation (P4 à 3 mois). Ensuite, la structure de la notochorde et du DIV, ainsi que le phénotype cellulaire (prolifération, apoptose) seront comparés entre des souris sauvages et des souris invalidées

pour le gène *Cav1*. Les cavéoles étant capables de moduler de nombreuses voies de signalisation telle la voie Shh (Krajewska and Maslowska 2004), l'activité de cette voie (essentielle pour l'homoeostasie de la notochorde et du NP) sera également étudiée. Un second axe d'étude *in vitro* a pour but de moduler la densité des cavéoles à la membrane des cellules de notochorde et de NP et d'analyser les conséquences de cette modulation sur le phénotype cellulaire ainsi que l'activité de la voie de signalisation Shh. Cette partie sera réalisée grâce à un modèle de culture 3D organotypique d'explants de notochorde (E11.5) et de NP (P4) développé au sein du laboratoire. Afin de moduler la densité cavéolaire, plusieurs stimuli seront testés sur ces cellules :

- L'hypoxie : le microenvironnement discal est fortement hypoxique en comparaison à la majorité des tissus du corps et les cellules du NP se sont adaptées en réalisant notamment une glycolyse anaérobique. De manière intéressante, ce stimulus est montré comme diminuant la densité des cavéoles membranaires et le niveau d'expression de CAVINE1 dans les adipocytes dépendante de HIF-1α (Regazzetti et al. 2015). De plus, HIF-1α est considéré comme un marqueur phénotypique des cellules du NP et l'absence du gène *Hif-1*α entraine la formation de NP plus petits à E15.5 et la disparition progressive du NP après la naissance (Merceron et al. 2014 ; Risbud et al. 2010).

- L'osmolarité : le DIV est considéré comme hyper-osmotique en comparaison aux autres tissus avec une osmolarité *in vivo* comprise entre 430 et 500 mOSm/L. L'osmolarité extracellulaire du DIV est essentielle car elle est notamment impliquée dans la régulation de la sécrétion de protéines de la MEC (Wuertz et al. 2007). Il a été montré qu'un choc hypo-osmotique entraîne une diminution de la densité des cavéoles membranaires et leur désassemblage au sein de cellules HeLa (Sinha et al. 2011).

Dans ce chapitre, une partie des résultats expérimentaux obtenus au cours de ma thèse sont exposés sous forme d'un article expérimental publié dans le journal « Frontiers in Cell and Developmental Biology ». Des résultats supplémentaires encore non publiés sont également décrits puis discutés dans la partie IV-Discussion et perspectives.

III Résultats expérimentaux

Pour rappel, ce projet de thèse se divise en deux tâches principales qui sont : i) l'étude *in vivo* du développement embryonnaire et la croissance post-natale du disque intervertébral et de la fonction des cavéoles/CAVEOLINE1 dans ces processus, ii) l'étude des conséquences d'une modulation *in vitro* de la densité cavéolaire au sein d'explants de cellules de notochorde (E11.5) et de NP (P4) grâce à l'application de stimuli environnementaux (hypoxie et choc osmotique).

III.1 Article expérimental

Une partie des résultats obtenus à fait l'objet d'une publication soumise dans le journal « Frontiers in Cell and Developmental Biology ». Ainsi, le manuscrit ci-après exposera les analyses suivantes :

Partie *in vivo* :

- Etude de la distribution des protéines cavéolaires et de la densité et la morphologie des cavéoles durant le développement embryonnaire et la croissance post-natale du DIV.
- Etude de la structure et la composition de la matrice extracellulaire de la notochorde et du DIV en absence de *Cav1*
- Etude de la densité de cavéoles et de la distribution des autres protéines cavéolaires en absence de *Cav1*
- Etude de la capacité prolifération des cellules notochordales embryonnaires et matures en absence de *Cav1*
- Etude de l'activité de la voie Shh du développement embryonnaire à la croissance-post natale discale via l'analyse de la luminance du récepteur PATCHED 1 en absence de *Cav1*

Partie *in vivo* :

- Etude de la modulation de la densité cavéolaire à la membrane des cellules de NP (P4) en réponse à l'hypoxie.

Article I

Caveolin1/caveolae regulate cell proliferation during early postnatal growth of the intervertebral disc

Problématique : Comme décrit dans la partie introductive, le développement d'approches innovantes à visée de médecine régénératrice du disque intervertébral (DIV) constitue aujourd'hui une nécessité mais aussi un challenge important, du notamment à la perte de cellules notochordales (CNTs) matures du DIV dès la maturité squelettique. Une meilleure compréhension de la diversité cellulaire du NP et de la fonction de ces cellules et éventuellement du rôle qu'elles pourraient jouer dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est ainsi essentielle. Cette étude vise donc à augmenter les connaissances sur la formation, la croissance et la dégénérescence du DIV. L'objectif est ici de décrypter *in vivo* et *in vitro* la fonction de microdomaines membranaires, les cavéoles, du développement embryonnaire à la maturation du disque, afin de comprendre leur implication dans l'homéostasie discale.

Matériels et Méthodes : La distribution des protéines cavéolaires a été étudié *in vivo* grâce à des immunofluorescences et des immunohistochimies réalisées sur des coupes longitudinales d'embryons et de rachis de souris. La structure et la composition de la matrice extracellulaire (MEC) de la notochorde et du DIV en absence de *Cav1* ont été étudiées par des colorations histologiques (hématoxyline-éosine-safran, bleu alcian/periodic acid Schiff) et immunohistochimie (COLLAGENE VIA). Une immunodétection de la protéine KI-67 (exprimée dans le noyau des cellules capables de proliférer) sur des coupes d'embryons et de rachis de souris *Cav1* $^{+/+}$ et *Cav1* $^{-/-}$ a permis l'analyse de la capacité prolifératives des cellules du NP. La quantification des cellules KI-67^{+} a été réalisée grâce à un programme d'analyse semi-automatisé (F. Autrusseau, RMeS U1229). De la même manière, ce programme a rendu possible la quantification de la luminance de PATCHED 1 (PTCH 1, récepteur de Shh) sur ces coupes histologiques. La densité et la morphologie des cavéoles (largeur, profondeur, largeur du col) ont été étudiées à partir d'images obtenues en microscopie électronique à transmission (MET) réalisées par F. Manero (Plateforme SCIAM, SFR4208). Le prélèvement de NP pour la culture *in vitro* s'opère tout d'abord par l'isolement du rachis de souris âgées de quatre jours (P4). Après digestion du rachis, (pancréatine/trypsine), le NP est isolé grâce à une incision réalisée dans l'AF, sous un plateau cartilagineux. Les NP isolés sont ensuite placés en

culture en suspension dans un milieu DMEM/F12 (1:1), 10% SVF, supplémenté de pénicilline-streptomycine pendant neuf jours, en normoxie (21% O_2, 5% CO_2, 37°C) ou en hypoxie (5%O_2, 5%CO_2, 37°C). Après fixation, des immunofluorescences sont réalisées afin d'étudier l'identité et le phénotype cellulaire ainsi que la distribution des protéines d'intérêt. La densité et la morphologie des cavéoles est étudiée en MET.

Résultats : Dans cet article nous avons mis en évidence la présence des cavéoles et des protéines cavéolaires dès le développement embryonnaire du DIV, avant même la transformation de la notochorde en NP. Nous avons ensuite montré une dynamique des cavéoles avec une évolution de leur densité et de leur morphologie de E14.5 à 3 mois. Nous avons ensuite démontré que CAV1 est essentielle à la formation des cavéoles au sein des cellules de la notochorde et de NP puisque l'absence de *Cav1* entraîne une perte des cavéoles. De plus, la distribution intracellulaire de CAV2, de CAVINE1 et EHD2 s'en retrouve impactée. En revanche, les embryons et les souris *Cav1*$^{-/-}$ ne présentent pas de défaut morphologique de la notochorde et du NP. De plus, la composition globale de MEC ainsi que la distribution du COLLAGENE VIA ne semblent pas impactée. Cependant, une augmentation de la capacité proliférative des cellules de NP de souris *Cav1*$^{-/-}$ a été retrouvée exclusivement après la naissance. De plus, cette capacité perdure dans le temps jusqu'à 1 mois, en comparaison avec la littérature (Dahia et al. 2009b). Une augmentation de la luminance du récepteur PTCH 1 est également retrouvée en absence de *Cav1* à P4. La culture *in vitro* en hypoxie d'explants de cellules de NP a permis de montrer une diminution de la densité des cavéoles ainsi qu'un aplatissement de ces dernières à la membrane en réponse à ce stimulus. L'hypoxie n'entraine cependant pas de modification de la distribution de CAV1 à la membrane, mais conduit à une augmentation de la capacité proliférative des cellules.

Conclusions : Les résultats de cette étude expérimentale démontrent un rôle de la cavéoline-1 dans la modulation de la capacité proliférative des cellules du NP ainsi que la modulation de la voie de signalisation Shh. Cette étude a également permis de mettre en évidence une réponse des cavéoles à l'hypoxie *via* la diminution de leur densité et leur aplatissement à la membrane plasmique des cellules du NP. L'ensemble de ces résultats permet de démontrer une dynamique des cavéoles suggérant une action adaptée des cavéoles/CAVEOLINE1 en réponse divers changement dans le microenvironnement durant le développement et la croissance du DIV.

Article I

Caveolin1/caveolae regulate cell proliferation during early postnatal growth of the intervertebral disc

Lily Paillat[1], Florent Autrusseau[1,2], Kelly Coutant[1], Maeva Dutilleul[1], Alexia Blandin[3,4] Gregory Hilairet[3], Soazig Le Lay[3,4] and Anne Camus[1]

[1] INSERM, UMR 1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton, Université de Nantes, ONIRIS, Nantes, France

[2] Laboratoire de Thermique et Energie de Nantes, France

[3] Univ Angers, SFR ICAT, F-49000 Angers, France

[4] Université de Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

Correspondence:

Corresponding Authors : Anne.Camus@univ-nantes.fr, soazig.lelay@inserm.fr

Abstract

The onset of intervertebral disc degeneration (IDD) involves cellular changes in the centre of the disc named the *nucleus pulposus* (NP): a gradual decline of large vacuolated notochordal cells (NTCs) accompanied by a rise of smaller non-vacuolated mature NP cells until predominant. The notochord is the signalling structure that orchestrates the development of both the intervertebral disc (IVD) and vertebrae. Later NTCs stand as critical players for disc homeostasis. This study provides a descriptive analysis of the spatial and temporal evolution of caveolar proteins (CAVEOLIN1-CAV1, CAVIN1, EHD2) and caveolae present at the plasma membrane of NTCs and NP cells from early stage of disc formation to post-natal growth in the mouse. Caveolae density was shown to increase from embryonic development to disc growth, and decreased with aging. Results highlight associated changes in caveolae morphology. *Cav1* gene invalidation resulted in the impairment to form caveolae at the plasma membrane of NTCs and NP cells but did not affect notochord or IVD morphogenesis. However, the absence of caveolae led to an increase of the proliferative capacity of NP cells early after birth until 1 month of age. In addition, a significant increase of PATCHED1 receptor (PTCH1), a direct transcriptional target of the SONIC HEDGEHOG (SHH) signalling pathway at the NP cell membrane was observed in $Cav1^{-/-}$ mutants, 4 days after birth. No significant correlation between increased SHH activity and the level of proliferative cells was found in the present in vivo study. Finally, we developed a novel 3D organotypic model of explanted mouse NP cells that permits the maintenance of viable cells while preserving their cellular identity (including the presence of intracytoplasmic vacuoles). Results demonstrated that culture of explanted-NP cells in hypoxia showed an increase in their proliferative ability (compared to normoxia) and a decrease of caveolae density in association with flatter caveolar morphology at the plasma membrane. This result supports the hypothesis that NP cell proliferation can be related to caveolae density. Altogether, these findings improve our understanding of the mechanisms of NP cell proliferation and highlight Cav1/caveolae as a potent regulator of IVD growth and homeostasis.

Keywords: Intervertebral disc, CAVEOLIN1, caveolae, HEDGEHOG signalling, embryonic development, proliferation and growth, genetic mouse model, Three-dimensional organotypic culture.

Introduction

The intervertebral disc (IVD) is the fibrous cartilage that lies between two adjacent vertebrae. Each disc is formed by three substructures (Pattappa et al. 2012). The proteoglycan-rich and highly hydrated *nucleus pulposus* (NP) localised in the centre of the IVD is surrounded by the collagen-rich lamellae of the *annulus fibrosus* (AF). Both the NP and AF are connected to the inferior and superior vertebral bodies by the cartilage endplates (EP), a thin layer of hyaline cartilage, which stands as the only gateway for nutrient transport to the disc *via* passive diffusion from the vascularized vertebral bone. The IVD distributes compressive loading on the adjacent vertebral bodies and provides flexibility to the spine (Hsieh and Twomey 2010; Neidlinger-Wilke et al. 2014). IVD degeneration (IDD), which is often associated with aging, commonly results in chronic low back pain (LBP). IDD is characterised by an impaired balance between disc anabolism and catabolism that leads to deleterious cellular and extracellular matrix (ECM) changes. Consequently, the decrease of NP cell density combined with the alteration of the composition and degradation of the ECM, result in disc dehydration and loss of its mechanical properties. Ultimately, inflammation contributes to the degenerative cascade leading to appearance of fibrosis that amplifies patient's pain (Rider et al. 2019). At least 80% of individuals will be affected once in their lifetime by LPB with up to 40% of LBP associated with IDD, making this pathology a major contributor to socio-economic burden worldwide (James et al. 2018).

One of the most distinctive changes during IVD maturation and aging or degeneration occurs at the cellular level. A shift is observed in NP cell phenotype: from predominantly large vacuolated cells called notochordal cells (NTCs; a vestige of the embryonic notochord) to predominantly smaller non-vacuolated mature NP cells often called chondrocyte-like cells (CLCs) because of their morphological similarities with articular chondrocytes (Clouet et al. 2009; Risbud et al. 2015). In humans, this transition is completed around 10 years of age as part of the healthy maturation process while in other species, this change in cellular phenotype occurs later at different ages during adulthood or degenerative stages (Hunter et al. 2004; Richardson et al. 2017). Interestingly, tracing the fate of embryonic notochord in mice demonstrated that this structure gives rise to both NTCs and CLCs (Choi et al. 2008; McCann et al. 2012). Other studies have established that NTCs or NTCs conditioned media (NCCM) play a fundamental role in IVD homeostasis by promoting CLC proliferation and also through their anti-apoptotic and anti-neurovascular effects (Bach et al. 2015; Bach et al. 2016;

Mehrkens et al. 2013). Yet, HEDGEHOG family ligands and connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) are the most characterized factors secreted by NTCs, which stimulate the synthesis of type II collagen and aggrecan-rich IVD-specialized ECM and control the survival of NP cells in the adult disc (Bedore et al. 2013; Dahia et al. 2012; DiPaola et al. 2005) . Based on this data, the progressive decline of mature NTCs within the NP after birth is associated with the onset of IDD (Mohanty and Dahia 2019). To date, no disease-modifying treatment is available. This is largely due to the limited understanding of the molecular effectors underlying IDD, but also to the insufficient comprehension of the mechanisms that govern the processes of IVD development, maturation and growth (Tessier and Risbud 2021).

During early embryogenesis, the *Sonic Hedgehog* (*Shh*) gene is essential for notochord maintenance (Chiang et al. 1996; Choi and Harfe 2011; Maier et al. 2013; Peck et al. 2017). In turn, SHH morphogen secreted by this axial rod-like structure constitutes the major source of signalling for the patterning of adjacent tissues and in particular, the somite-derived sclerotome at the origin of the axial skeleton (i.e. vertebrae and AF) (Corallo et al. 2015). During IVD morphogenesis, in coordination with the cellular rearrangement and differentiation of the sclerotome, the embryonic notochord differentiates and reshapes into prospective NP (pNP). From embryonic day 13 (E13.0), NTCs accumulate in the region of the prospective AF (pAF) and narrow until they disappear in the region of prospective vertebrae (pVB) (Aszódi et al. 1998; Lawson and Harfe 2017; Lefebvre 2019; Rodrigo et al. 2003; Williams et al. 2019). During postnatal growth and aging, several studies have demonstrated the importance of SHH signalling for the NTCs survival, as well as for disc growth, differentiation, and maintenance (Bach et al. 2019; Dahia et al. 2009b; Dahia et al. 2012; Mohanty et al. 2019; Rajesh and Dahia 2018; Winkler et al. 2014). Thus, increasing our knowledge of the mechanisms and signalling pathways that drive the transformation of the embryonic notochord into mature NP cells and the progressive loss of NTCs after birth will surely benefit future development of biomedical research and therapeutic strategies against IDD (McCann and Séguin 2016; Smith et al. 2011).

It is now well documented that oxidative stress, matrix degradation, mechanical loading and altered changes in osmotic disc environment cause cellular stress responses and contribute to the transition from NTCs-rich NP to a more fibrous NP populated with CLCs. Caveolae form dynamic, omega-shaped plasma membrane microdomains implicated in many important cellular mechanisms such as endocytosis, cellular migration, proliferation and cell

signalling, including mechanoprotection and mechanosensing (Krajewska and Maslowska 2004; Parton and Simons 2007; Parton and Del Pozo 2013; Parton et al. 2020). Caveolae are found abundantly in fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells and adipocytes (Parton et al. 2020). Caveolar dysfunction has been linked to cancer and age-related diseases, in particular, to cartilage degeneration in IDD and osteoarthritis (Bach et al. 2016; Dai et al. 2006; Heathfield et al. 2008; Nwosu et al. 2016 ; Smolders et al. 2013). Caveolar biogenesis and functions involve a complex set of membrane-associated CAVEOLIN proteins (CAV1 or VIP2I, CAV2, CAV3) and cytoplasmic CAVIN proteins (CAVIN1 or PTRF, CAVIN2 or SDPR, CAVIN3 or SRBC, CAVIN4 or MURC) (Parton et al. 2018). The major structural protein of caveolae is CAV1. Indeed targeted deletion of *Cav1* gene leads to the generation of mice lacking caveolae in all cell types(Le Lay and Kurzchalia 2005). *Cav1*-null mice suffer from major metabolic disorders, and vascular dysfunction (Drab et al. 2001; Razani et al. 2001; Razani et al. 2002). In addition, a hyperproliferative phenotype was reported in lung tissue and embryonic fibroblasts *in vitro* (Razani et al. 2001). Interestingly, IVD-related studies reveal notable discrepancies among species. *Cav1*-null mice display signs of premature disc degeneration as early as 1.5 months of age (Smolders et al. 2013), while in humans, increased *CAV1* expression is correlated with increased senescence biomarkers within the NP in degenerated lumbar discs (Heathfield et al. 2008). In canine models, *Cav1* gene silencing in CLCs derived *in vitro* from degenerated disc decreases the ECM deposition, but the supplementation with a peptide equivalent to the CAV1 scaffolding domain (CSD) enhanced the anabolic effects of TGF-β_1 (Tissue Growth Factor-β_1) and increased the ECM deposition (Bach et al. 2016). These studies indicated that although the *Cav1* gene appears to be implicated in the degenerative process, it may also play a role in the preservation of the NTC phenotype.

Remarkably high levels of CAV1 protein have been detected in zebrafish, chicken and mouse notochord (Nixon et al. 2007). In zebrafish embryos, there was a high density of caveolae observed in NTCs, and the downregulation of *Cav1* gene caused severe defects in notochord morphology. In addition, the loss of caveolae due to *Cavin1b* gene deletion resulted in NTC cellular damage (membrane failure and cellular collapse with loss of vacuoles) during zebrafish early locomotion (Garcia et al. 2017; Lim et al. 2017). These findings support a mechanoprotective role for caveolae, which is critical for NTC integrity during embryonic development before spine formation. Furthermore, considering the implication of caveolins/caveolae in signalling, including pathways involved in IVD development such as SHH,

TGF-β and WNT (Bian et al. 2017; Mayoral et al. 2010; Schou et al. 2017; Tessier et al. 2020), we hypothesized that a developmental defect in the notochord could be the primary defect leading to the early NTC loss in the mouse *Cav1*-null phenotype. Moreover, CAV1 has been shown to interact directly with (i) the PATCHED 1 (PTCH1) receptor and negative regulator of SHH pathway in the cholesterol-rich microdomains of COS1 cells (Karpen et al. 2001) and (ii) proteins of the transition zone in the accumulation of SMOOTHENED, the downstream activator of the SHH pathway, in the primary cilia's of NIH3T3 cells (Schou et al. 2017). Thus, we propose to investigate the role of CAV1 protein and caveolae during embryonic notochord development and early disc formation and alterations in the molecular mechanisms with a particular focus on the SHH pathway using the *Cav1*-null mouse model.

In this study, we provide a descriptive analysis of the spatial and temporal evolution of caveolae and caveolar proteins from the early embryonic stage of disc development to post-natal growth. Both embryonic notochord and NP morphology were examined and the proliferative capacity of NTCs was quantified in *Cav1*-null mutants. Remarkably, the proliferation and the SHH pathway was shown to be disrupted in *Cav1*-null IVD during early post-natal growth. Finally, using a novel *in vitro* 3D organotypic mouse model of explanted-NP cells, we altered caveolae density by varying oxygen tension during culture and analysed changes on caveolar protein distribution and cellular phenotype.

Methods

Mice

Experiments on mice were conducted according to the French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486 issued on June 6, 2001). *Cav1*-null mice were generated on the C57Bl/6J background as previously described(Drab et al. 2001). Embryos for caveolar protein immunostaining analyses and spines for the *in vitro* model were collected from pregnant mice and new-borns respectively from the CD1-Swiss background.

NP cells collection and culture

NP cells were explanted from new-borns spines at 4 days post-natal in DMEM (1X) + Glutamax™ (Invitrogen, 61965-05), 10% FBS (PAN technology, P290907) inactivated 30 min at 56°C supplemented with 25mM HEPES (Invitrogen, 15630-056) to preserve tissue viability.

Surrounding muscles, long bones, and ribs were cut using scissors in a parallel direction to isolate the spinal column from the caudal up to the thoracic region. The caudal region was separated by a cut at level of the femurs and the lumbar region separated from the thoracic by a cut below the last rib. The spine was further dissected using microsurgery scissors under a dissecting microscope to remove all soft tissues and expose the anterior and lateral part of the IVDs. Finally, to free vertebral bodies and IVDs from other parts of the vertebrae, one blade of the microsurgery scissors was inserted into the spinal canal and the other positioned closer to the vertebral body to cut the bony pedicles on both side of the vertebrae. The spinal cord (white soft tissue all along the spinal column) and any additional adherent tissues were then removed to expose the posterior part of the IVDs. Once isolated, the spine was incubated for 10 min in a solution of 2.5% pancreatin (Sigma, P3292) and 0.5% trypsin (Sigma, T9935) in HBSS 1X (ThermoFisher, 14175053) in a Petri dish on ice, and rinsed in DMEM/FBS/HEPES medium. This digestion step eases the isolation of NP cells by preventing excessive pressure exerted on the AF, which forces the NP cells out of the IVD resulting in poor recovery of NP cells. Using forceps gently hold the vertebral body posterior side down on the dish and with a scalpel cut through the AF close to the boundary of the CEP in order to free the entire mass of the NP cells. Repeat this step for all IVDs of the isolated spine segment. Explanted-NP cells were then transferred into DMEM (1X) + Glutamax™ (Gibco, 31966-021) / F12 Nut Mix (1X) + Glutamax™ (Gibco, 31765-027) (1:1) with 10% FBS and 0.2% penicillin/streptomycin (Invitrogen, 15140-122) in µ-slide 8 well uncoated (Clinisciences, Ibidi, 80821) to allow their culture into self-organized micromasses, under hypoxic (5% O_2; 5% CO_2; 37°C) or normoxic (21% O_2; 5% CO_2; 37°C) conditions. Media was changed every 2 days. Micromasses were observed and imaged with an optical microscope (Leica microsystems CMS GmbH). Images were analysed with ImageJ software (NIH) using the freehand lines tool for micromass diameter measurement.

Histological staining and immunohistochemistry

Spines from mice aged four days (P4), twenty-one days (P21) and two months (M2) were collected, separated in 3 regions (thoracic, lumbar and caudal) and decalcified (EDTA 0.5M pH=7.5 at 4°C) for 7 days (P4) and 30 days (P21 and older). Samples were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (4°C, 24 h) and embedded in paraffin for sectioning in the coronal plane. 5 µm sections were stained following standard protocol with Haematoxylin Eosin

Saffron (HES) and Periodic Acid Schiff/Alcian Blue (PAS/AB). CAV1 and COL6A antigen retrieval was done with citrate buffer (pH=6) (20 min at 90°C). For COL6A detection, sections were permeabilized with 0.025% Triton X-100 in TBS 1X (Tris Buffer Saline) for 30 min. Sections were then incubated for 20 min in H_2O_2 3% in PBS 1X followed by 30 min in blocking solution of 10% goat serum; 4% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS 1X for anti-CAV1 and of 10% goat serum; 0.025% Triton X-100; 4% BSA in TBS 1X for anti-COL6A. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against CAV1 (1:1200, BD Biosciences, 610407) and COL6A (1:600 for embryos and 1:2200 for mice spine, Fitzgerald, 70R-CR009X), washed and finally incubated for 1 h with secondary anti-mouse IgG (1:500, DAKO, E0433) or anti rabbit IgG (1:500, DAKO, E0432) conjugated with biotin. Revelation was performed after 45 min incubation in streptavidin-peroxidase solution (Sigma, P0397) and of DAB substrate (3,3'-Diaminobenzidine). Nuclei were stained with Mayer Hematoxylin. Stained sections were mounted with Eukitt (Kindler GmbH; B0914) and scanned using a Hamamatsu Nanozoomer HT (Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu City, Japan) digital scanner at 40X magnification.

Immunofluorescence, calcein staining and TUNEL assay

Embryos and mice spines at were embedded in Super Cryoembedding Medium (SCEM) (Section Lab, Hiroshima, Japan) and frozen in isopentane/dry ice, without decalcification. Samples were cut along coronal plane and 7µm sections were mounted on slides (CryoStar NX70, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and post-fixed in 2% PFA (2 min) before permeabilization in 0.2% Triton X-100 in PBS for 20 min and in a blocking solution (10% Foetal Bovine Serum; 4% BSA; 0.1% Triton X-100 in PBS) for 1 h. Next, sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against CAV1 (1:100, Clinisciences, GTX-100205, or 1:800, BD Biosciences, 610407), CAVIN1 (1:1200; Millipore Sigma, ABT131), CAV2 (1:250, BD Biosciences; 610684), EHD2 (1:150, see Matthaeus et al, 2020), KI-67 (1:200; Sigma 175R-14), or PTCH1 (1:300; R&D, MAB41051) followed by a 1 h incubation in secondary antibody (either Alexa Fluor-488, Alexa Fluor-568 or Alexa Fluor-647, 1:1000, Abcam). Nuclei were stained by Hoechst 33258 pentahydrate (bis-benzimide) (2ug/mL, Thermofisher; H3569) and sections were mounted with ProLong™ (Thermofisher, P36934). Frozen sections for TUNEL staining were post-fixed in 4% PFA for 5 min and cellular membranes were permeabilized with Proteinase K (10µg/mL, Invitrogen) for 5 min. Apoptotic cells were detected using the DeadEnd™ Fluorometric TUNEL system (Promega, G3250). Micromasses

from explanted-NP cells cultured for 9 days were fixed for 10 min in 4% PFA. Cells were permeabilized with 0.5 % Triton X-100 for 20 min, blocked with 3% BSA in PBS for 30 min and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against BRACHYURY (1:400, R&D, AF2085), SOX9 (1:1000, Abcam, ab5535), KI-67 (1:200, Sigma, 175R14) or CAV1 (1:100, Clinisciences, GTX-100205), washed and incubated for an additional 1 h with relevant secondary antibodies (either Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-568, 1:1200, Abcam). Nuclei were stained with Hoechst (20 min) and micromasses were post-fixed in 1% PFA for 10 min and stored in citi fluor™ AF1 (Electron Microscopy Sciences, #1179 70-25) at 4°C. Calcein staining was performed to visualize intracytoplasmic vacuoles in explanted-NP cells using a LIVE DEAD® viability/cytotoxicity kit (1:2000; Invitrogen, L3224) for 20 min. Sections and micromasses were imaged in Z-stacks using a confocal microscope (A1RS, Nikon, Champigny sur Marne, France). Images were analysed with Image J software (NIH).

Electron microscopy of embryos, mice spines and explanted-NP cells

Embryos, adult spines or micromasses from explanted-NP cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/L cacodylate (pH=7.4) for 48 h and processed as previously described(Briand et al. 2014) Semi-thin sections (2 µm) were prepared to validate tissues integrity. Ultra-thin sections were observed with a JEOL JEM-1400 microscope equipped with a digital camera. For caveolae density and morphological analysis, a minimum of 100 µm of linear membrane stretch has been measured for each sample using Image J software (NIH). Double-blinded measurement has been done for each image.

Digital image analysis

The delineation of NP contour and determination of the NP area was digitally traced using the freehand selection tool using of ImageJ software (NIH) on *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections analysed by immunofluorescence for the detection of KI-67 and PTCH1 proteins. KI-67^{+} cells number and PTCH1 fluorescence was quantified by semi-automatic software. Briefly, after a Z-stack projection for each image and a cell size definition, pink cells (KI-67^{+} cells) and blue cells (total number of NP cells) were automatically detected. Any misclassification was corrected via a user interface and erroneous detection was corrected by the user via manual addition. The PTCH1 fluorescence determination was based on the fluorescent signal intensity detection within the determined NP area. For the

distribution of KI-67^{+} cells within the NP, cells were automatically counted within successive concentric circles of 4µm diameter incremented from the contour to the NP centre.

Statistical analysis

All of the data are presented as mean ± SEM. The statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 6.0® software (GraphPad, San Diego, California, USA). For the caveolae density and morphological parameters determination, statistical significance was determined on the number of analysed images and the number of counted caveolae, respectively, for each animal and at each stage using Student's t-test for the comparison between two stages or genotypes. For the total NP cell number, KI-67^{+} cell number and PTCH1 fluorescence, significance was determined for a number of NP analysed per animal at each stage as indicated in the figures using Student's t-test to compare *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mice. For the distribution of KI-67^{+} cells determination and *in vitro* explanted-NP cells diameter measurement, statistical significance was determined for a number of NP analysed and the number of independent experiments respectively, using two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Statistical significance was set at p values < 0.05 for all experiments.

Results

Caveolar protein distribution and caveolae density from IVD embryonic development and to adulthood

CAVIN1, CAVIN2, CAVIN3, CAV1 and CAV2 are known to be expressed in most cell types, whereas CAV3 or CAVIN4 expression is restricted to smooth muscle cells (Parton et al. 2018). To improve our knowledge about the role of caveolae in IVD development, maturation, and growth, we first analysed the distribution of CAV1, CAVIN1 proteins as well as EHD2 (Eps15 homology domain-containing 2 ATPase). The latter forms a ring at the caveolar neck and is known to regulate the dynamics of caveolae through the anchoring to actin cytoskeleton (Ludwig et al. 2013; Matthaeus et al. 2019; Morén et al. 2012; Stoeber et al. 2012). Immunohistochemistry staining was performed on histological sections of embryos from embryonic day 11.5 (E11.5) to E17.5 and on postnatal spine collected at 4 days (P4), 21 days (P21) and 2 months (M2) of age (Figure 1A-G). CAV1 protein was first detected in NTCs from E12.5 (Figure 1B) and was later found in prospective NP (pNP) cells' membrane during IVD morphogenesis and growth and at postnatal stages. CAV1 protein was still strongly and

specifically detected at the membrane in NP of adult spine (Figure 1G). Immunofluorescence staining from E11.5 to P4 confirmed that CAV1 protein was specifically detected at the plasma membrane in NTCs and NP cells but was not detected in cells of the AF and CEP (Figure 1H-L'). CAVIN1 protein was detected from E13.5 (data not shown); one day later than CAV1. Immunofluorescent staining at E14.5 showed CAVIN1 at the membrane in NTCs of the pNP, as well as in sclerotomal cells located in areas forming the future AF (pAF) and the future vertebrae (pVB) (Figure 1O). From E17.5 to P4, CAVIN1 was present at NP cell membranes and, in contrast, showed perinuclear localization in AF cells (Figure 1P-Q'). Co-immunostaining analysis confirmed partial colocalisation of CAV1 and CAVIN1 fluorescent signals, suggesting the presence of caveolae both in NTC and NP cell membranes at E14.5 and P4 (data not shown and Figure 1Q''). Similar to CAV1, EDH2 protein was detected in NTCs from E12.5 (Figure 1S). At E14.5 EHD2 protein was highly expressed at the membrane in NTCs of the pNP and in sclerotomal cells of the pAF area (Figure 1T). Conversely, from E17.5 and onward, EHD2 protein detection was restricted to the NP (Figure 1 U-V'). In previous studies, caveolae were identified by transmission electron microscopy (TEM) as 60-80 nm diameter invaginations of the plasma membrane with a characteristic bulb-like morphology (Parton et al. 2020). Similar structures were detected by TEM at the plasma membrane confirming the presence of caveolae in NTC at E14.5 and in NP cells at P4, M1 and M3 (Figure 1W).

Previous work indicated that the *Cav1* gene encoding the major structural protein of caveolae plays an essential role in the preservation of the NTC phenotype and IVD integrity. Thus, to investigate caveolae density and morphology at early stages of disc formation and during its growth phase up to adulthood, TEM images of the plasma membrane in NTCs and NP cells were quantified from E14.5 up to 3 months of age (see Methods, Figure 1X and Figure S1A). Results revealed interesting changes in caveolae density between embryonic stage, post-natal growth and adulthood with an increase of the caveolae density from E14.5 to M1, and a decrease between M1 and M3 (Figure 1X). Caveolae morphology was further analysed by the measurement of the caveolae width, depth and neck (Figure 1Y, Z and Figure S1B-D). Although some variability was observed, morphological differences could be distinguished, in particular between the embryonic stage E14.5 and early post-natal stage P4. Indeed, at P4, caveolae appeared flattened (i.e. widened and shallow) with an increase of width associated with a significantly higher neck:depth ratio. Another significant change of morphology was observed over IVD growth, comparing post-natal stage P4 to M1 or to M3. A lower neck:depth

ratio was found at M1 and M3 indicating a more characteristic bulb-shape morphology. Altogether, these results show for the first time that caveolar proteins and caveolae are present at the plasma membrane of NTCs and NP cells from early stages of IVD morphogenesis onward. These results highlight changes in caveolae morphology over time, with the appearance of wider and flatter caveolae at the plasma membrane during IVD morphogenesis, then a more bulb-like caveolar morphology as the IVD grows and ages.

No obvious structural defect is found during IVD morphogenesis and postnatal development despite the depletion of caveolae in *Cav1*-null mice

Considering the importance of caveolae function in notochord morphology reported in the zebrafish model and their implication in controlling signalling pathways, the notochord and NP morphology as well as ECM composition were analysed at E14.5, P4 and P21, well before any sign of disc degeneration. Histological staining with haematoxylin eosin saffron (HES) showed that early stages of IVD morphogenesis and post-natal growth were similar in *Cav1*$^{-/-}$ and control littermates (Figure 2A-F). In *Cav1*$^{-/-}$ mutants, the notochord was well formed at all levels of the rostro-caudal axis and exhibited typical shape and perinotochordal sheath (Figure 2A, D). Moreover, NTC maturation was observed with the appearance of numerous and large intracytoplasmic vacuoles. At E14.5, *Cav1*$^{-/-}$ embryos showed accumulation of NTCs in the pNP and a decrease in pVB area similar to wild-type (WT) littermates. No sign of cell loss in both notochord and NP was observed at all stages analysed. Finally, AF and CEP cells exhibited typical tissue organization found in the control mice. Moreover, periodic acid shiff/alcian blue (PAS/AB) staining did not show a significant difference in glycosaminoglycan matrix composition between *Cav1*$^{-/-}$ and WT at all stages analysed (Figure 2G-L). Chondrogenesis in pVB areas at E14.5, as well as collagen enrichment between P4 and P21 was assessed by histological staining and were shown to be similar in *Cav1*$^{-/-}$ and WT specimens. To further analyse ECM integrity, detection of COLLAGEN TYPE 6A1 (COL6A1) was performed as its expression level has been shown to increase between E12.5 and P0 (Peck et al. 2017). COL6A1 was detected in E14.5 WT embryos and positive pericellular staining was observed in NTC, and in sclerotome cells of the pAF (Figure 2M). At P4, COL6A1 exhibits positive staining in NP and CEP (Figure 2N). At P21, strong staining was observed at the periphery of the NP (Figure 2O). No obvious difference in COL6A1 distribution was noticed in *Cav1*$^{-/-}$ mutants at all stages analysed (Figure 2P-R). We conclude that ECM composition and

deposition are not impaired during IVD morphogenesis and postnatal development when *Cav1* gene is deleted.

It has been show that *Cav1* gene invalidation is sufficient to disrupt caveolae formation at the plasma membrane in numerous cell types (Le Lay and Kurzchalia 2005). Here, we provide evidences that it is also the case for NTC and NP cells, as shown by MET analysis at E14.5 and P4 (Figure 3A-D). Furthermore, immunofluorescent analysis confirmed that the absence of CAV1 protein resulted in a drastic decrease of CAVIN1 signal at E14.5 (Figure 3E, E', F, F', I, I', J, J'), and a less severe decrease at P4, as CAVIN1 protein is still observed at the plasma membrane (Figure 3M, M', N, N', Q, Q', R, R'). The absence of CAV1 also led to the redistribution of CAV2 signal from the plasma membrane of NTC and NP cells to the perinuclear Golgi compartments, as shown previously (Razani et al. 2001) (Figure 3G, G', K, K', O, O', S, S'). Similar to CAVIN1, EDH2 protein was severely reduced at the plasma membrane in both NTC at E14.5 and NP cells at P4 in *Cav1*$^{-/-}$ mutants (Figure 3H, H', L, L', P, P', T, T'). These findings demonstrate that *Cav1* expression is required for other caveolar proteins to be normally expressed and localised and that *Cav1* is essential for caveolae formation at the plasma membrane of NTCs and NP cells.

Absence of *Cav1* leads to higher proliferation capacity of NP cells at early post-natal stages

As shown previously in several tissue types, the lack of *Cav1* expression and caveolae organelles can lead to hyperproliferation (Razani et al. 2001). In addition, depending on the tissue context and stages of the tumorigenesis, *Cav1* may function both as a positive and negative regulator of the cell cycle (Raudenska et al. 2020). Thus, despite the absence of an obvious notochord and NP developmental defect, we investigated NP the proliferation pattern of NP cells from E17.5 to M1 using the proliferation nuclear marker KI-67, which is highly expressed in proliferating cells (G1, S, G2 and M phases of the cell cycle) and undetectable in cells in the G0 phase (Figure 4A-H). Quantification analysis showed no difference in total NP cells or in KI-67 positive cells at E17.5 in *Cav1*$^{-/-}$ mutants compared with WT controls (Figure 4I, M). However, at P4, *Cav1*-deficient NP showed a significant increase of total NP cell number associated with higher proliferation, as indicated by the increase of KI-67+ immunostained NP cells (Figure 4J, N). *Cav1*-deficient NP at P21 also showed a trend toward an increased number of KI-67 positive cells, although not statistically significant (Figure 4K, 4O). A previous study has shown that NP cell proliferation terminates at P21, while

apoptosis begins to be seen at 1 month (Dahia et al. 2009a). Remarkably, at this stage, even though a decrease of total NP cells was observed, a significantly higher immunoreactivity for KI-67 was maintained, indicating a shift in time of the decline of NP cell proliferation in *Cav1*$^{-/-}$ mice (Figure 4L, 4P). Moreover, assessment of apoptotic events by TUNEL analysis at P4 and P21 confirmed the presence of very few apoptotic cells in both WT and *Cav1*-deficient NP, allowing us to rule out the idea of a general apoptotic compensatory mechanism (Figure 4Q and data not shown). Interestingly, while looking at the distribution of KI-67^{+} immunostained cells within the NP at P4, we consistently noticed intense staining at the contour of the NP in controls and mutants (Figure 4R and Figure S2A-C for other stages analysed). This finding indicates that proliferative cells are preferentially found in the outermost cell layers of the NP suggesting a radial division. Nevertheless, the increase in proliferative cells in *Cav1*$^{-/-}$ mutant was observed throughout the NP area (Figure 4R). Taken together, these results are consistent with the hypothesis that caveolae could negatively regulate the proliferation of NP cells during postnatal growth.

Cav1 modulation of SHH pathway

SHH pathway activity is essential for NP cell differentiation and proliferation (Dahia et al. 2012). Caveolae are described as platforms for signalling pathways modulation and have been shown to be involved in the activation of SHH pathway *in vitro* (Schou et al. 2017). Moreover, CAV1 and PTCH1, a direct target and negative regulator of SHH pathway, have been shown to interact in caveolar microdomains *in vitro* (Karpen et al. 2001). Immunofluorescent co-staining was performed to investigate the distribution of PTCH1 and CAV1 proteins at the plasma membrane in WT NP from E17.5 to M1. Partial co-localisation was observed at all stages analysed (Figure 5A-H). PTCH1 immunostaining from E17.5 to M1 was performed in *Cav1*$^{-/-}$ mutants and littermate controls (Figure 5I-P). At E17.5, quantifications showed no difference in PTCH1 fluorescence in NP of *Cav1*$^{-/-}$ mutants as compared with WT controls (Figure 5Q). Interestingly, a significant increase in PTCH1 staining was found in mutants NP at P4 (Figure 5R), while PTCH1 staining slightly decreased at P21 and M1 in mutant NP (Figure 5S-T). Looking at the distribution of PTCH1 staining within the NP at P4, higher PTCH1 staining was consistently found in cell layers near the contour of the NP in control and *Cav1*$^{-/-}$ mutant, with a significant increase at all range's levels in the mutant NP (Figure 5U and Figure S2D-F for other stages analysed). Finally, we plotted the mean of PTCH1 fluorescence against the

number of KI-67+ proliferative cells for the NP analysed at postnatal stage P4 where significant differences were found between *Cav1*$^{-/-}$ mutants and WT controls. The correlation coefficient indicated no significant statistical relationship between the level of PTCH1 signal and the number of KI-67 proliferative cells in the NP (data not shown). Taken together, these results indicate that caveolae negatively regulate both SHH signalling activity as assessed by the level of the transcriptional target PTCH1 and the proliferation of NP cells during early stage of postnatal growth. However, causal relationships, if existing between these two phenotypes, remain to be demonstrated.

Hypoxia impacts caveolae density and NP cell proliferative capacity *in vitro*

Mature and healthy NP tissue is highly hypoxic and previous *in vitro* study has shown that hypoxia decreases caveolae number in adipocytes (Regazzetti et al. 2015; Risbud et al. 2006). In order to investigate the effect of different oxygen tensions on caveolae density in NP cells, we developed a novel 3D organotypic model starting from explanted mouse NP cells of postnatal stage (Figure 6A). Explanted-NP cells were cultured into self-organized micromasses under hypoxic (5% O2; 5% CO2; 37°C) or normoxic (21% O2; 5% CO2; 37°C) conditions. We first analysed the growth of the micromasses by the measurement of the diameter. Time course analysis showed a significant increase of the micromass diameter after 9 days in culture in hypoxia condition whereas no difference in micromass size was found when cultured in normoxia (Figure 6B). These results indicate that hypoxic conditions better mimic the physiological environment of native NP cells during their growth phase at early post-natal stages. The maintenance of NP-specific cell phenotype over the culture period in hypoxia and normoxia conditions was demonstrated by the specific assessment of BRACHUYRY (T) and SOX9 transcription factors co-immunodetection and the presence of intracytoplasmic vacuoles (Figure 6C-D', G-H'). Consistent with the difference in growth of the micromass at day 9, immunodetection of the KI-67 proliferative marker showed a marked increase of proliferation in explanted-NP cultured in hypoxia compared to normoxia (Figure 6E, I). The number of apoptotic cells detected was negligible in all of the conditions analysed indicating no significant effect on cell viability (data not shown). Nevertheless, no obvious difference in the distribution of CAV1 protein at the plasma membrane was observed between the two conditions (Figure 6F, F', J, J'). However, when caveolae density and morphology were analysed by TEM, quantification showed a significant decrease in caveolae density in

explanted-NP micromass after culture in hypoxia compared to normoxia (Figure 6K, L). The decrease in caveolae density in the hypoxic condition was associated to changes in caveolar morphology with the presence of numerous wider and shallower caveolae (Figure 6M-O and figure S3). These results highlight that caveolae number and morphology at the plasma membrane of NP cells are sensitive to oxygen tension. In addition, this finding supports the hypothesis that the decrease in caveolae density in hypoxia may be related to the increase of the proliferation observed.

Discussion

Caveolae were first described in the 60's as static structures at the plasma membrane. Following many years of research on various tissues and within distinct physiological contexts, these organelles are now recognised as dynamic components of the plasma membrane through their properties of endocytosis, and flattening and disassembling to buffer tension variations at the plasma membrane (Busija et al. 2017; Lamaze et al. 2017). The abundance of caveolae are important in cells highly exposed to stretch or shear stress or experiencing mechanical stress such as adipose, endothelial and muscle cells (Cheng and Nichols 2016). More recently demonstrated is the role of EHD2 as mechanotransducer in controlling genes transcription including genes related to cell division when released from disassembled caveolae under mechanical stress (Torrino et al. 2018). Our results show for the first time that CAV1, CAVIN1 and EHD2 proteins and caveolae are abundant at the plasma membrane in both NTCs and NP cells from early stages of IVD morphogenesis onward. Our results show that caveolae density increases from embryonic development to disc growth, and decreases with aging. Changes in caveolae morphology were also shown during IVD development, growth and maturation. These findings highlight a potent role for caveolae in the ability of NP cells to adapt to the numerous environmental changes, which occur during IVD growth, maturation and aging. They are consistent with previous studies showing that the *Cav1* gene is highly expressed in juvenile NP containing predominantly NTCs (Bach et al. 2016; Heathfield et al. 2008; Smolders et al. 2013) but also in degenerated discs (Heathfield et al. 2008). From post-natal growth to adulthood, the IVD becomes hypoxic and is exposed to high osmolarity as well as more complex mechanical stimuli that drive microenvironmental changes leading to increasing NP cell membrane tension (Palacio-Mancheno et al. 2018; Sadowska et al. 2018; Tessier et al. 2020). Thus, in this context and considering our results, we hypothesise that

caveolae can partially flatten to increase the membrane surface and protect NP cells against environmental stresses. They may also be quickly disassembled and reassembled to increase their density in a sort of positive feedback mechanism. With aging, the IVD shows reduced cellularity, water and ECM content, leading to changes in mechanical or biochemical contexts within the tissue which possibly affect caveolae distribution, morphology and consequently their function at the cellular level. Accordingly, this study highlights a decrease of caveolae density with aging. Note that this decrease could also be a consequence of the NP cellular content changes toward an enrichment of CLCs. Further analysis of caveolae density and morphology of the NP distinguishing NTCs from CLCs appears necessary to better understand caveolae dynamics during aging.

Despite the evidence of high caveolae density at the membrane of NTCs and NP cells at early postnatal stage and the demonstration that the *Cav1* gene invalidation results in the impairment to form caveolae, our phenotypic analysis surprisingly revealed no obvious defect during notochord or NP morphogenesis, nor in ECM composition. In zebrafish models, *Cavin1b* mutants present different degrees of NTC lesions along the rostro-caudal axis, which are associated with defects in locomotion (Lim et al. 2017). Indeed, the observation of NTC collapse, due to mechanical stress during early locomotion, reveals an essential role for caveolae in conveying NTCs mechanoprotection. Our findings highlight differences in caveolae functions between animal models. The absence of structural defects in the mouse mutant embryos suggests that NTCs are subjected to negligible mechanical stimuli during IVD morphogenesis. It is possible that in the mouse, the role for caveolae in conveying NTC's mechanoprotection becomes critical only from adulthood consistent with the observation of high apoptotic activity and a decreased number of viable NTCs from 1.5 months of age in *Cav1*$^{-/-}$ mice(Bach et al. 2016; Smolders et al. 2013).

A previous study reported that NP cell proliferation terminates at P21 with the onset of apoptotic events (Dahia et al. 2009a). In our study, KI-67+ NP cells were still detected at P21 and at 1 month of age in WT control littermates along with few apoptotic cells. These discrepancies can most probably be attributed to the distinct genetic backgrounds and timing differences in IVD growth and maturation. Interestingly, this study demonstrates a role for CAV1 and caveolae in the regulation of NP cell proliferative ability. Indeed, *Cav1*$^{-/-}$ mutants exhibited higher NP cell proliferation, exclusively from IVD post-natal growth up to 1 month compared to the WT littermates. Remarkably, no change in apoptosis was found in *Cav1*$^{-/-}$

mutant during IVD growth, demonstrating the primary effect of the *Cav1* gene in the regulation of proliferation. This result is in line with previous study demonstrating that the lack of the *Cav1* gene can lead to hyperproliferation of lung endothelial cells (Razani et al. 2001). In the *Cav1*$^{-/-}$ mutant, enlarged populations of stem cell in the gut, mammary gland and brain have also been reported (Baker and Tuan 2013). Indeed, there is now evidence that *Cav1* gene functions differently according to the cellular context (Baker et al. 2012). In addition, there are now wide literature linking key caveolar proteins to cancer. *CAV1* has been shown to acts as an anti-oncogene in healthy cells and primary tumours by inhibiting proliferation, as well as a pro-oncogene in late stages and metastasis (Raudenska et al. 2020).

In this study, PTCH1 a direct target of SHH pathway, was used as an indicator of SHH activity. Interestingly, quantification showed a significant increase of PTCH1 signal at the NP cell membrane in *Cav1*$^{-/-}$ mutants at early postnatal stages. This finding indicates that CAV1/caveolae can modulate the activity of the SHH pathway in NP cells. Moreover, their partial co-localisation at the plasma membrane of NP cells supports the hypothesis that a direct interaction between CAV1 and PTCH1 could result in higher SHH activity in the *Cav1*-deficient NP. CAV1 is known to inhibit certain signalling pathways. In addition, PTCH1 is proposed to present a CSD, but no structure analysis was described (Byrne et al. 2012; Collins et al. 2012; Karpen et al. 2001). Even though SHH pathway has been shown to be implicated in NP cell proliferation during post-natal growth (Dahia et al. 2012), no statistically significant correlation between increased SHH pathway activity and the level of proliferative cells was found in the present *in vivo* study. More work is needed to elucidate the mechanistic relationship between CAV1/caveolae and PTCH1 and consequently the regulation of SHH activity and NP cell proliferation. This investigation may be challenged by the influence of WNT pathway in NP cells proliferation and the complex interactions between these two pathways. Indeed, the absence of SHH ligand in NP cells leads to an increase of WNT pathway activity, while WNT inhibition contributes to a decrease of PTCH1 expression (Dahia et al. 2009b; Winkler et al. 2014). Finally, CAV1 has a role in NTC protection, notably by the maintenance of cell-junctions *via* a modulation of WNT/β-catenin pathway (Bach et al. 2016; Smolders et al. 2012; Smolders et al. 2013). Although, the synergic action and feedback loops between SHH and WNT pathways have been demonstrated, mechanisms of action remained to be characterized. Future studies need to investigate the interplay between the SHH and Wnt/-catenin signalling pathways in *Cav1* mutant mice.

The use of cellular models has been hampered by the fact that long-term-culture of native NTCs induces cell dedifferentiation resulting in the loss of notochord-associated cell characteristics *in vitro*. Here we have established a novel 3D organotypic model starting from explanted rodent NP cells. This valuable model allows the maintenance of viable cells in a differentiated state *ex vivo* as shown by the preservation of a notochord-specific phenotype (including the presence of intracytoplasmic vacuoles). Using this 3D model, we demonstrated that culture of explanted-NP cells at P4 in hypoxia showed an increase of their proliferative capacity (compared to normoxia) while maintaining their cellular identity. Hypoxia inducible factors (HIFs), which are key cellular regulators of the hypoxic response in IVD, are found constitutively active in NP cells (Rajpurohit et al. 2002). The specific deletion of *Hif-1α* in the mouse notochord results in cell death and complete disappearance of the NP, a phenotype similar to the changes usually observed during early phase of human IVD degeneration(Merceron et al. 2014). Furthermore, we provided evidence that culture under hypoxia led to a decrease of caveolae density in association with flatter caveolar morphology at the plasma membrane. These findings support the hypothesis that the increase of the proliferation observed can be related to the decrease of caveolae density. Questions remain on how CAV1/caveolae are linked to the long-term cellular response to biochemical as well as mechanical signals in IVD.

This study demonstrates the role of CAV1 and caveolae in the regulation of NP cell proliferation and of SHH signalling activity. Moreover, this study highlights a critical role of caveolae in the juvenile NP cell adaptive responses to the hypoxic microenvironment. The potent implication of caveolae in mouse IVD growth and homeostasis warrants further investigations to elucidate how CAV1 positive microdomains at the plasma membrane modulates SHH pathway activity and which mechanism controls NP cell proliferative activity. This basic knowledge contributes to the imperial need to better characterise the precise phenotype of cells with the therapeutic potential to regulate disc homeostasis and will benefit to future studies focused on regenerating the diseased IVD.

Supplementary Materials: Figure S1: *In vivo* analysis of caveolae morphology at the plasma membrane of native NTCs and NP cells. Figure S2: Distribution of KI-67+ proliferative cells and PTCH1 fluorescence from the NP contour to the NP centre in $Cav1^{+/+}$ and $Cav1^{-/-}$ mouse spine.

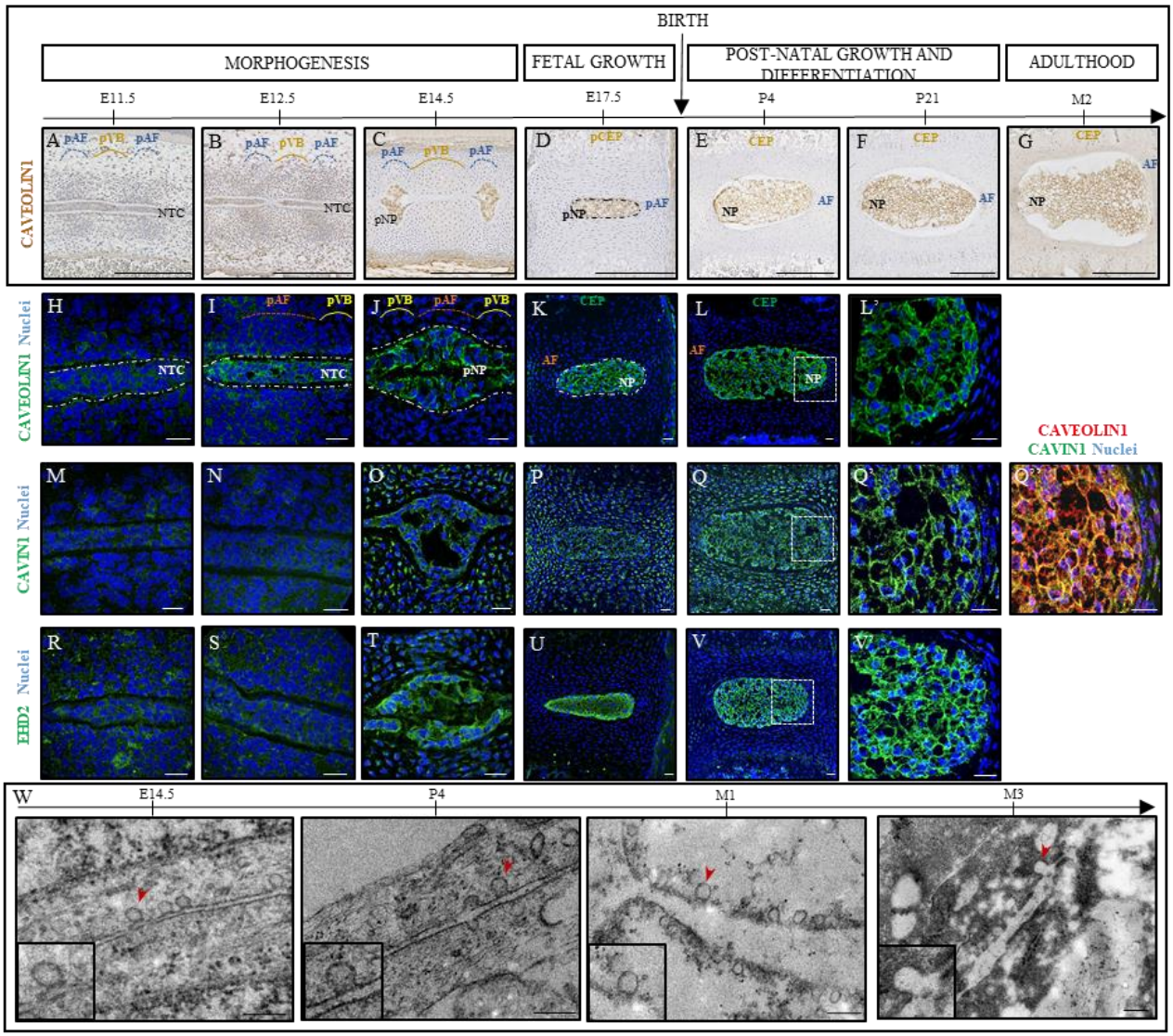
Figure S3: *In vitro* analysis of caveolae morphology at the plasma membrane of explanted-NP cells following 9 days of culture in hypoxia or normoxia.

Author Contributions: Methodology, LP, FA, KC, MD, AB, GH, FM, SLL and AC; formal analysis, LP, FA, AC and SLL; writing-original draft preparation, LP and AC; review and editing of the manuscript, AC and SLL; conceptualization, AC**;** supervision, AC; project administration, AC; funding acquisition, AC and SLL. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by INSERM and by grants from the Region Pays de la Loire (BIODIV and RFI BIOREGATE-CAVEODISC) and Arthritis Foundation (NOTOCH).

Acknowledgments: The authors would like to thank A. Henry and C. Chédeville for experimental contributions, C. Matthaeus and O. Daumke for providing EHD2 antibody, F. Manero for technical assistance for electron microscopy imaging and the SCIAM facility, C. Vesque and J. Magré for discussions, A. Mitchell and J. Guicheux for critical reading of the manuscript. We thank the staff for excellent technical assistance at Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) and SC3M facility from SFR Francois Bonamy, University of Nantes. We thank UTE-IRS-UN and SCAHU from SFR ICAT Animal facilities staff for animal care, breeding, and for their investment in the project.

Declarations of competing interests: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.


BIRTH
MORPHOGENESIS
FETAL GROWTH
POST-NATAL GROWTH AND DIFFERENTIATION
ADULTHOOD
E11.5
E12.5
E14.5
E17.5
P4
P21
M2
CAVEOLIN1
CAVEOLIN1 Nuclei
CAVIN1 Nuclei
EHD2 Nuclei
NTC
pNP
pAF
pVB
pCEP
CEP
NP
AF
W
E14.5
P4
M1
M3

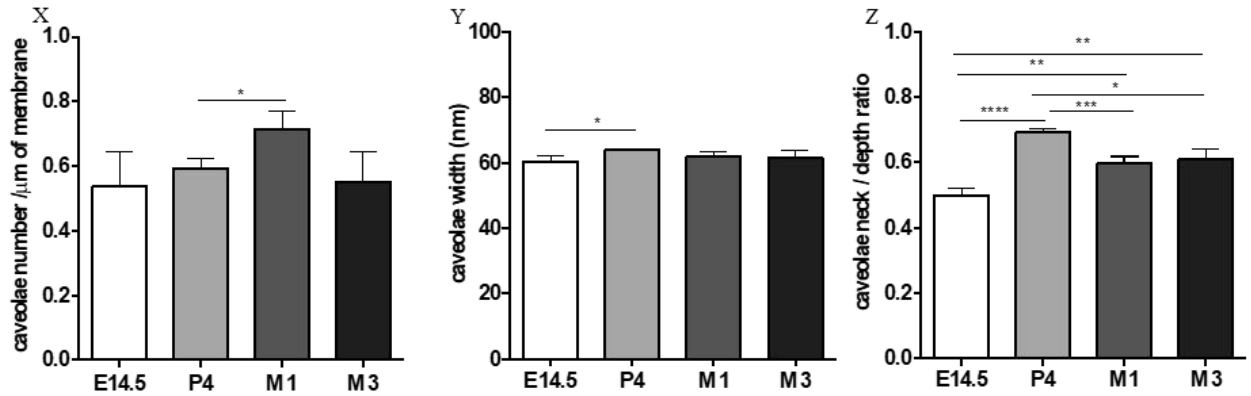

X
caveolae number /µm of membrane
Y
caveolae width (nm)
Z
caveolae neck / depth ratio
E14.5
P4
M1
M3

Figure 1: Analysis of the spatio-temporal distribution of caveolar proteins and caveolae during IVD embryonic development and early post-natal growth. Representative immunohistochemistry (IHC) or immunofluorescence (IF) for CAVEOLIN1, CAVIN1 and EHD2 proteins on mouse spine histological sections at different stages: (A-D) CAV1 IHC at embryonic days E11.5, E12.5, E14.5, E17.5 respectively ; (E-G) CAV1 IHC at four days post-natal (P4), twenty-one days (P21) and two months of age (2M) respectively; (H-K) CAV1 IF at E11.5, E12.5, E14.5, E17.5 respectively ; (L, L') CAV1 IF at P4 ; (M-P) CAVIN1 IF at E11.5, E12.5, E14.5, E17.5 respectively ; (Q,Q') CAVIN1 IF at P4 and (Q'') CAV1 and CAVIN1 overlay at P4; (R-U) EHD2 IF at E11.5, E12.5, E14.5, E17.5 respectively ; (V,V') EHD2 IDF at P4. Nuclei are stained by Mayer haematoxylin in IHC and by Hoechst in IF. Scale bar is 250 µm and 25 µm for IHC and IF respectively. IHC: n individuals =1 for each stage studied. IF: CAV1: E11.5 N=3; E12.5 N =2; E14.5 N=4; E17.5 and P4 N=2; CAVIN1: E11.5 N=4; E12.5 and E14.5 N=3; E17.5 and P4 N=2. EHD2: E11.5 N=4; E12.5 and E14.5 N=3; E17.5 and P4 N=2. NTC: notochordal cells; pAF: prospective annulus fibrosus; pCEP: prospective cartilage endplate; pNP: prospective nucleus pulposus; pVB: prospective vertebrae. (W) Transmission electron microscopy (TEM) images of NTCs from mouse embryos at E14.5 and NP cells at P4, 1 month (M1) and 3 months (M3) respectively. Arrows indicate caveolae at the plasma membrane surface. (X) Caveolae number quantification on representative TEM images of NTCs at E14.5 and of NP cells at 4 P4, M1 and M3 after birth respectively. Caveolae number was expressed per µm of plasma membrane counted for several IVD. E14.5: N individual=1, number of images = 16 corresponding to 123.8 µm of membrane; P4: N individual=4, number of images = 157 corresponding to 1005.2 µm of membrane; M1: N individual =1, number of images = 20 corresponding to 130.8 µm of membrane; M3: N individual=2, number of images = 10 corresponding to 117 µm of membrane. Mean ± SEM; two-tailed t test for comparison between two stages, *p<0.05. (Y) Caveolae width and (Z) neck:depth ratio determination in TEM images of mice embryonic NTCs (E14.5) an NP cells at P4, M1 and M3 respectively. E14.5: N individual=1, number of caveolae = 49; P4: N individual=4, number of caveolae = 542; M1: N individual=1, number of caveolae = 32; M3: N individual=2, number of caveolae = 60. Mean ± SEM; two-tailed t test for comparison between two stages, *p<0.05; **p<0.1; ***p<0.001; ****p<0.0001.

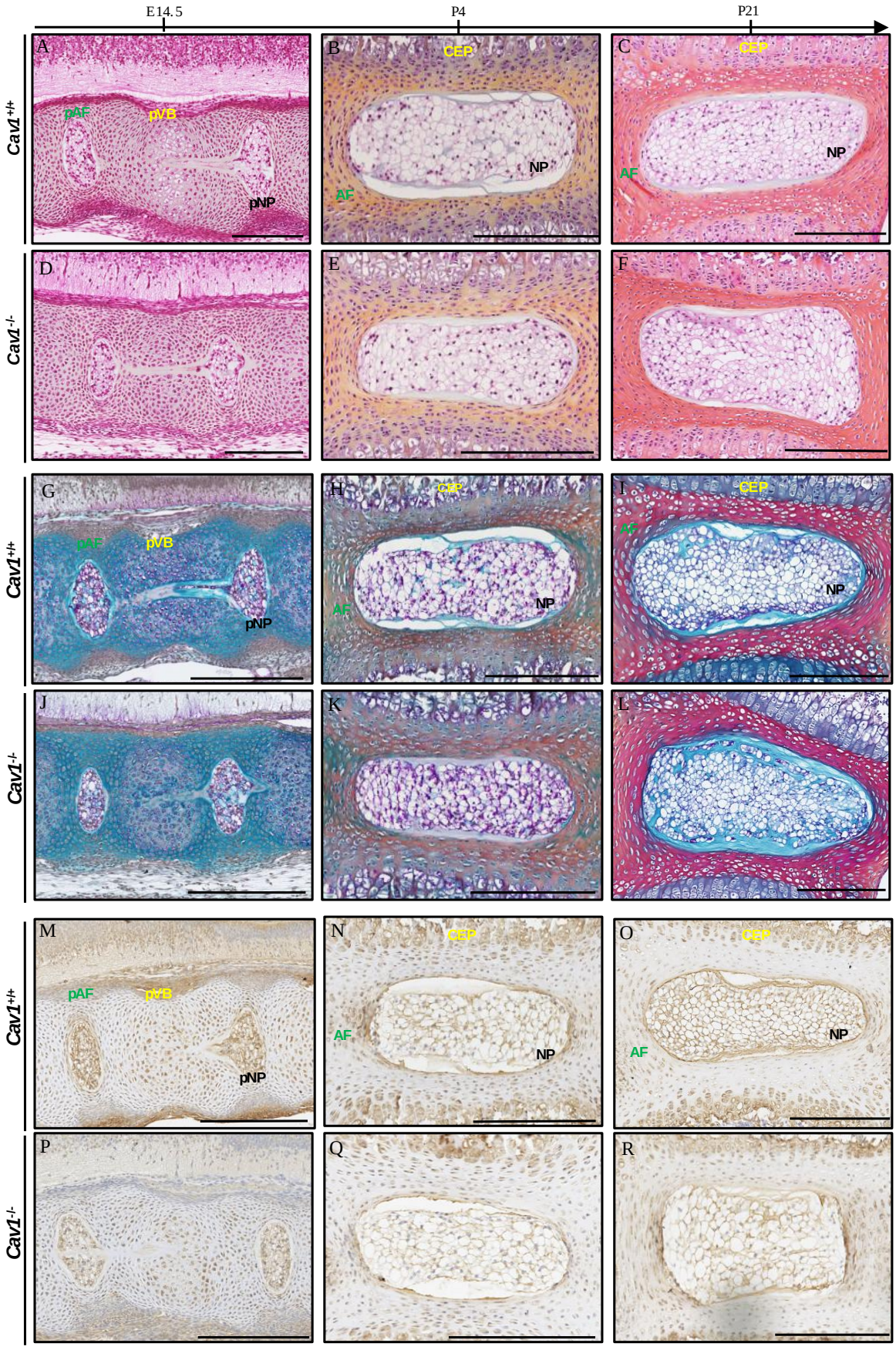

E14.5
P4
P21
Cav1+/+
Cav1-/-
Cav1+/+
Cav1-/-
Cav1+/+
Cav1-/-
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
pAF
pVB
pNP
CEP
NP
AF

Figure 2: Typical notochord and IVD morphology and matrix composition in absence of *Cav1.* **(A)** Haematoxylin Eosin Saffron (HES) staining, Periodic Acid Shiff / Alcian Blue (PAS/AB) staining and representative immunohistochemistry (IHC) of COLLAGEN TYPE VIA (COL6A) on *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections at different stages: (A, D, G, J, M, P) at embryonic day E14.5, (B, E, H, K, N, Q) at four days (P4) and (C, F, I, L, O, R) twenty-one days (P21) post-natal respectively. HES: Nuclei, ECM and cytoplasm are stained in blue-purple, orange and pink respectively; PAS/AB: Nuclei, glycosaminoglycans (GAG), and acidophilic structures are stained in blue-purple, blue and red respectively; In COL6A IHC nuclei are stained in blue by Mayer haematoxylin. Scale bar = 250 µm. For HES and PAS/AB staining: *Cav1*$^{+/+}$ N individual =2 for E14.5 and N=2 for P4 and P21; *Cav1*$^{-/-}$ N individual=2 for E14.5 and P21 and N=4 for P4. For COL6A staining: N individual =1 at all stages analysed for *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ specimens. pAF: prospective annulus fibrosus; pCEP: prospective cartilage endplate; pNP: prospective nucleus pulposus; pVB: prospective vertebrae.

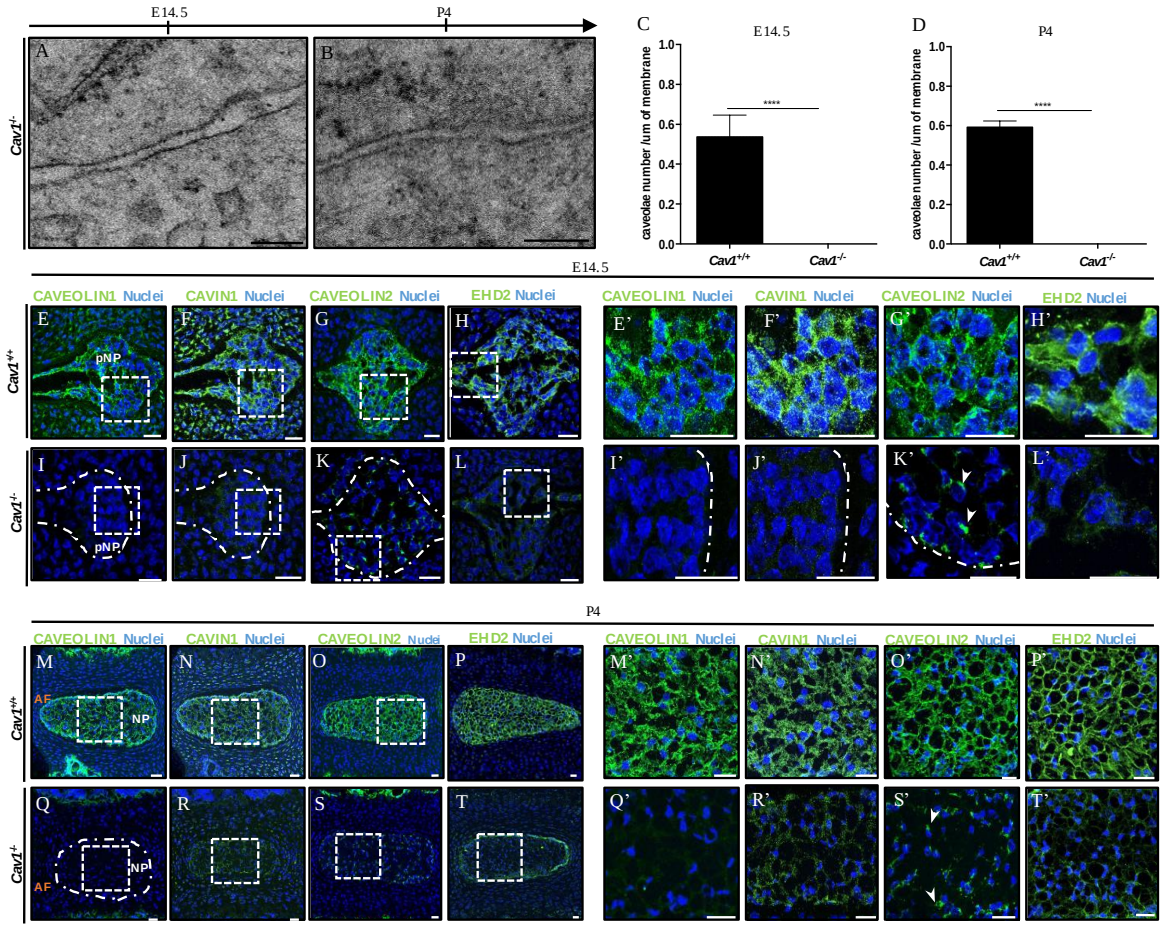


Figure 3: Lack of CAV1 results in obvious changes in the distribution of three other caveolar proteins (CAVIN1, CAVEOLIN2 and EHD2), and in the absence of caveolae. Representative transmission electron microscopy (TEM) images of: (A) NTC from *Cav1*$^{-/-}$ mice embryos at E14.5, and (B) NP cells from *Cav1*$^{-/-}$ mice at four days (P4) post-natal. Scale bar =200nm. Quantification of caveolae number per µm of membrane counted for several IVD analysed in TEM images at (C) E14.5 and (D) at P4. *Cav1*$^{+/+}$*:* E14.5 N individual=1, number of images = 16 corresponding to 123.8 µm of membrane; P4 N individual=4; number of images = 157 corresponding to 1005.2 µm of membrane; *Cav1*$^{-/-}$*:* E14.5 N individual=1, number of images = 14 corresponding to 140.985 µm of membrane; P4 N individual=2; number of images = 33 corresponding to 314.152 µm of membrane. Mean ± SEM; two-tailed t test, ****p<0,0001. Representative immunofluorescence (IF) for CAVEOLIN1 (CAV1), CAVIN1, CAVEOLIN2 (CAV2) and EHD2 proteins on *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections at different stages: (E, E', I, I') CAV1, (F, F', J, J') CAVIN1, (G, G', K, K') CAV2 and (H, H', L, L') EHD2 IF at E14.5 and (M, M', Q, Q') CAV1, (N, N', R, R') CAVIN1, (O, O', S, S') CAV2 and (P, P', T, T') EHD2 IF at P4. Nuclei are stained by Hoechst. Arrows indicate the Golgi localisation of CAV2 in *Cav1*$^{-/-}$

mutants. Scale bar = 25µm. CAV1 staining: N *Cav1*$^{+/+}$ individual = 1 for all stages studied, N *Cav1*$^{-/-}$ individual = 3 at E14.5 and N=1 at P4; CAVIN1 staining: *Cav1* $^{+/+}$ N individual = 1 for all stages studied, *Cav1* $^{-/-}$ N individual = 2 at E14.5 and N = 1 at P4; CAV2 staining: *Cav1* $^{+/+}$ N individual = 1 for all stages studied, *Cav1* $^{-/-}$ N individual = 2 at E14.5 and N = 1 at P4; EHD2 staining: N *Cav1*$^{+/+}$ individual = 1 for all stages studied, N *Cav1*$^{-/-}$ individual = 2 at E14.5 and N=1 at P4. pAF: prospective annulus fibrosus; pCEP: prospective cartilage endplate; pNP: prospective nucleus pulposus; pVB: prospective vertebrae.

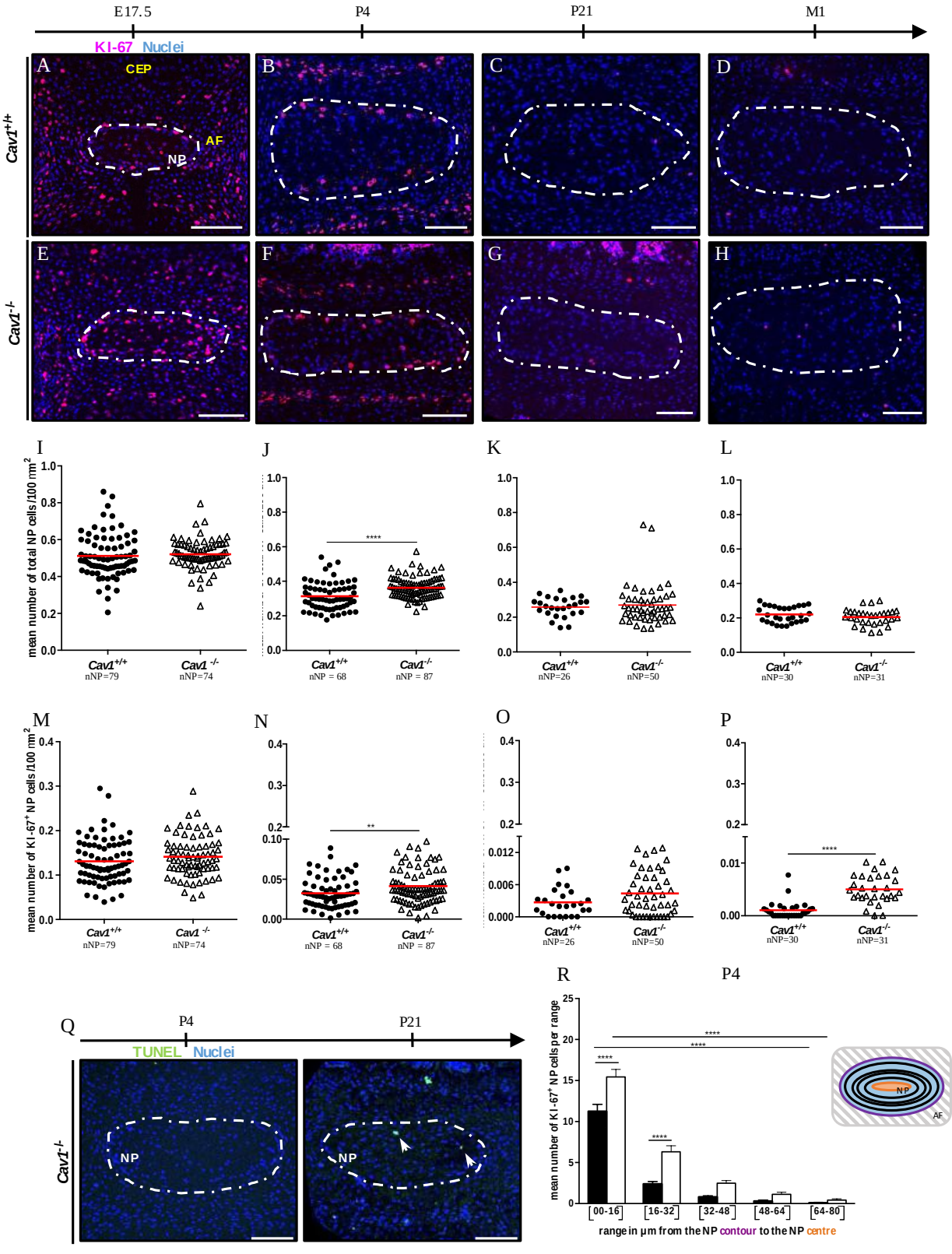

E17.5
P4
P21
M1
KI-67 Nuclei
CEP
AF
NP
Cav1+/+
Cav1-/-
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
mean number of total NP cells /100 mm2
mean number of KI-67+ NP cells /100 mm2
nNP=79
nNP=74
nNP = 68
nNP = 87
nNP=26
nNP=50
nNP=30
nNP=31
Q
TUNEL Nuclei
R
mean number of KI-67+ NP cells per range
range in µm from the NP contour to the NP centre
00-16
16-32
32-48
48-64
64-80

Figure 4: Loss of *Cav1* impairs nucleus pulposus cells proliferation capacity during post-natal growth. Representative immunofluorescence (IF) for KI-67 protein on *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections at different stages: (A, E) at E17.5, (B, F) at four days (P4), (C, G) twenty-one days (P21) and (D, H) 1month (M1) post-natal respectively. Nuclei are stained in blue by Hoechst. Scale bar = 100µm. AF: annulus fibrosus; CEP: cartilage endplate; NP: nucleus pulposus. Quantification of total number of cells and proliferative cells (KI-67^{+} cells) within the NP area (surface) of *Cav1* $^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections at different stages: (I, M) at E17.5, (J, N) at P4, (K, O) at P21 and (L, P) at M1 post-natal. Results are expressed per 100µm^2 of NP area (surface). *Cav1*$^{+/+}$ N individual = 2 for all stages studied; *Cav1*$^{-/-}$ N individual = 4 at E17.5 and P4, N=3 at 21 and N=2 at M1. Mean is indicated in red, each dot represents one NP analysed; two-tailed t test, **p<0.01; ***p<0.001. Some values were removed only to keep reasonable graphical dimension: *Cav1*$^{+/+}$ NP value (1.582941) and *Cav1*$^{-/-}$ NP value (1,293341) in graph I; *Cav1*$^{+/+}$ KI-67^{+} NP value (0.540) in graph M; *Cav1*$^{+/+}$ NP values (0.071; 0.718; 0.879) in graph J; *Cav1*$^{+/+}$ KI-67^{+} NP values (0.135; 0.169) and *Cav1*$^{-/-}$ KI-67^{+} NP values (0.1033044; 0.1148545; 0.1364872; 0.1408643) in graph N; *Cav1*$^{+/+}$ KI-67^{+} NP value (0.022) and *Cav1*$^{-/-}$ NP values (0.017; 0.020; 0.022) in graph O; *Cav1*$^{+/+}$ NP value (0.575) in graph L ; *Cav1*$^{-/-}$ KI-67^{+} NP value (0.029) in graph P. TUNEL assay on *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections at (Q) P4 and P21. Arrows in Q indicates apoptotic cells (green) at P21. Nuclei are stained by Hoechst. *Cav1*$^{+/+}$ n=1; *Cav1*$^{-/-}$ n=1. (R) Distribution of KI-67^{+} cells within the NP (in range of µm from the NP contour to the NP centre) of *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections at P4. For N individuals, refer to B and F. Mean ± SEM, two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. ***p<0.001; ****p<0.0001.

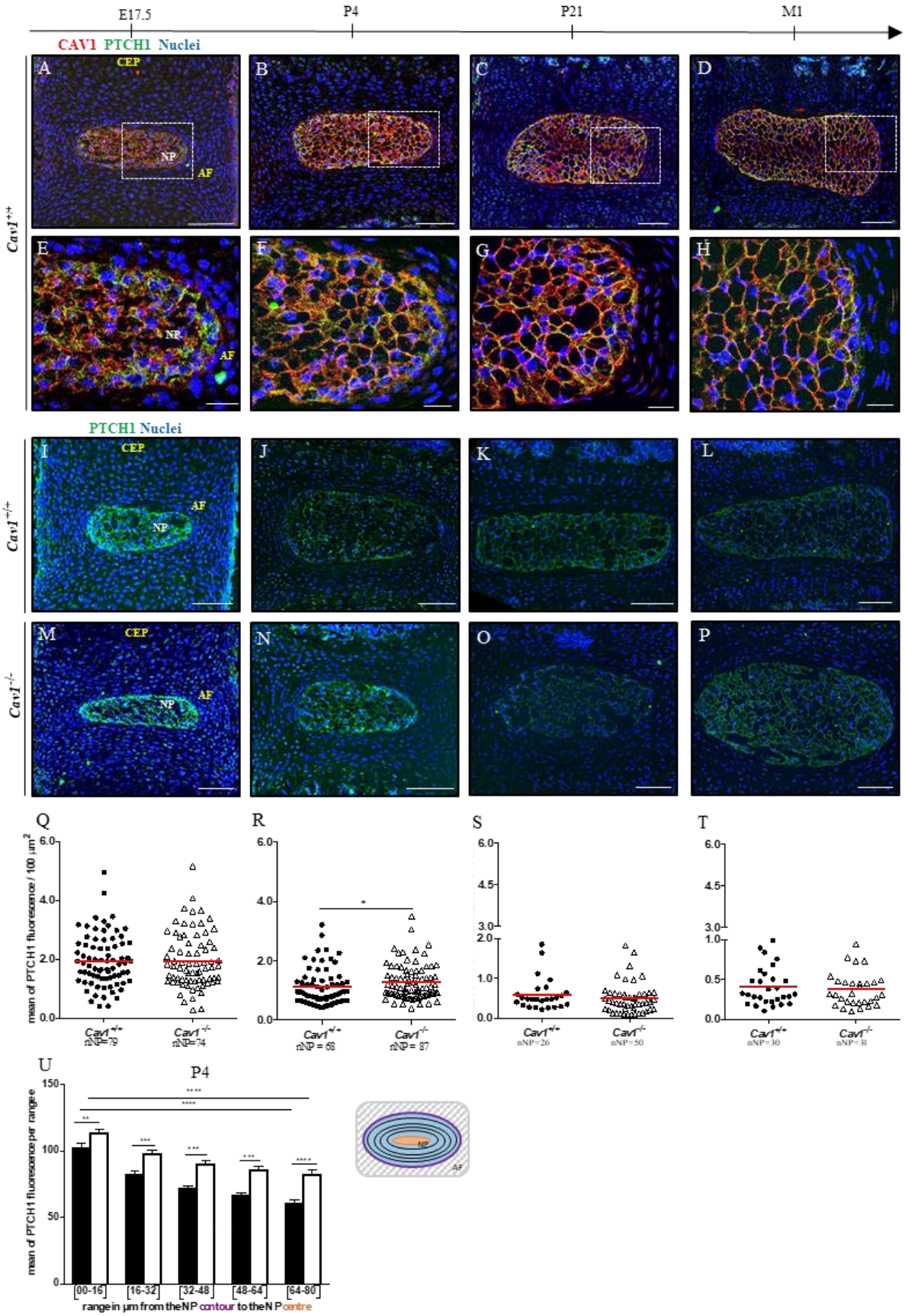

E17.5
P4
P21
M1
CAV1 PTCH1 Nuclei
PTCH1 Nuclei
Cav1+/+
Cav1-/+
Cav1-/-
CEP
NP
AF
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
mean of PTCH1 fluorescence / 100 µm2
Cav1+/+ nNP=79
Cav1-/- nNP=74
Cav1+/+ nNP = 68
Cav1-/- nNP= 87
Cav1+/+ nNP=26
Cav1-/- nNP=50
Cav1+/+ nNP=30
Cav1-/- nNP=31
P4
mean of PTCH1 fluorescence per range e
[00-16]
[16-32]
[32-48]
[48-64]
[64-80]
range in µm from the NP contour to the N P centre

Figure 5: Loss of *Cav1* impairs SHH signalling pathway during post-natal growth. Representative immunofluorescence (IF) of PTCH1 and CAVEOLIN1 (CAV1) proteins on *Cav1*$^{+/+}$ mouse spine histological sections at different stages: (A, E) at embryonic day E17.5, (B, F) at four days (P4), (C, G) at twenty-one days (P21) and (D, H) at 1month (M1) respectively. Nuclei are stained by Hoechst. Scale bar = 100 µm. N individual = 2 at E17.5, P4 and P21; N=3 at M1**.** Representative IF of PTCH1 on *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections at stages: (I, M) at E17.5, (J, N) at P4, (K, O) at P21 and (L, P) at M1 post-natal respectively. Nuclei are stained by Hoechst. Scale bar = 100 µm. AF: annulus fibrosus; CEP: cartilage endplate; NP: nucleus pulposus. Quantification of PTCH1 total fluorescence on *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ spine histological sections at different stages: (Q) at E17.5, (R) at P4, (S) at P21 and (T) at M1 respectively. *Cav1*$^{+/+}$ N individual = 2 for all stages studied; *Cav1*$^{-/-}$ N individual = 4 at E17.5 and P4, N=3 at P21 and N=2 at M1. Mean is indicated in red, each dot represents one NP analysed, two-tailed t test; *p<0.05. Some values were removed only for the graphical representation: *Cav1*$^{+/+}$ NP values (6.010; 7.413) in graph Q; *Cav1*$^{+/+}$ NP value (1.501285) and 1 *Cav1*$^{-/-}$ NP value (3.137) in graph T. (U) Distribution of PTCH 1 fluorescence within the NP (in range of µm from the NP contour to the NP centre) of *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ mouse spine histological sections at P4. For N individual, refer to R. Mean ± SEM, two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

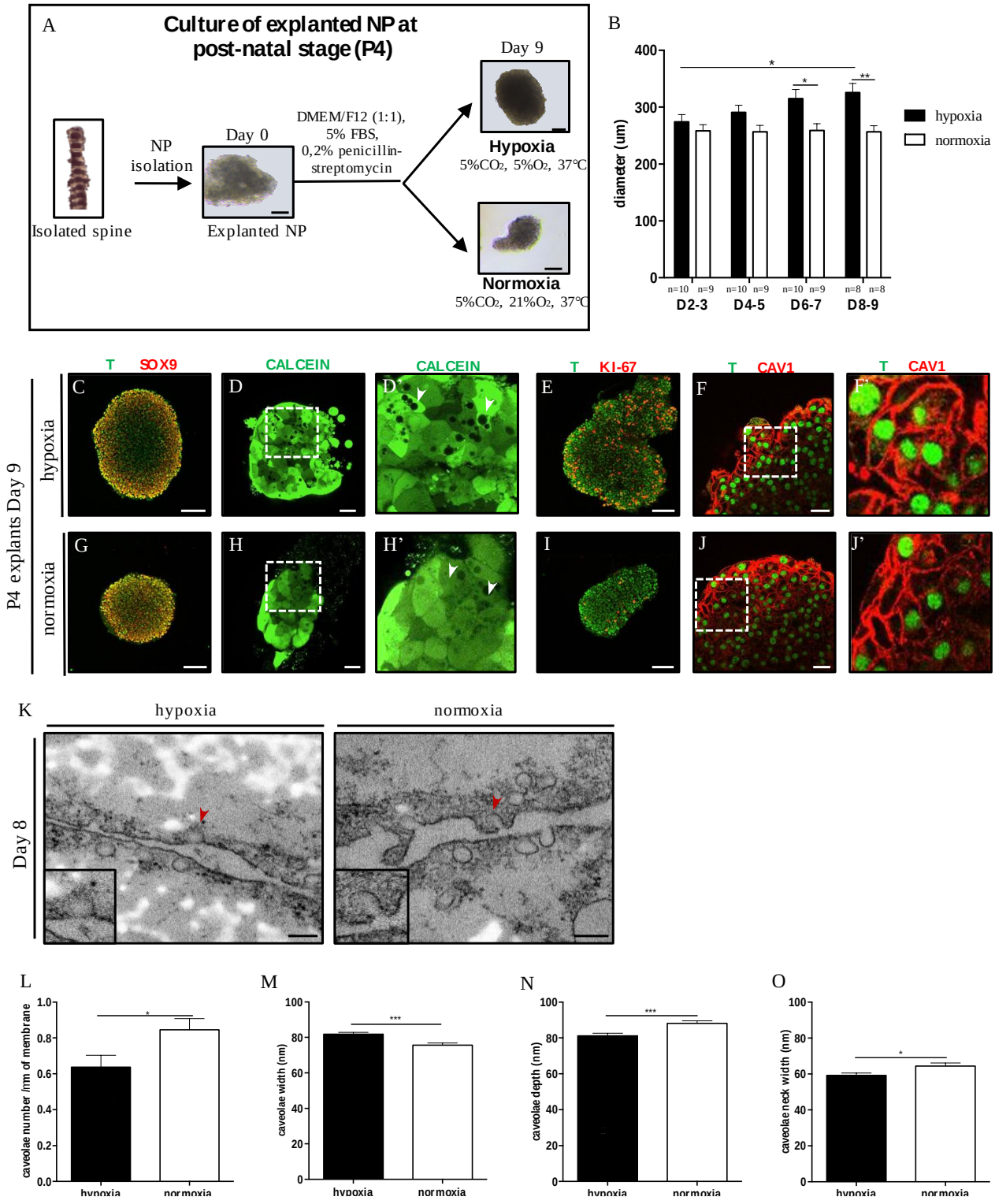
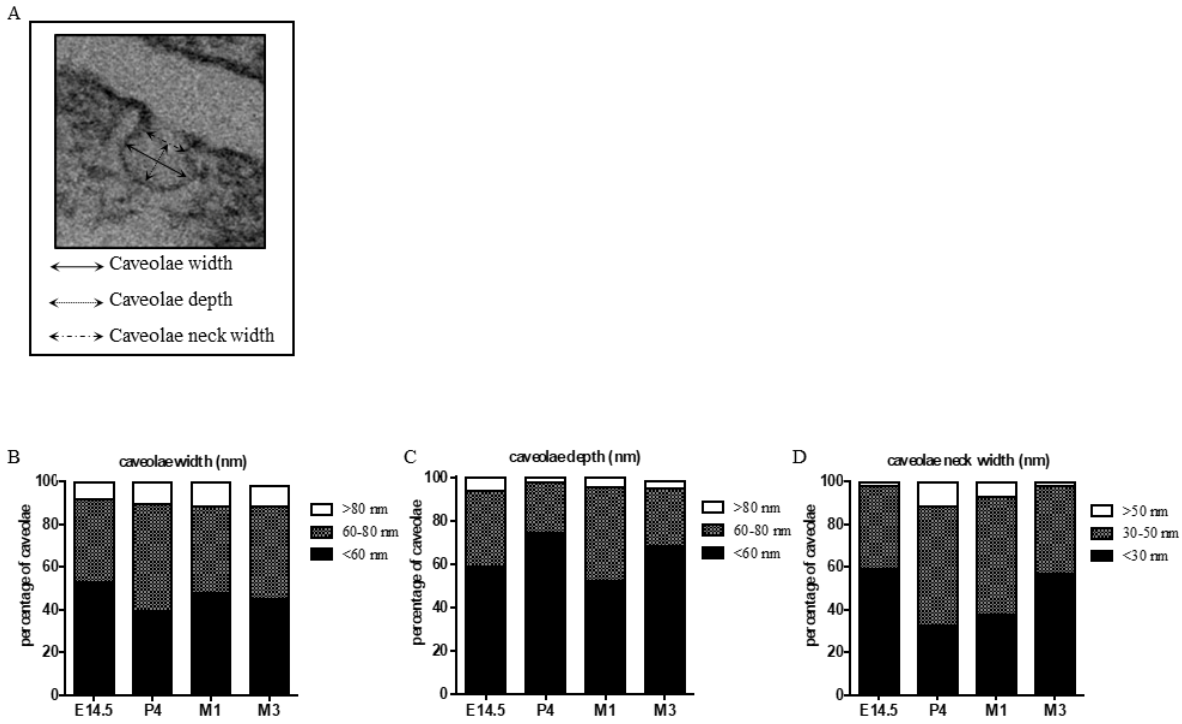
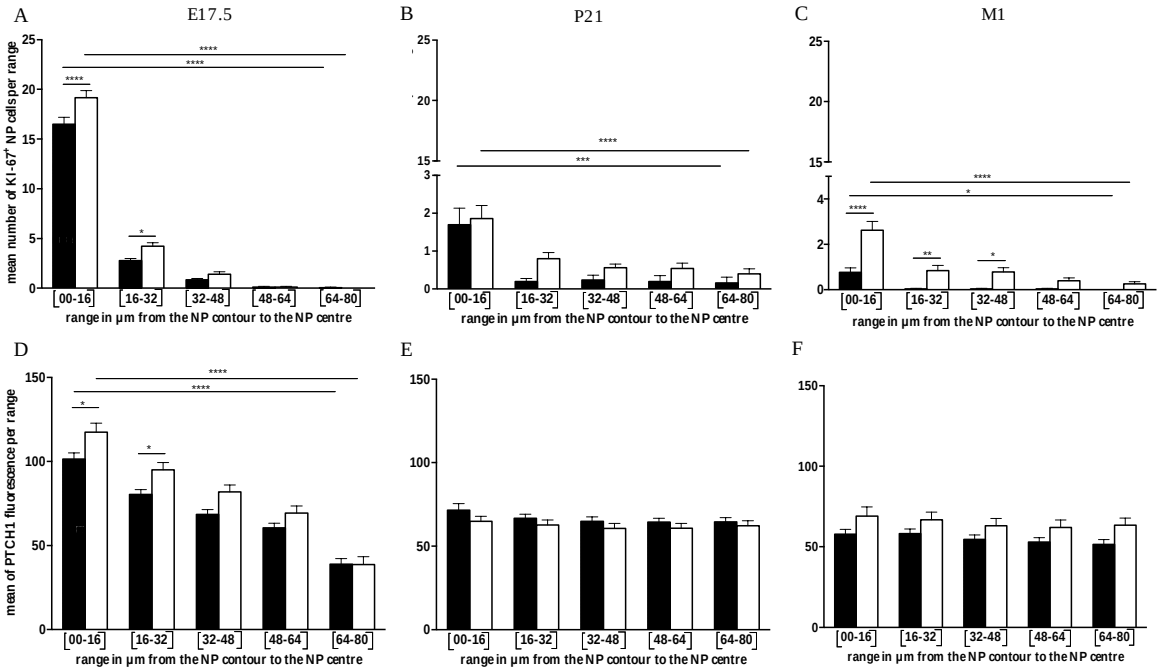

A
Culture of explanted NP at post-natal stage (P4)
Isolated spine
NP isolation
Day 0
Explanted NP
DMEM/F12 (1:1), 5% FBS, 0,2% penicillin-streptomycin
Day 9
Hypoxia
5%CO2, 5%O2, 37°C
Normoxia
5%CO2, 21%O2, 37°C
B
diameter (um)
hypoxia
normoxia
D2-3
D4-5
D6-7
D8-9
T SOX9
CALCEIN
CALCEIN
T KI-67
T CAV1
T CAV1
P4 explants Day 9
hypoxia
normoxia
K
hypoxia
normoxia
Day 8
L
caveolae number /mm of membrane
M
caveolae width (nm)
N
caveolae depth (nm)
O
caveolae neck width (nm)

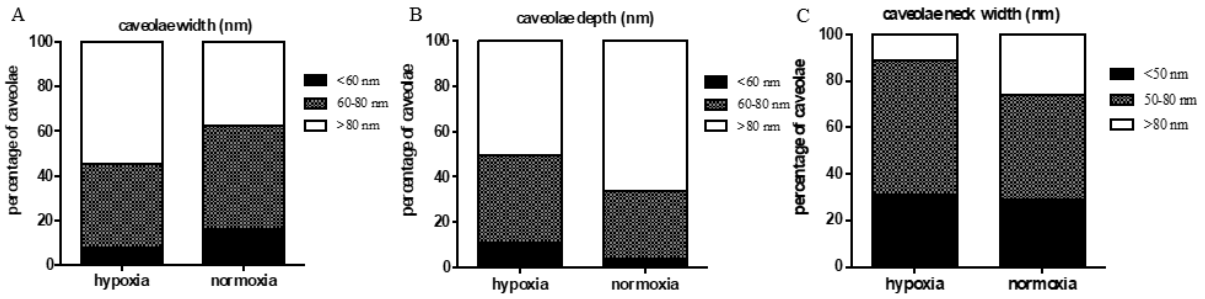
Figure 6: Hypoxia impairs caveolae density and morphology at the plasma membrane, and promotes explanted-NP cell growth. (A) Representative experimental design for 3D *in vitro* culture of mice explanted-NP cells in hypoxia and normoxia during 9 days. (B) Growth is represented by the measure of the diameter of micromass in µm. N number of experiment is indicated under each histogram; number of NP analysed is ≥130 per day, and per condition. Mean ± SEM. Two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-hoc for multiple group comparison. *p<0.05; **p<0.01. Representative immunofluorescence (IF) for (C, G) T (BRACHYURY)-SOX9 proteins (hypoxia N=15; normoxia N=6), (D, D', H, H') calcein staining (N=1 per condition). Arrows indicate intracytoplasmic vacuoles. (E, I) T-KI67 proteins (hypoxia N=10, normoxia N=9) and (F, F', J, J') T-CAVEOLIN1 (CAV1) proteins (hypoxia N=14; normoxia N=6) in explanted-NP cells cultured in hypoxia or normoxia during 9 days. T and SOX9 are phenotypic markers for NP cells, and KI-67+ cells are proliferative. Scale bar = 100µm and 25µm in C, G, E, I and D, H, F, J respectively. (K) Transmission electron microscopy (TEM) images of explanted-NP cells at P4 cultured in hypoxia or normoxia, during 8 days. Arrows indicate caveolae at the plasma membrane. (L) Caveolae number quantification in representative transmission electron microscopy (TEM) images of mouse explanted-NP cells at P4 and cultured in hypoxia and normoxie during 8 days. Caveolae number was expressed per µm of plasma membrane counted. Hypoxia: N experiment = 1, number of images = 17 corresponding to 179.083 µm of membrane; Normoxia: N experiment =1, number of images = 33 corresponding to 302.635 µm of membrane. Mean ± SEM; two-tailed t test, *p<0.05. Caveolae (M) width, (N) depth and (O) neck width size determination in TEM images of explanted-NP cells at P4 and cultured during 8 days in hypoxia or normoxia. For N experimental refer to L. Hypoxia: caveolae number = 180; Normoxia: caveolae number = 149. Mean ± SEM; two-tailed t test; *p< 0.05; ***p< 0.001.



Supplementary Figure 1: *In vivo* analysis of caveolae morphology at the plasma membrane of native notochordal and NP cells. (A) Representative image of caveolae obtained by transmission electron microscopy (TEM) with indications of the measured parameters to determine caveolar invaginations morphology, i.e. width (at its widest point), depth (from the top to the base) and neck width. The ratio of neck to depth was used as an indicator of caveolar shape. Representative distribution in percentage of caveolae per range of size for (B) width (nm), (C) depth and (D) neck width determined in TEM images of mice embryonic NTCs (E14.5) and NP cells at 4 days (P4), 1 month (M1) and 3 months (M3) post-natal respectively. E14.5: N individual=1, number of caveolae = 49; P4: N individuals=4, number of caveolae = 542; M1: N individual=1, number of caveolae = 32; M3: N individuals=2, number of caveolae = 60.



Supplementary Figure 2: Distribution of KI-67+ proliferative cells and PTCH1 fluorescence from the NP contour to the NP centre in *Cav1*$^{+/+}$ and *Cav1*$^{-/-}$ spine. Distribution of (A-C) KI-67^{+} cells and (D-F) PTCH1 fluorescence intensity within the NP in range of µm from the NP contour to the NP centre on spine histological sections at four days (P4). *Cav1*$^{+/+}$ N individual = 2 for all stages studied; *Cav1*$^{-/-}$ N individual = 4 at E17.5, N=3 at P21 and N=2 at M1. Mean ± SEM, two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.



Supplementary Figure 3: *In vitro* analysis of caveolae morphology at the plasma membrane of explanted-NP cells following 9 days of culture in hypoxia or normoxia. Representative distribution in percentage of caveolae per range of size for (A) width (nm), (B) depth and (C) neck width determined in TEM images of mice explanted-NP cells at four days (P4) and after nine days of culture in hypoxia (5%O_2, 5%CO_2, 37°C, humid chamber), number of caveolae = 180; or normoxia (5%O_2, 21%CO_2, 37°C, humid chamber), number of caveolae = 149.

References

Aszódi, Attila, Danny Chan, Ernst Hunziker, John F. Bateman, and Reinhard Fässler. 1998. "Collagen II Is Essential for the Removal of the Notochord and the Formation of Intervertebral Discs." *Journal of Cell Biology* 143 (5): 1399–1412. https://doi.org/10.1083/jcb.143.5.1399.

Bach, F. C., S. A.H. de Vries, A. Krouwels, L. B. Creemers, K. Ito, B. P. Meij, and M. A. Tryfonidou. 2015. "The Species-Specific Regenerative Effects of Notochordal Cell-Conditioned Medium on Chondrocyte-like Cells Derived from Degenerated Human Intervertebral Discs." *European Cells and Materials* 30: 132–47. https://doi.org/10.22203/eCM.v030a10.

Bach, F. C., S. A.H. de Vries, F. M. Riemers, J. Boere, F. W.M. van Heel, M. van Doeselaar, S. S. Goerdayal, et al. 2016. "Soluble and Pelletable Factors in Porcine, Canine and Human Notochordal Cell-Conditioned Medium: Implications for IVD Regeneration." *European Cells and Materials* 32: 163–80. https://doi.org/10.22203/eCM.v032a11.

Bach, Frances C., Kim M. Rooij, Frank M. Riemers, Joseph W. Snuggs, Willem A. M. Jong, Ying Zhang, Laura B. Creemers, Danny Chan, Christine Le Maitre, and Marianna A. Tryfonidou. 2019. "Hedgehog Proteins and Parathyroid Hormone-related Protein Are Involved in Intervertebral Disc Maturation, Degeneration, and Calcification." *Jor Spine* 2 (4): 1–15. https://doi.org/10.1002/jsp2.1071.

Bach, Frances C., Ying Zhang, Alberto Miranda-Bedate, Lucy C. Verdonschot, Niklas Bergknut, Laura B. Creemers, Keita Ito, et al. 2016. "Increased Caveolin-1 in Intervertebral Disc Degeneration Facilitates Repair." *Arthritis Research and Therapy* 18 (1): 1–15. https://doi.org/10.1186/S13075-016-0960-Y.

Baker, Natasha, and Rocky S. Tuan. 2013. "The Less-Often-Traveled Surface of Stem Cells: Caveolin-1 and Caveolae in Stem Cells, Tissue Repair and Regeneration." *Stem Cell Research and Therapy* 4 (4): 1–13. https://doi.org/10.1186/scrt276.

Baker, Natasha, Guofeng Zhang, Yang You, and Rocky S. Tuan. 2012. "Caveolin-1 Regulates Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (12): 3773–87. https://doi.org/10.1002/jcb.24252.

Bedore, Jake, Wei Sha, Matthew R. McCann, Shangxi Liu, Andrew Leask, and Cheryle A. Séguin. 2013. "Impaired Intervertebral Disc Development and Premature Disc Degeneration in Mice with Notochord-Specific Deletion of CCN2." *Arthritis and Rheumatism* 65 (10): 2634–44. https://doi.org/10.1002/art.38075.

Bian, Qin, Lei Ma, Amit Jain, Janet L. Crane, Khaled Kebaish, Mei Wan, Zhengdong Zhang, et al. 2017. "Mechanosignaling Activation of TGFβ Maintains Intervertebral Disc Homeostasis." *Bone Research* 5 (January): 1–14. https://doi.org/10.1038/boneres.2017.8.

Bonavita R, Vincent K, Pinelli R, Dahia CL. Formation of the sacrum requires down-regulation of sonic hedgehog signaling in the sacral intervertebral discs. Biol Open.

2018;7(7):bio035592. Published 2018 Jul 24. doi:10.1242/bio.035592

Briand, Nolwenn, Cécilia Prado, Guillaume Mabilleau, Franc¸oise Lasnier, Xavier Le Lièpvre, Jeffrey D. Covington, Eric Ravussin, Soazig Le Lay, and Isabelle Dugail. 2014. "Caveolin-1 Expression and Cavin Stability Regulate Caveolae Dynamics in Adipocyte Lipid Store Fluctuation." *Diabetes* 63 (12): 4032–44. https://doi.org/10.2337/db13-1961.

Busija, Anna R., Hemal H. Patel, and Paul A. Insel. 2017. "Caveolins and Cavins in the Trafficking, Maturation, and Degradation of Caveolae: Implications for Cell Physiology." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 312 (4): C459–77. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00355.2016.

Byrne, Dominic P., Caroline Dart, and Daniel J. Rigden. 2012. "Evaluating Caveolin Interactions: Do Proteins Interact with the Caveolin Scaffolding Domain through a Widespread Aromatic Residue-Rich Motif?" *PLoS ONE* 7 (9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044879.

Cheng, Jade P.X., and Benjamin J. Nichols. 2016. "Caveolae: One Function or Many?" *Trends in Cell Biology* 26 (3): 177–89. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.010.

Chiang, Chin, Ying Litingtung, Eric Lee, Keith E. Young, Jeffrey L. Corden, Heiner Westphal, and Philip A. Beachy. 1996. "Cyclopia and Defective Axial Patterning in Mice Lacking Sonic Hedgehog Gene Function." *Nature*. https://doi.org/10.1038/383407a0.

Choi, K.-S., and B. D. Harfe. 2011. "Hedgehog Signaling Is Required for Formation of the Notochord Sheath and Patterning of Nuclei Pulposi within the Intervertebral Discs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (23): 9484–89. https://doi.org/10.1073/pnas.1007566108.

Choi, Kyung Suk, Martin J. Cohn, and Brian D. Harfe. 2008. "Identification of Nucleus Pulposus Precursor Cells and Notochordal Remnants in the Mouse: Implications for Disk Degeneration and Chordoma Formation." *Developmental Dynamics* 237 (12): 3953–58. https://doi.org/10.1002/dvdy.21805.

Clouet, Johann, Gaël Grimandi, Marianne Pot-Vaucel, Martial Masson, Hakim B. Fellah, Lydie Guigand, Yan Cherel, et al. 2009. "Identification of Phenotypic Discriminating Markers for Intervertebral Disc Cells and Articular Chondrocytes." *Rheumatology (Oxford, England)* 48 (11): 1447–50. https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep262.

Collins, Brett M., Melissa J. Davis, John F. Hancock, and Robert G. Parton. 2012. "Structure-Based Reassessment of the Caveolin Signaling Model: Do Caveolae Regulate Signaling through Caveolin-Protein Interactions?" *Developmental Cell* 23 (1): 11–20. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.012.

Corallo, Diana, Valeria Trapani, and Paolo Bonaldo. 2015. "The Notochord: Structure and Functions." *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (16): 2989–3008. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1897-z.

Dahia, Chitra Lekha, Eric J. Mahoney, Atiq A. Durrani, and Christopher Wylie. 2009a. "Postnatal

Growth, Differentiation, and Aging of the Mouse Intervertebral Disc." *Spine* 34 (5): 447–55. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181990c64.

Dahia, Chitra Lekha, Eric J Mahoney, Atiq A Durrani, and Christopher Wylie. 2009b. "Intercellular Signaling Pathways Active During Intervertebral Disc Growth , Differentiation , and Aging" 34 (5): 456–62.

Dahia, Chitra Lekha, Eric Mahoney, and Christopher Wylie. 2012. "Shh Signaling from the Nucleus Pulposus Is Required for the Postnatal Growth and Differentiation of the Mouse Intervertebral Disc." Edited by Christoph Englert. *PLoS ONE* 7 (4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035944.

Dai, Sheng Ming, Zheng Zheng Shan, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko-Hongo, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, and Kazuo Yudoh. 2006. "Catabolic Stress Induces Features of Chondrocyte Senescence through Overexpression of Caveolin 1: Possible Involvement of Caveolin 1-Induced down-Regulation of Articular Chondrocytes in the Pathogenesis of Osteoarthritis." *Arthritis and Rheumatism* 54 (3): 818–31. https://doi.org/10.1002/art.21639.

DiPaola, Christian P., James C. Farmer, Katia Manova, and Lee A. Niswander. 2005. "Molecular Signaling in Intervertebral Disk Development." *Journal of Orthopaedic Research* 23 (5): 1112–19. https://doi.org/10.1016/j.orthres.2005.03.008.

Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, et al. 2001. "Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice." *Science* 293 (5539): 2449–52. https://doi.org/10.1126/science.1062688.

Garcia, Jamie, Jennifer Bagwell, Brian Njaine, James Norman, Daniel S. Levic, Susan Wopat, Sara E. Miller, et al. 2017. "Sheath Cell Invasion and Trans-Differentiation Repair Mechanical Damage Caused by Loss of Caveolae in the Zebrafish Notochord." *Current Biology* 27 (13): 1982–89. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.035.

Heathfield, Sarah Kathleen, Christine Lyn Le Maitre, and Judith Alison Hoyland. 2008. "Caveolin-1 Expression and Stress-Induced Premature Senescence in Human Intervertebral Disc Degeneration." *Arthritis Research and Therapy* 10 (4): 1–9. https://doi.org/10.1177/0954410016650710.

Hsieh, Adam H., and Julianne D. Twomey. 2010. "Cellular Mechanobiology of the Intervertebral Disc: New Directions and Approaches." *Journal of Biomechanics* 43 (1): 137–45. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.019.

Hunter, Christopher J., John R. Matyas, and Neil A. Duncan. 2004. "Cytomorphology of Notochordal and Chondrocytic Cells from the Nucleus Pulposus: A Species Comparison." *Journal of Anatomy* 205 (5): 357–62. https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2004.00352.x.

James, Spencer L., Degu Abate, Kalkidan Hassen Abate, Solomon M. Abay, Cristiana Abbafati, Nooshin Abbasi, Hedayat Abbastabar, et al. 2018. "Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 354 Diseases and Injuries for 195 Countries and Territories, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of

Disease Study 2017." *The Lancet* 392 (10159): 1789–1858. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7.

Karpen, Heidi E., John T. Bukowski, Thomas Hughes, Jean Philíppe Gratton, William C. Sessa, and Mac R. Gailani. 2001. "The Sonic Hedgehog Receptor Patched Associates with Caveolin-1 in Cholesterol-Rich Microdomains of the Plasma Membrane." *Journal of Biological Chemistry* 276 (22): 19503–11. https://doi.org/10.1074/jbc.M010832200.

Krajewska, Wanda M, and Izabela Maslowska. 2004. "Caveolins: Structure and Function in Signal Transduction Wanda." *Cellular & Molecular Biology Letters* 9 (December 2003): 195–220.

Lamaze, Christophe, Nicolas Tardif, Melissa Dewulf, Stéphane Vassilopoulos, and Cédric M. Blouin. 2017. "The Caveolae Dress Code: Structure and Signaling." *Current Opinion in Cell Biology* 47: 117–25. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.014.

Lawson, Lisa Y., and Brian D. Harfe. 2017. "Developmental Mechanisms of Intervertebral Disc and Vertebral Column Formation." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 6 (6). https://doi.org/10.1002/wdev.283.

Lay, Soazig Le, and Teymuras V. Kurzchalia. 2005. "Getting Rid of Caveolins: Phenotypes of Caveolin-Deficient Animals." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1746 (3): 322–33. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.06.001.

Lefebvre, Véronique. 2019. "Roles and Regulation of SOX Transcription Factors in Skeletogenesis." *Current Topics in Developmental Biology* 133: 171–93. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.007.

Lim, Ye Wheen, Harriet P Lo, Charles Ferguson, Nick Martel, Jean Giacomotto, Guillermo A. Gomez, Alpha S Yap, Thomas E Hall, and Robert G. Parton. 2017. "Caveolae Protect Notochord Cells against Catastrophic Mechanical Failure during Development." *Current Biology* 27 (13): 1968–81. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.067.

Ludwig, Alexander, Gillian Howard, Carolina Mendoza-Topaz, Thomas Deerinck, Mason Mackey, Sara Sandin, Mark H. Ellisman, and Benjamin J. Nichols. 2013. "Molecular Composition and Ultrastructure of the Caveolar Coat Complex." *PLoS Biology* 11 (8). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001640.

Maier, J A, Y Lo, and B D Harfe. 2013. "Foxa1 and Foxa2 Are Required for Formation of the Intervertebral Discs." *PLoS ONE* 8 (1): 55528. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055528.

Matthaeus, Claudia, Xiaoming Lian, Séverine Kunz, Martin Lehmann, Cheng Zhong, Carola Bernert, Ines Lahmann, Dominik N. Müller, Maik Gollasch, and Oliver Daumke. 2019. "ENOS-NO-Induced Small Blood Vessel Relaxation Requires EHD2-Dependent Caveolae Stabilization." *PLoS ONE* 14 (10): 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223620.

Mayoral, Rafael, Ángela Valverde, Cristina Llorente Izquierdo, Águeda González Rodriguez, Lisardo Boscá, and Paloma Martín-sanz. 2010. "Impairment of Transforming Growth

Factor Signaling in Caveolin-1-Deficient Hepatocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (6): 3633–42. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.072900.

McCann, Matthew R., Owen J. Tamplin, Janet Rossant, and Cheryle A. Seğuin. 2012. "Tracing Notochord-Derived Cells Using a Noto-Cre Mouse: Implications for Intervertebral Disc Development." *DMM Disease Models and Mechanisms* 5 (1): 73–82. https://doi.org/10.1242/dmm.008128.

McCann, Matthew, and Cheryle Séguin. 2016. "Notochord Cells in Intervertebral Disc Development and Degeneration." *Journal of Developmental Biology* 4 (1): 3. https://doi.org/10.3390/jdb4010003.

Mehrkens, Arne, M. Karim, Sarah Kim, Raychel Hilario, Michael Fehlings, and William Erwin. 2013. "Canine Notochordal Cell-Secreted Factors Protect Murine and Human Nucleus Pulposus Cells from Apoptosis by Inhibition of Activated Caspase-9 and Caspase-3/7." *Evidence-Based Spine-Care Journal* 04 (02): 154–56. https://doi.org/10.1055/s-0033-1357363.

Merceron, Christophe, Laura Mangiavini, Alexander Robling, Tremika Leshan Wilson, Amato J. Giaccia, Irving M. Shapiro, Ernestina Schipani, and Makarand V. Risbud. 2014. "Loss of HIF-1α in the Notochord Results in Cell Death and Complete Disappearance of the Nucleus Pulposus." *PLoS ONE* 9 (10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110768.

Mohanty, Sarthak, and Chitra L. Dahia. 2019. "Defects in Intervertebral Disc and Spine during Development, Degeneration, and Pain: New Research Directions for Disc Regeneration and Therapy." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 8 (4): 1–24. https://doi.org/10.1002/wdev.343.

Mohanty, Sarthak, Robert Pinelli, Paul Pricop, Todd J. Albert, and Chitra Lekha Dahia. 2019. "Chondrocyte-like Nested Cells in the Aged Intervertebral Disc Are Late-Stage Nucleus Pulposus Cells." *Aging Cell* 18 (5): 1–5. https://doi.org/10.1111/acel.13006.

Morén, Björn, Claudio Shah, Mark T. Howes, Nicole L. Schieber, Harvey T. McMahon, Robert G. Parton, Oliver Daumke, and Richard Lundmark. 2012. "EHD2 Regulates Caveolar Dynamics via ATP-Driven Targeting and Oligomerization." *Molecular Biology of the Cell* 23 (7): 1316–29. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0787.

Neidlinger-Wilke, Cornelia, Fabio Galbusera, Harris Pratsinis, Eleni Mavrogonatou, Antje Mietsch, Dimitris Kletsas, and Hans Joachim Wilke. 2014. "Mechanical Loading of the Intervertebral Disc: From the Macroscopic to the Cellular Level." *European Spine Journal* 23 (SUPPL. 3): 332–43. https://doi.org/10.1007/s00586-013-2855-9.

Nixon, Susan J., Adrian Carter, Jeremy Wegner, Charles Ferguson, Matthias Floetenmeyer, Jamie Riches, Brian Key, Monte Westerfield, and Robert G. Parton. 2007. "Caveolin-1 Is Required for Lateral Line Neuromast and Notochord Development." *Journal of Cell Science* 120 (13): 2151–61. https://doi.org/10.1242/jcs.003830.

Nwosu, Zeribe Chike, Matthias Philip Ebert, Steven Dooley, and Christoph Meyer. 2016. "Caveolin-1 in the Regulation of Cell Metabolism: A Cancer Perspective." *Molecular*

Cancer 15 (1): 1–12. https://doi.org/10.1186/s12943-016-0558-7.

Palacio-Mancheno, Paolo E., Thomas W. Evashwick-Rogler, Damien M. Laudier, Devina Purmessur, and James C. Iatridis. 2018. "Hyperosmolarity Induces Notochordal Cell Differentiation with Aquaporin3 Upregulation and Reduced N-Cadherin Expression." *Journal of Orthopaedic Research* 36 (2): 788–98. https://doi.org/10.1002/jor.23715.

Parton, Robert G., Kerrie Ann McMahon, and Yeping Wu. 2020. "Caveolae: Formation, Dynamics, and Function." *Current Opinion in Cell Biology* 65: 8–16. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.001.

Parton, Robert G., and Miguel A. Del Pozo. 2013. "Caveolae as Plasma Membrane Sensors, Protectors and Organizers." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (2): 98–112. https://doi.org/10.1038/nrm3512.

Parton, Robert G., and Kai Simons. 2007. "The Multiple Faces of Caveolae." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (3): 185–94. https://doi.org/10.1038/nrm2122.

Parton, Robert G., Vikas A. Tillu, and Brett M. Collins. 2018. "Caveolae." *Current Biology* 28 (8): R402–5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.075.

Pattappa, Girish, Zhen Li, Marianna Peroglio, Nadine Wismer, Mauro Alini, and Sibylle Grad. 2012. "Diversity of Intervertebral Disc Cells: Phenotype and Function." *Journal of Anatomy* 221 (6): 480–96. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01521.x.

Peck, Sun H., Kendra K. McKee, John W. Tobias, Neil R. Malhotra, Brian D. Harfe, and Lachlan J. Smith. 2017. "Whole Transcriptome Analysis of Notochord-Derived Cells during Embryonic Formation of the Nucleus Pulposus." *Scientific Reports* 7 (1): 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10692-5.

Rajesh, Diviya, and Chitra Lekha Dahia. 2018. "Role of Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Intervertebral Disk Formation and Maintenance." *Current Molecular Biology Reports* 4 (4): 173–79. https://doi.org/10.1007/s40610-018-0107-9.

Rajpurohit, Ramesh, Makarand V. Risbud, Paul Ducheyne, Edward J. Vresilovic, and Irving M. Shapiro. 2002. "Phenotypic Characteristics of the Nucleus Pulposus: Expression of Hypoxia Inducing Factor-1, Glucose Transporter-1 and MMP-2." *Cell and Tissue Research* 308 (3): 401–7. https://doi.org/10.1007/s00441-002-0563-6.

Raudenska, Martina, Jaromir Gumulec, Jan Balvan, and Michal Masarik. 2020. "Caveolin-1 in Oncogenic Metabolic Symbiosis." *International Journal of Cancer* 147 (7): 1793–1807. https://doi.org/10.1002/ijc.32987.

Razani, B, J A Engelman, X B Wang, W Schubert, X L Zhang, C B Marks, F Macaluso, et al. 2001. "Caveolin-1 Null Mice Are Viable, but Show Evidence of Hyper- Proliferative and Vascular Abnormalities." *J Biol Chem* 16 (718): 16. https://doi.org/10.1074/jbc.M105408200.

Razani, Babak, Terry P. Combs, Xiao Bo Wang, Philippe G. Frank, David S. Park, Robert G. Russell, Maomi Li, et al. 2002. "Caveolin-1-Deficient Mice Are Lean, Resistant to Diet-

Induced Obesity, and Show Hypertriglyceridemia with Adipocyte Abnormalities." *Journal of Biological Chemistry* 277 (10): 8635–47. https://doi.org/10.1074/jbc.M110970200.

Regazzetti, Claire, Karine Dumas, Sandra Lacas-Gervais, Faustine Pastor, Pascal Peraldi, Stéphanie Bonnafous, Isabelle Dugail, et al. 2015. "Hypoxia Inhibits Cavin-1 and Cavin-2 Expression and down-Regulates Caveolae in Adipocytes." *Endocrinology* 156 (3): 789–801. https://doi.org/10.1210/en.2014-1656.

Richardson, Stephen M., Francesca E. Ludwinski, Kanna K. Gnanalingham, Ross A. Atkinson, Anthony J. Freemont, and Judith A. Hoyland. 2017. "Notochordal and Nucleus Pulposus Marker Expression Is Maintained by Sub-Populations of Adult Human Nucleus Pulposus Cells through Aging and Degeneration." *Scientific Reports* 7 (1): 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01567-w.

Rider, Sean M., Shuichi Mizuno, and James D. Kang. 2019. "Molecular Mechanisms of Intervertebral Disc Degeneration." *Spine Surgery and Related Research* 3 (1): 1–11. https://doi.org/10.22603/ssrr.2017-0095.

Risbud, Makarand V., Asha Guttapalli, David G. Stokes, David Hawkins, Keith G. Danielson, Thomas P. Schaer, Todd J. Albert, and Irving M. Shapiro. 2006. "Nucleus Pulposus Cells Express HIF-1α under Normoxic Culture Conditions: A Metabolic Adaptation to the Intervertebral Disc Microenvironment." *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (1): 152–59. https://doi.org/10.1002/jcb.20765.

Risbud, Makarand V., Zachary R. Schoepflin, Fackson Mwale, Rita A. Kandel, Sibylle Grad, James C. Iatridis, Daisuke Sakai, and Judith A. Hoyland. 2015. "Defining the Phenotype of Young Healthy Nucleus Pulposus Cells: Recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 Annual ORS Meeting." *Journal of Orthopaedic Research* 33 (3): 283–93. https://doi.org/10.1002/jor.22789.

Rodrigo, Isabel, Robert E. Hill, Rudi Balling, Andrea Münsterberg, and Kenji Imai. 2003. "Pax1 and Pax9 Activate Bapx1 to Induce Chondrogenic Differentation in the Sclerotome." *Development* 130 (3): 473–82. https://doi.org/10.1242/dev.00240.

Sadowska, A., T. Kameda, O. Krupkova, and Karin Wuertz-Kozak. 2018. "Osmosensi Ng, Osmosi Gnalli Ng and i Nflammati on: How i Ntervertebral Di Sc Cells Respond to Altered Osmolari Ty." *European Cells and Materials* 36: 231–50. https://doi.org/10.22203/eCM.v036a17.

Schou, Kenneth B., Johanne B. Mogensen, Stine K. Morthorst, Brian S. Nielsen, Aiste Aleliunaite, Andrea Serra-Marques, Nicoline Fürstenberg, et al. 2017. "KIF13B Establishes a CAV1-Enriched Microdomain at the Ciliary Transition Zone to Promote Sonic Hedgehog Signalling." *Nature Communications* 8: 1–15. https://doi.org/10.1038/ncomms14177.

Smith, Lachlan J., Nandan L. Nerurkar, Kyung Suk Choi, Brian D. Harfe, and Dawn M. Elliott. 2011. "Degeneration and Regeneration of the Intervertebral Disc: Lessons from Development." *DMM Disease Models and Mechanisms* 4 (1): 31–41. https://doi.org/10.1242/dmm.006403.

Smolders, Lucas A., Björn P. Meij, David Onis, Frank M. Riemers, Niklas Bergknut, Richard

Wubbolts, Guy C.M. Grinwis, et al. 2013. “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 Research and Therapy* 15 (1): 1–19. https://doi.org/10.1186/ar4157.

Smolders, Lucas A., Björn P. Meij, Frank M. Riemers, Ruud Licht, Richard Wubbolts, Douwe Heuvel, Guy C.M. Grinwis, et al. 2012. “Canonical Wnt Signaling in the Notochordal Cell Is Upregulated in Early Intervertebral Disk Degeneration.” *Journal of Orthopaedic Research* 30 (6): 950–57. https://doi.org/10.1002/jor.22000.

Stoeber, Miriam, Ina Karen Stoeck, Christine HéCurrency Signnni, Christopher Karl Ernst Bleck, Giuseppe Balistreri, and Ari Helenius. 2012. “Oligomers of the ATPase EHD2 Confine Caveolae to the Plasma Membrane through Association with Actin.” *EMBO Journal* 31 (10): 2350–64. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.98.

Tessier, Steven, and Makarand V. Risbud. 2021. “Understanding Embryonic Development for Cell-Based Therapies of Intervertebral Disc Degeneration: Toward an Effort to Treat Disc Degeneration Subphenotypes.” *Developmental Dynamics* 250 (3): 302–17. https://doi.org/10.1002/dvdy.217.

Tessier, Steven, Victoria A. Tran, Olivia K. Ottone, Emanuel J. Novais, Alexandra Doolittle, Michael J. DiMuzio, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2020. “TonEBP-Deficiency Accelerates Intervertebral Disc Degeneration Underscored by Matrix Remodeling, Cytoskeletal Rearrangements, and Changes in Proinflammatory Gene Expression.” *Matrix Biology* 87: 94–111. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.10.007.

Torrino, Stéphanie, Wei Shen, Cédric M. Blouin, Satish Kailasam Mani, Christine Viaris de Lesegno, Pierre Bost, Alexandre Grassart, et al. 2018. “EHD2 Is a Mechanotransducer Connecting Caveolae Dynamics with Gene Transcription.” *Journal of Cell Biology* 217 (12): 4092–4105. https://doi.org/10.1083/jcb.201801122.

Williams, Sade, Bashar Alkhatib, and Rosa Serra. 2019. *Development of the Axial Skeleton and Intervertebral Disc*. *Current Topics in Developmental Biology*. 1st ed. Vol. 133. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.018.

Winkler, Tamara, Eric J. Mahoney, Debora Sinner, Christopher C. Wylie, and Chitra Lekha Dahia. 2014. “Wnt Signaling Activates Shh Signaling in Early Postnatal Intervertebral Discs, and Re-Activates Shh Signaling in Old Discs in the Mouse.” *PLoS ONE* 9 (6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098444.

III.2 Résultats expérimentaux *in vitro* complémentaires

Dans cette partie sont présentés les résultats suivants :

- Etude de la réponse des cellules de notochorde et de NP à l'hypoxie
- Etude de la réponse des cellules de notochorde et de NP à l'hypoxie après dissociation mécanique
- Etude de la réponse des cellules de NP à un changement de teneur en oxygène au cours de la culture
- Etude de la distribution et de l'expression de CAV1 au sein de cellules de notochorde et de NP en réponse à un choc osmotique
- Etude de la réponse des cellules de notochorde et de NP à l'activation ou l'inhibition de la voie de signalisation Shh, grâce à l'application d'agents pharmacologiques.

Présentation du protocole expérimental de prélèvement d'explants de notochorde

Les différentes étapes du protocole de prélèvement de notochorde à E11.5 sont illustrées dans la figure 33 (***Figure 33***).

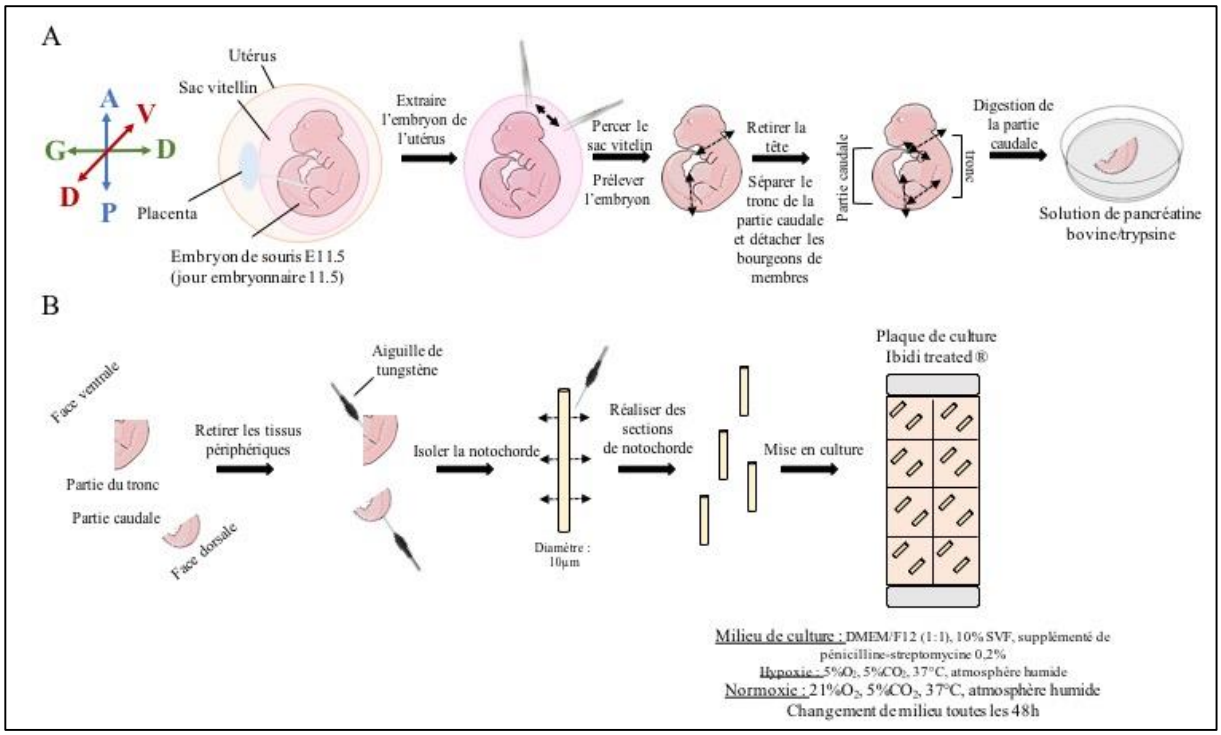


Figure 33: *Représentation schématique du protocole de prélèvement des explants de notochorde d'embryons de souris à E11.5 (jour embryonnaire 11,5). Les flèches bleues représentent l'axe antéro-postérieur, les flèches vertes représentent l'axe gauche droite et les flèches rouges représentent l'axe ventro-dorsal.*

Brièvement, après le sacrifice de la femelle gestante, l'abdomen est ouvert et l'utérus est dégagé. Sous loupe binoculaire et à l'aide d'un ciseau chirurgical, les embryons sont sortis un à un et dégagés des annexes embryonnaires et du placenta. Le sac vitellin dans lequel se trouve chaque embryon est ensuite délicatement enlevé. Avec des pinces, la partie du tronc et la partie caudale sont séparées du reste de l'embryon. Les bourgeons de membres sont ensuite retirés. Pour faciliter l'accès à la notochorde, la partie caudale est placée dans une solution contenant les enzymes pancréatine et trypsine, permettant de digérer les tissus périphériques. L'isolement de la notochorde se fait grâce à des aiguilles de tungstène, par la face ventrale pour la partie du tronc et par la face dorsale pour la partie caudale. Des sections de notochorde sont ensuite réalisées. Deux segments sont mis en culture par puit de plaque Ibidi treated® (pour faciliter l'adhésion des segments au support) dans un milieu DMEM/F12 (1:1), 10% SVF, supplémenté de pénicilline-streptomycine pendant neuf jours, en normoxie (21% O_2, 5% CO_2, 37°C) ou en hypoxie (5%O_2, 5%CO_2, 37°C).

Présentation du protocole expérimental de prélèvement d'explants de NP

Les différentes étapes du protocole de prélèvement de NP à P4 sont illustrées dans la figure 34 (***Figure 34***). Succinctement, après sacrifice des souris quatre jours après la naissance, les membres, les organes et les tissus périphériques sont détachés. Sous loupe binoculaire, une incision au sein de la moelle épinière le long de la colonne vertébrale permet d'isoler le rachis. Celui-ci est ensuite divisé en deux parties (la partie thoracique et la partie lombaire) par une section au niveau de la dernière côte. Après incubation du rachis dans une solution de pancréatine-trypsine, une incision sur la face ventrale de celui-ci est réalisée à l'aide d'une lame de scalpel, au niveau de l'AF. Si l'incision est correctement effectuée, le NP peut être détaché avec une pince. Si l'incision n'est pas correctement réalisée, le NP ne peut être isolé entièrement, et un nuage de cellules est alors observé (ces NP ne sont alors pas utilisés pour la suite de l'expérimentation). Quatre NP sont ensuite mis en culture par puit de plaque Ibidi uncoated® (non traitée pour l'adhésion cellulaire afin que le NP soit en suspension) dans le même milieu de culture et les mêmes conditions que les explants de notochorde.

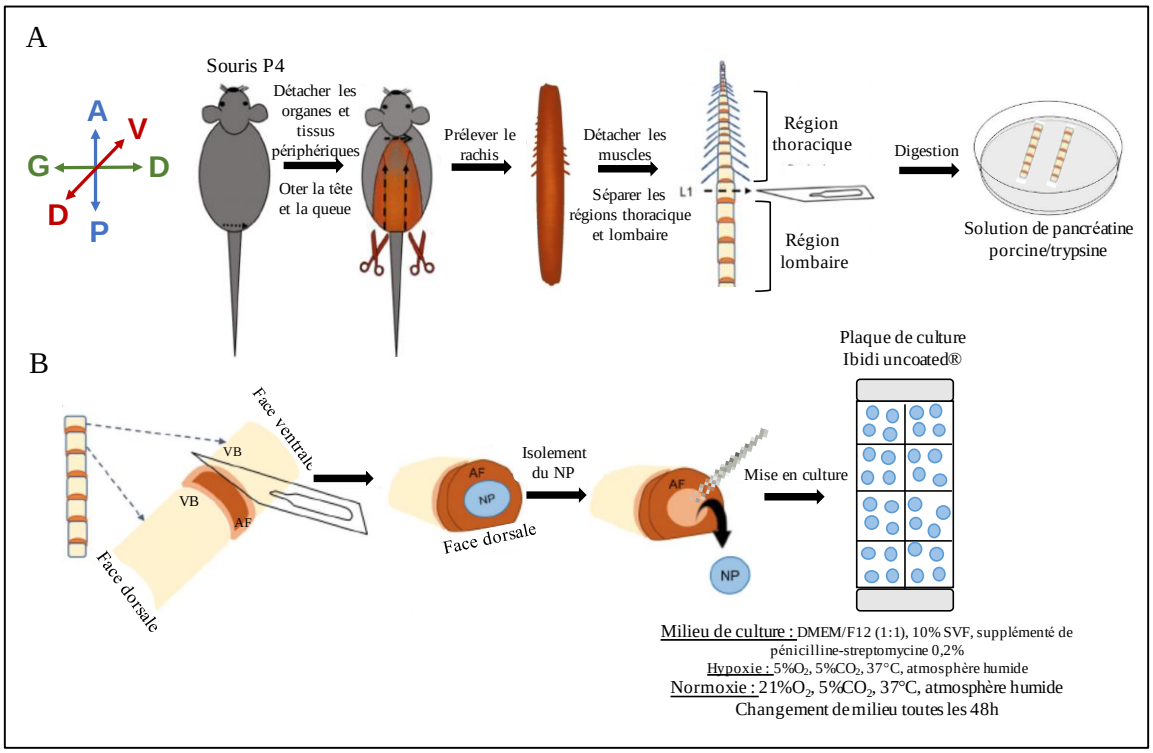


Figure 34: *Représentation schématique du protocole de prélèvement des explants de NP de souris à P4 (quatre jours après la naissance). Les flèches bleues représentent l'axe antéro-postérieur, les flèches vertes représentent l'axe gauche droite et les flèches rouges représentent l'axe ventro-dorsal. Adapté de (Piprode et al. 2020).*

III.2.1 Etude de la réponse des cellules de notochorde et de NP à l'hypoxie

Comme évoqué précédemment, l'hypoxie est montrée comme diminuant la densité des cavéoles membranaires et diminuant l'expression de CAVINE1 de manière dépendante de HIF1-α (Regazzetti et al. 2015 ; Sinha et al. 2011). La notochorde et le NP présentant une densité importante de cavéoles membranaires, nous voulons étudier l'effet de l'hypoxie sur des explants de notochorde et de NP. L'équipe du Dr Anne Camus a développé une technique de dissociation mécanique des explants (micromasses sorties de la notochorde à E11.5 et NP) après neuf jours de culture dans le but d'amplifier ces cellules. L'effet de l'hypoxie sera donc également étudié sur ces explants dissociés (E11.5 P1 et P4 P1) cultivés jusqu'à neuf jours en hypoxie (5%O_2, 5%CO_2, 37°C) et normoxie (21% O_2, 5% CO_2, 37°C) (E11.5 P1) et quatorze jours en hypoxie (P4 P1). Les réponses en terme de phénotype cellulaire et de capacité proliférative ainsi que la distribution de CAV1 sont comparées entre une culture en normoxie et en hypoxie. Les mutants *Hif1-α* KO montrent un défaut de formation du NP à E15.5 mais la structure de la notochorde apparait normale à E13.5 (Merceron et al. 2014). Notre étude vise donc également à étudier la teneur en oxygène favorable à la prolifération et la survie des explants de cellules de notochorde à E11.5 un stade plus précoce de développement.

Des images obtenues en microscopie à contraste de phase permettent d'observer l'évolution des explants de notochorde au cours du temps, avec une formation de micromasses de cellules aux extrémités de la notochorde (cellules sortant de la notochorde, indiquées par des flèches rouges) (***Figure 35A***). Une mesure du diamètre de ces micromasses révèle une croissance dans les deux conditions de culture, avec une croissance tout de même plus importante en hypoxie jusqu'à Jour10 (***Figure 35B***). Comme indiqué en introduction, les données de la littérature montrent qu'à E11.5, les cellules de notochorde expriment *T*, *FoxA2* et *Sox9*. Les images obtenues en immunofluorescence (IF) montrent peu de cellules T^+-$FoxA2^+$ mais une majorité de cellules T^+-$SOX9^+$ après neuf jours en hypoxie et en normoxie (***Figure 35C***).

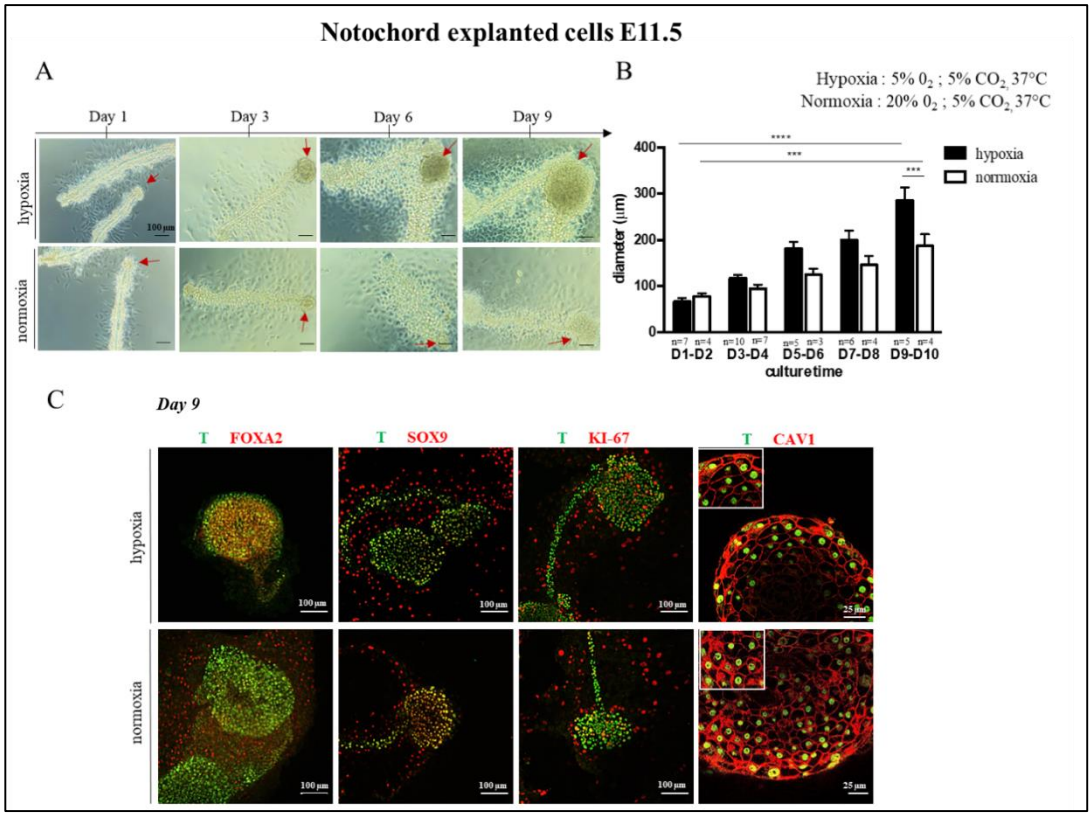


***Figure 35**: Impact de l'hypoxie sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de notochorde murine à E11.5 (jour embryonnaire 11.5). (A) Images de microscopie à contraste de phase permettant l'étude de la croissance des explants cultivés en hypoxie et en normoxie pendant neuf jours. Les micromasses formées à partir de cellules sorties de la notochorde sont sont indiquées par des flèches rouges. (B) Détermination de la croissance des micromasses par la mesure de leur diamètre (µm) du premier jour (D1) au dixième jour de culture (D10). n micromasses mesurées en hypoxie >30 pour chaque jour ; n micromasses mesurées en normoxie >10 pour chaque jour. Le nombre d'expériences est indiqué en dessous de chaque histogramme. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni ; ***p<0,001 ****p<0,0001. (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants après neuf jours de culture en hypoxie ou en normoxie. n micromasses imagées >4 par double marquage. Les protéines T, FOXA2 et SOX9 sont des marqueurs phénotypiques des cellules de notochorde à E11.5. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. T : BRACHYURY ; FOXA2 : FORKHEAD BOX PROTEIN A2 ; CAV1 : CAVEOLINE1*

De plus, une tendance à l'augmentation du nombre de cellules T^{+}-$KI67^{+}$ est observée en hypoxie. Aucune différence de la distribution membranaire de CAV1 n'est observée entre les micromasses cultivées en hypoxie ou en normoxie. Ces résultats démontrent ainsi que la présence de CAV1 est maintenue *in vitro* à la membrane des explants de cellules de notochorde embryonnaire.

De la même manière que pour les explants E11.5, l'étude sur les explants de cellules de notochorde après dissociation mécanique (E11.5 P1) montre une croissance des micromasses dans les deux conditions de culture, avec une tendance à une croissance plus importante en hypoxie (***Figure 36A-B***).

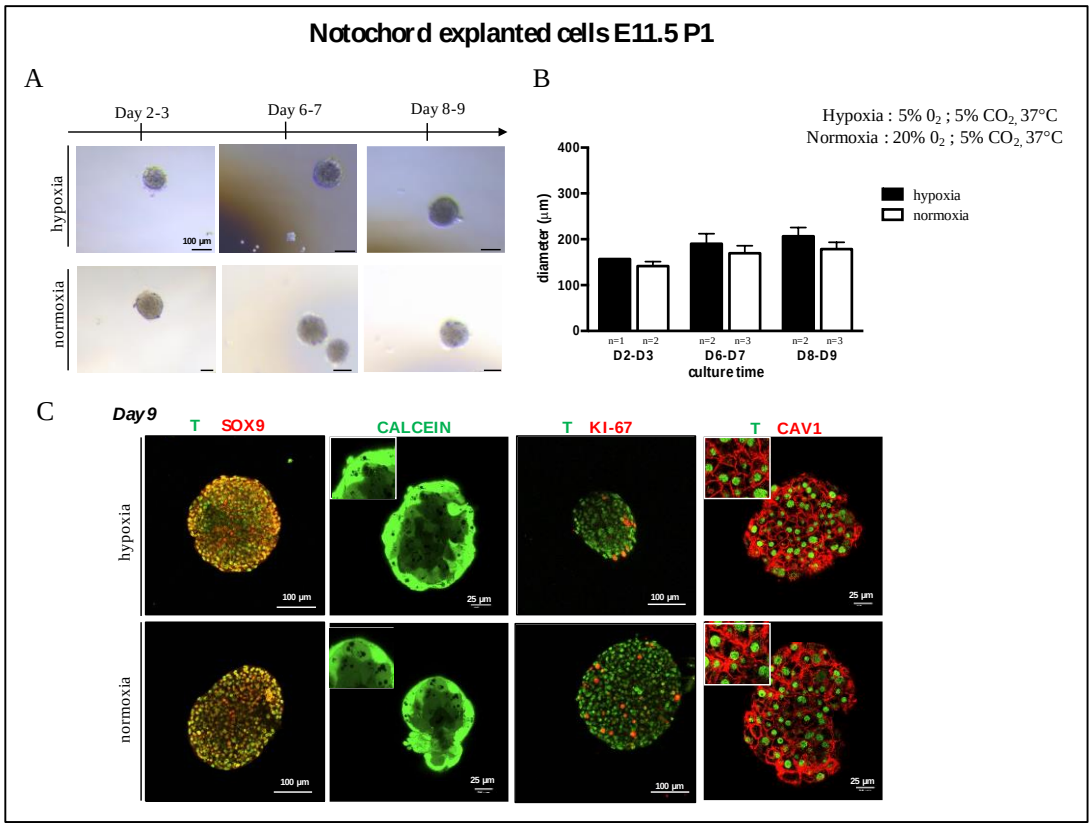


Figure 36: *Impact de l'hypoxie sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de notochorde murine à E11.5 (jour embryonnaire 11.5) après un passage réalisé par dissociation mécanique aux aiguilles de tungstène (E11.5 P1). (A) Images de microscopie à contraste de phase permettant l'étude de la croissance des explants cultivés en hypoxie et en normoxie pendant neuf jours. (B) Détermination de la croissance des micromasses par la mesure de leur diamètre (µm) du deuxième jour (D2) au neuvième jour de culture (D9). n micromasses mesurées en hypoxie >15 pour chaque jour ; n micromasses mesurées en normoxie >10 pour chaque jour. Le nombre d'expériences est indiqué en dessous de chaque histogramme. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni ; p>0,05 (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants après neuf jours de culture en hypoxie ou en normoxie. n micromasses imagées =1 par double marquage et par condition. T, SOX9 et la présence de vacuoles (détectées grâce au marquage à la calcéine) sont des marqueurs phénotypiques des cellules de notochorde à E11.5. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. T : BRACHYURY ; CAV1 : CAVEOLINE1.*

Dans le même sens, les IF montrent que l'identité cellulaire est maintenue dans les deux conditions et qu'il n'y a aucune différence notable de la densité des vacuoles, de la capacité prolifératives et de la distribution de CAV1 à la membrane. (***Figure 36C***).

Les résultats présentés dans le papier expérimental montrent un maintien de l'identité et une tendance à l'augmentation de la capacité prolifératives des explants de cellules de NP à P4 cultivés en hypoxie pendant neuf jours (cf Figure 6 du papier expérimental). De plus, aucune modification de la distribution membranaire de CAV1 n'est détectée entre les deux conditions, mais l'hypoxie conduit à une diminution de la densité des cavéoles et à leur aplatissement à la membrane des cellules de NP. Enfin, une tendance à l'augmentation de la densité des vacuoles est observée à Jour9 en hypoxie. Un marquage à la calcéine sur les explants P4 tout au long de la culture mettent également en évidence une tendance à la diminution de la densité des vacuoles entre Jour3 et Jour9 dans les deux conditions (***Figure 37***).

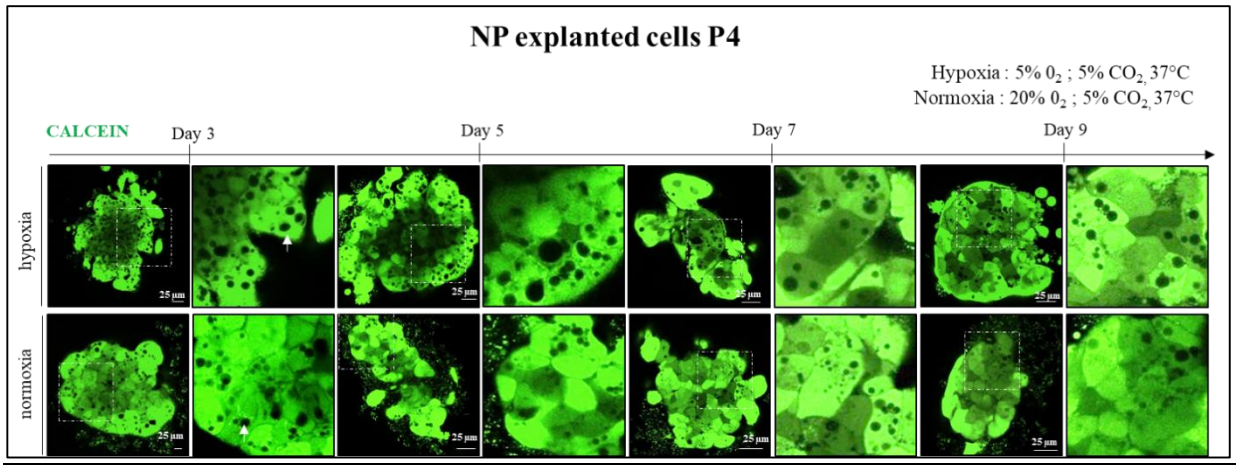


Figure 37: *Impact de l'hypoxie sur le phénotype d'explants de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance). Marquage à la calcéine sur les explants cultivés pendant trois, cinq et neuf jours de culture en hypoxie ou en normoxie. La calcéine permet la révélation des vacuoles qui apparaissent en noir (indiquées par des flèches blanches). n micromasses imagées =1 pour tous les jours étudiés par condition.*

Afin de poursuivre l'étude de la modulation des cavéoles en réponse à l'hypoxie, des western blot ont été réalisés à partir des explants de cellules de NP, cultivés en hypoxie ou en normoxie pendant neuf jours, afin de déterminer l'expression de protéines cavéolaires. Nos résultats montrent tout d'abord que nous sommes capables de détecter les protéines cavéolaires CAV1, CAV2, CAVINE1 et EHD2 aux tailles attendues, à partir des explants de ces échantillons (***Figure 38A***).

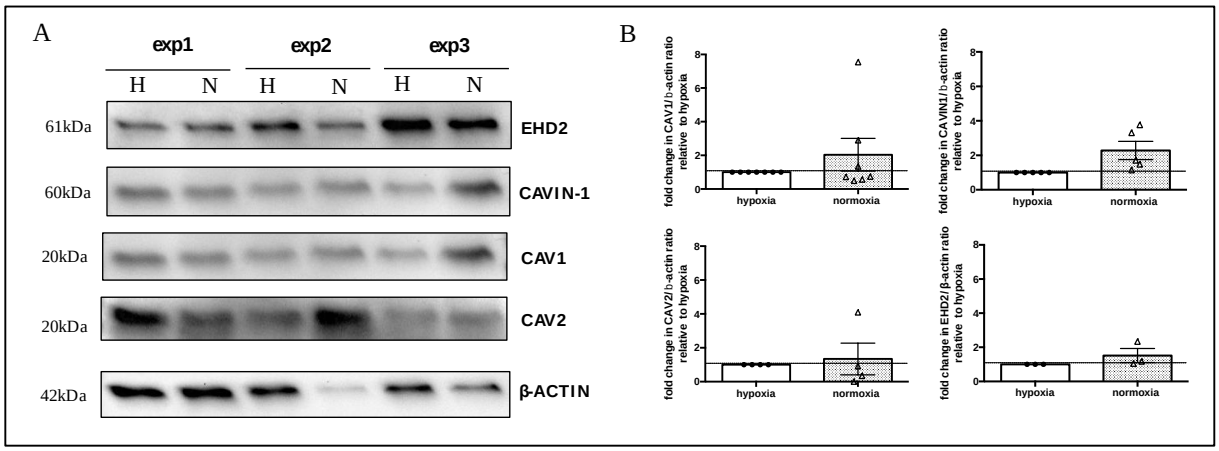


Figure 38: *(A) Etude de l'expression des protéines cavéolaires en réponse à l'hypoxie. Détection des protéines cavéolaires CAVEOLINE1 (CAV1), CAVEOLINE2 (CAV2), CAVINE1 et EHD2 à partir d'explants de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance) cultivés en hypoxie (H) ou normoxie (N) pendant neuf jours. Détection de la protéine ß-ACTINE comme protéine de référence. (B) Quantification du niveau d'expression des protéines cavéolaires/ ß-ACTINE. Les expressions relatives en normoxie sont exprimées en fonction des valeurs obtenues en hypoxie qui constituent la référence (valeur =1). Chaque point représente un nombre de dépôt réalisé, n=3 expérimentations indépendantes. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM, t test non apparié avec correction de Welch, p>0.05. Exp : expérience indépendante, EHD2 : ESP15 HOMOLOGY DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2.*

En revanche, les variabilités d'expression de la ß-actine (protéine de référence) et des protéines d'intérêt pour une même condition et entre les différentes expériences indépendantes, ne permettent pas une interprétation fiable des quantifications réalisées (***Figure 38B***).

Suite aux résultats du papier expérimental indiquant que la croissance des explants P4 est plus importante en hypoxie, les explants P4 dissociés sont placés uniquement en hypoxie. Les résultats montrent une croissance des explants dissociés tout au long de la culture en hypoxie, atteignant un plateau à Jour11 (***Figure 39A-B***). De plus, les IF montrent un maintien de l'identité, de la capacité prolifération et de la distribution de CAV1 membranaire (***Figure 39C***).

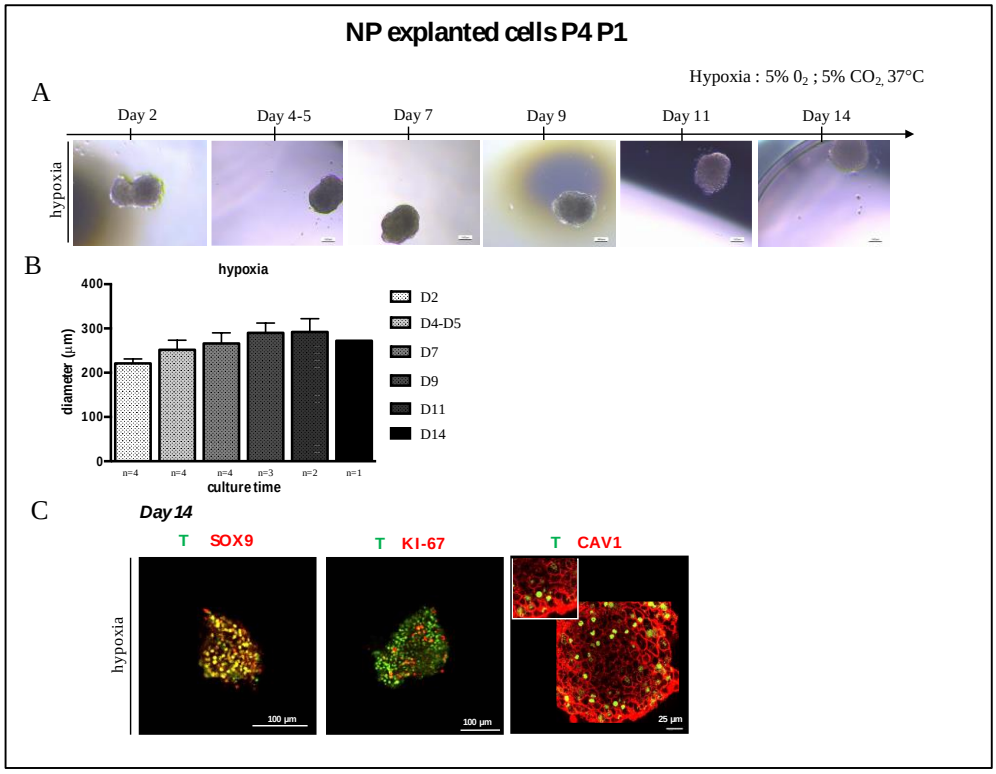


***Figure 39**: Impact de l'hypoxie sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance) après un passage réalisé par dissociation mécanique aux aiguilles de tungstène (P4 P1). (A) Images de microscopie à contraste de phase permettant l'étude de la croissance des explants cultivés en hypoxie pendant quatorze jours. (B) Détermination de la croissance des micromasses par la mesure de leur diamètre (µm) du deuxième jour (D2) au quatorzième jour de culture (D14). n micromasses mesurées >15 pour chaque jour. Le nombre d'expériences est indiqué en dessous de chaque histogramme. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. t test non apparié avec correction de Welch ; p>0,05 (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants après neuf jours de culture en hypoxie. n micromasses imagées =1 par double marquage. T et SOX9 sont des marqueurs phénotypiques des cellules de NP à P4. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. T : BRACHYURY, CAV1 : CAVEOLINE1.*

III.2.2 Etude de la modulation de la distribution et de l'expression de CAV1 au sein de cellules de NP en réponse à un changement de teneur en oxygène au cours de la culture

Les résultats présentés dans le papier expérimental montrent une comparaison entre des explants P4 cultivés pendant neuf jours soit en hypoxie, soit en normoxie, entrainant leur adaptation à ce microenvironnement. Dans un second temps nous avons appliqué un changement de teneur en oxygène au cours de la culture afin de moduler la densité des cavéoles membranaires et de visualiser un potentiel effet sur la distribution de CAV1. Pour cela, les explants de NP (P4) sont cultivés pendant quatre jours en hypoxie ou en normoxie. Les explants en hypoxie sont alors placés en normoxie et inversement, pendant 24h (***Figure 40A***).

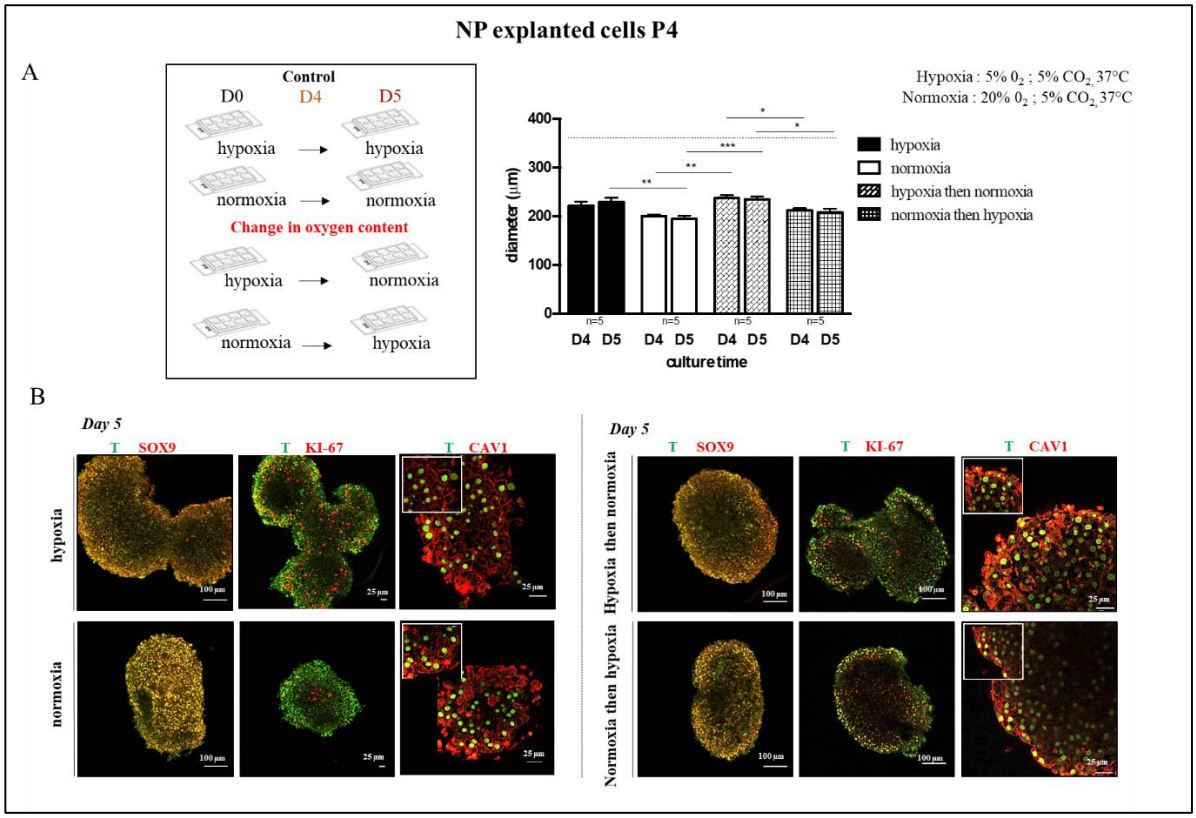


Figure 40: *Impact d'un changement de teneur en oxygène au cours de la culture sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance). (A) Plan expérimental indiquant les conditions contrôle pour lesquelles les explants sont cultivés en hypoxie ou normoxie pendant cinq jours, et les conditions expérimentales pour lesquelles les explants sont cultivés en hypoxie pendant quatre jours puis en normoxie pendant 24h ou en normoxie pendant quatre jours puis en hypoxie pendant 24h. (B) Détermination de la croissance des micromasses par la mesure de leur diamètre (µm) entre le quatrième jour (D4) et le cinquième jour de culture (D5). n micromasses mesurées en hypoxie et en normoxie >40 pour chaque jour ; n micromasses mesurées en hypoxie puis normoxie et en normoxie puis hypoxie >75 pour chaque jour. Le nombre d'expériences est indiqué en dessous de chaque histogramme. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni ; *p<0,01 ; ** p<0,05 ; ***p<0,005. (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants après cinq jours de culture dans les deux conditions contrôle et les deux conditions expérimentales. n micromasses imagées ≥5 par double marqugae et par condition. T et SOX9 sont des marqueurs phénotypiques des cellules de NP à P4. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. T : BRACHYURY, CAV1 : CAVEOLINE1.*

En parallèle, des explants contrôle sont cultivés en hypoxie ou normoxie pendant cinq jours. Les résultats de mesure du diamètre des micromasses dans les conditions contrôle révèlent un croissance des explants cultivés en hypoxie contrairement à ceux cultivés en normoxie à Jour5 (***Figure 40A***). Les résultats des conditions expérimentales révèlent également un diamètre plus important des micromasses en hypoxie dès jour4 en comparaison à la normoxie. Ces résultats sont en cohérence avec les données présentées dans le papier expérimental montrant une croissance des explants P4 en hypoxie tout au long de la culture. Le changement de teneur en oxygène de 24h de modifie pas la croissance des micromasses, dans les deux conditions expérimentales. Les IF montrent une absence de modification de l'identité (T^+-

SOX9$^+$), de la capacité proliférative (T$^+$-KI-67$^+$) et de la distribution de CAV1 dans les conditions expérimentales en comparaison aux conditions contrôle (***Figure 40B***).

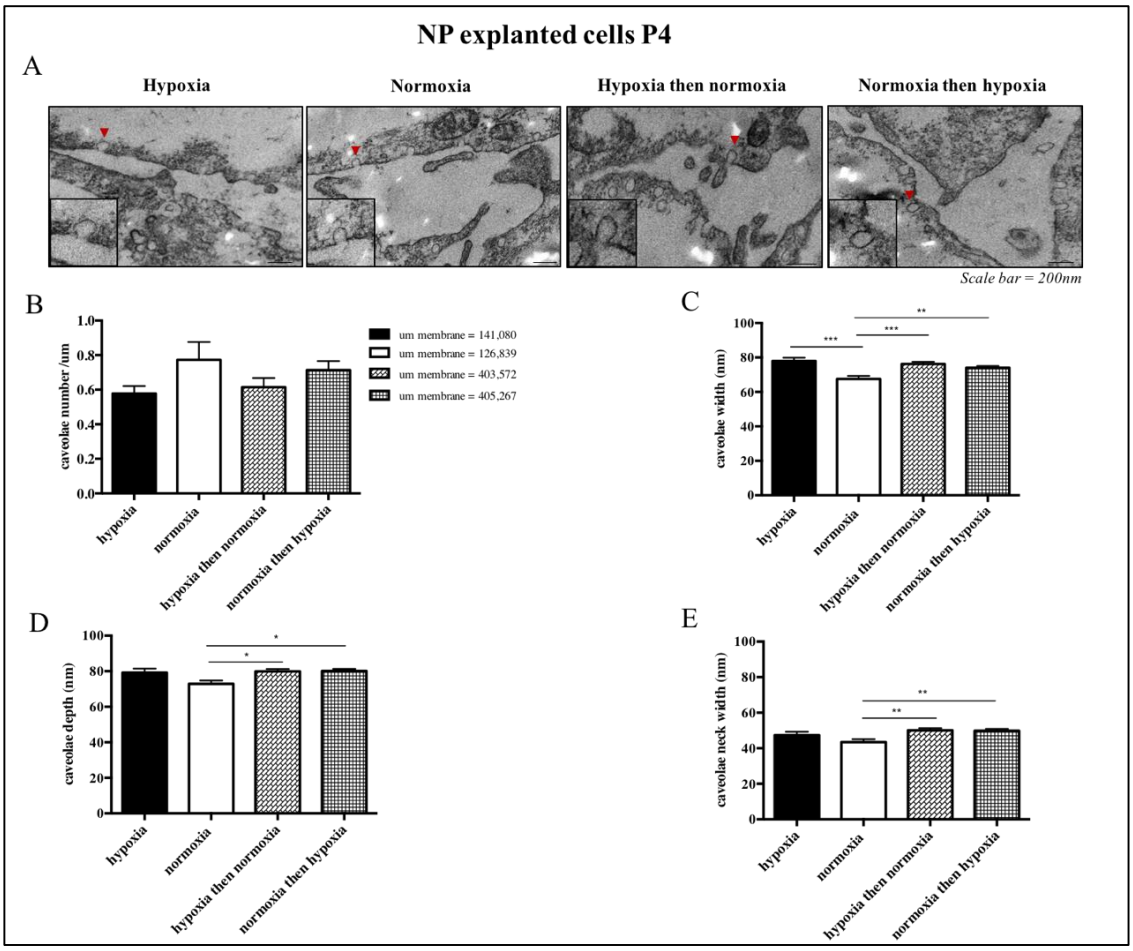


Figure 41: *Etude de la densité et de la morphologie des cavéoles en réponse à un changement de teneur en oxygène durant la culture de cellules de NP murins à P4 (quatre jours après la naissance). (A) Images de cavéoles à la membrane de cellules d'explant de NP murins à P4 (4 jours après la naissance), après cinq jours de culture, obtenues par microscopie électronique à transmission (MET). Les flèches blanches indiquent les cavéoles membranaires. (B) Détermination de la densité de cavéoles membranaires (nombre de cavéoles par micromètre de membrane plasmique) à partir des images de MET. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. Test non paramétrique de Mann Whitney, réalisé sur le nombre d'images analysées par condition, p>0,05. n=1 expérimentation indépendante. (C) Détermination de largeur des cavéoles, (D) de leur profondeur, (E) et de la largeur de leur col, à partir des images de MET. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. Test non paramétrique de Mann Whitney, réalisé sur le nombre de cavéoles analysées par condition, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001, n cavéoles mesurées en hypoxie =82 ; n cavéoles mesurées en normoxie =94 ; n cavéoles mesurées en hypoxie puis normoxie = 237 ; n cavéoles mesurées en normoxie puis hypoxie = 275.*

Les analyses en MET montrent que la densité des cavéoles membranaires est maintenue au sein des membranes des explants cultivés en hypoxie puis normoxie en comparaison à ceux cultivés en hypoxie (**Figure 41*A-B***). Le même résultat est retrouvé pour les explants cultivés en normoxie puis hypoxie en comparaison à ceux cultivés en normoxie pendant cinq jours. En revanche, le passage de 24h de la condition normoxie à la condition hypoxie impacte la morphologie des cavéoles, avec une augentation de tous les paramètres (largeur, profondeur

et largeur du col) pouvant indiquer un gonflement des cavéoles, qui rerouveraient alors une morpholoigie proche des celles présentes au sein des membranes des explants cultivés en hypoxie pendant cinq jours (***Figure 41C-E***).

III.2.1 Etude de la modulation de la distribution et de l'expression de CAV1 au sein de cellules de notochorde et de NP en réponse à un choc osmotique

Durant ma thèse, j'ai testé différents stimuli afin de moduler la densité des cavéoles membranaires et étudier les effets de cette modulation sur le phénotype cellulaire ainsi que sur l'activité de voies de signalisation. Comme indiqué précédemment, les cellules du NP ainsi que les cavéoles sont sensibles à l'osmolarité du microenvironnement. Ainsi, un choc osmotique a été appliqué sur les explants de cellules de NP en culture en hypoxie (condition plus favorable à leur croissance). En condition hypo-osmolaire, le milieu intracellulaire est plus concentré que le milieu extracellulaire, engendrant théoriquement une entrée d'eau dans la cellule. Les explants de NP ont été cultivés pendant deux ou cinq jours dans un milieu iso-osmolaire (mesuré à 320mOsm/L), puis certains sont cultivés dans un milieu de culture dilué au ½ dans de l'eau ultra pure (mesuré à 150mOsm/L) pendant 24h ou 48h.

Premièrement, les mesures du diamètre des micromasses cultivées en milieu iso-osmolaire pendant trois jours montrent une diminution du diamètre entre Jour2 et Jour3 de culture (***Figure 42A***). Ces données sont en contradiction avec celles exposées dans le papier expérimental montrant une croissance des explants P4 en hypoxie tout le long de la culture, jusqu'à neuf jours, ce qui ne permet pas l'exploitation de ces résultats. L'application d'un choc osmotique à Jour2 pendant 48h révèle en revanche une croissance des micromasses dans les deux conditions de culture, mais ne montre pas de différence entre la croissance en milieu iso-osmolaire et hypo-osmolaire (***Figure 42B***). Les résultats des IF montrent tout d'abord un maintien de l'identité des explants cultivés en milieu hypo-osmolaire (double expression de T et SOX9) (***Figure 42C***). De manière intéressante, une tendance à l'augmentation du nombre de vacuoles et de leur taille (marquage calcéine) est observée en condition hypo-osmolaire ainsi qu'une tendance à une plus forte expression de l'AQUAPORINE 3 (AQP3). Les aquaporines sont des protéines membranaires qui permettent le passage d'eau de part et d'autre de la membrane.

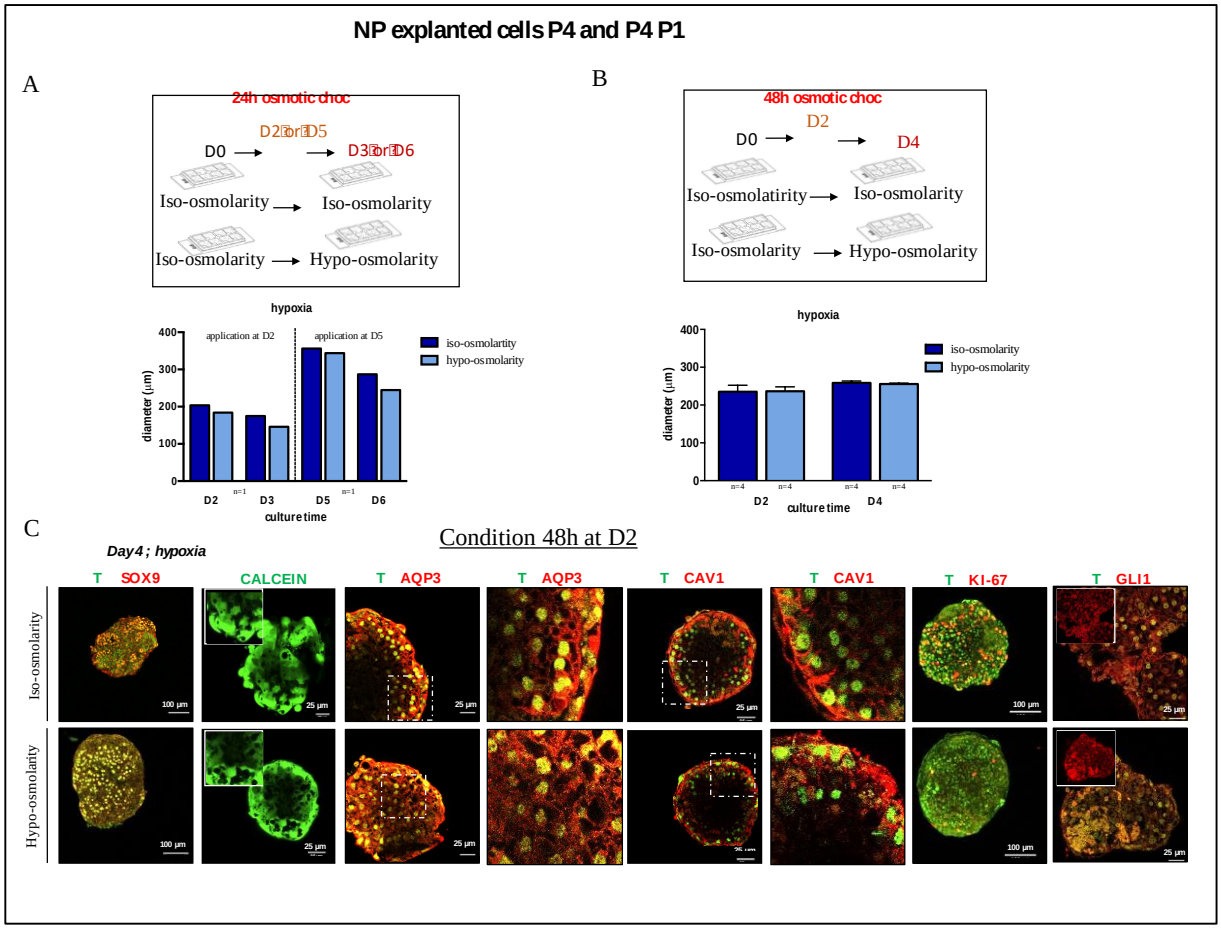


Figure 42: *Impact d'un choc osmotique sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de NP murins à P4 (4 jours après la naissance). (A) Plan expérimental indiquant les conditions contrôle pour lesquelles les explants sont cultivés dans un milieu iso-osmolaire (320mOsm/L) pendant trois ou six jours et les conditions expérimentales pour lesquelles les explants sont cultivés en milieu iso-osmolaire pendant deux ou cinq jours puis cultivés en milieu hypo-osmolaire (150mOsm/L) pendant 24h. La détermination de la croissance des micromasses (mesure du diamètre en micromètre) a été réalisée à partir d'images de microscopie à contraste de phase (données non illustrées).* Le nombre d'expérience est indiqué en dessous des histogrammes. *Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni ; p>0,05 (B) Plan expérimental indiquant les conditions contrôle pour lesquelles les explants sont cultivés dans un milieu iso-osmolaire pendant deux jours et les conditions expérimentales pour lesquelles les explants sont cultivés en milieu iso-osmolaire pendant deux jours puis cultivés en milieu hypo-osmolaire pendant 48h. La détermination de la croissance des micromasses (mesure du diamètre en micromètre) a été réalisée à partir d'images de microscopie à contraste de phase (données non illustrées)* Le nombre d'expérience est indiqué en dessous des histogrammes. *Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni ; p>0,05. (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants après quatre jours de culture en milieu iso-osmolaire ou après deux jours de culture en milieu iso-osmolaire puis deux jours de culture en milieu hypo-osmolaire. n micromasses imagées ≥2 par double marquage et par condition. T, SOX9, AQP3 et la présence de vacuoles (détectées par marquage à la calcéine) sont des marqueurs phénotypiques des cellules de NP à P4. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. La protéine GLI1 est une cible directe de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh). T : BRACHYURY ; AQP3 : AQUAPORINE3 ; CAV1 : CAVEOLINE1 ; GLI1 : GLIOMA ASSOCIATED ONCOGEN HOMOLOG 1.*

Une étude montre que les aquaporines 0-1-2-3-4-5-6-7 et 9 sont exprimées au sein au sein de NP canins et humains non dégénérés (Snuggs et al. 2019). Une augmentation de l'expression de AQP3 dans notre modèle pourrait donc traduire d'un passage de molécules d'eau plus

important. De manière intéressante, l'hypo-osmolarité tend à diminuer la capacité prolifératives des cellules du NP et à altérer la distribution membranaire de CAV1. Enfin, l'expression nucléaire de GLI1 tend à être réduite en condition hypo-osmolaire, indiquant une possible diminution de l'activité de la voie de signalisation Shh.

Nous avons également choisi d'étudier l'effet de l'application d'un choc osmotique sur les explants de cellules de notochorde à E11.5, puisque les vacuoles sont présentes et régulent la pression osmotique des CNTs durant le développement embryonnaire (Wang et al. 2017). Sur la base des résultats obtenus à P4, un choc osmotique est appliqué pendant 48h, mais cette fois à partir du sixième jour de culture (pour que les micromasses soient bien reformées après dissociation). Ce test a été réalisé sur des explants cultivés en hypoxie. Les mesures de taille révèlent une tendance à l'augmentation du diamètre des micromasses cultivées en milieu iso-osmolaire ou milieu hypo-osmolaire, entre Jour6 et Jour8 (***Figure 43A***). Les IF ne révèlent pas de différence entre les deux conditions en terme d'identité (T^+-$SOX9^+$; T^+-$AQP2^+$; densité de vacuoles), de phénotype cellulaire (T^+-$KI\text{-}67^+$) et de distribution de CAV1 à la membrane des CNTs (***Figure 43B***). Enfin, l'absence de modification de la distribution de GLI1 nucléaire et PTCH 1 membranaire entre les deux conditions, suggère que la voie Shh n'est pas modulée par le choc osmotique.

L'ensemble de ces résultats ne révèle pas de modification évidente du phénotype des CNTs à E11.5 en réponse à l'application d'un choc osmotique de 48h, suggérant que ce stimulus n'est peut-être pas adéquat pour moduler la densité des cavéoles à la membrane des CNTs à ce stade. Ces résultats montrent également une différence dans la réponse au stress osmotique des cellules notochordales embryonnaires et de NP.

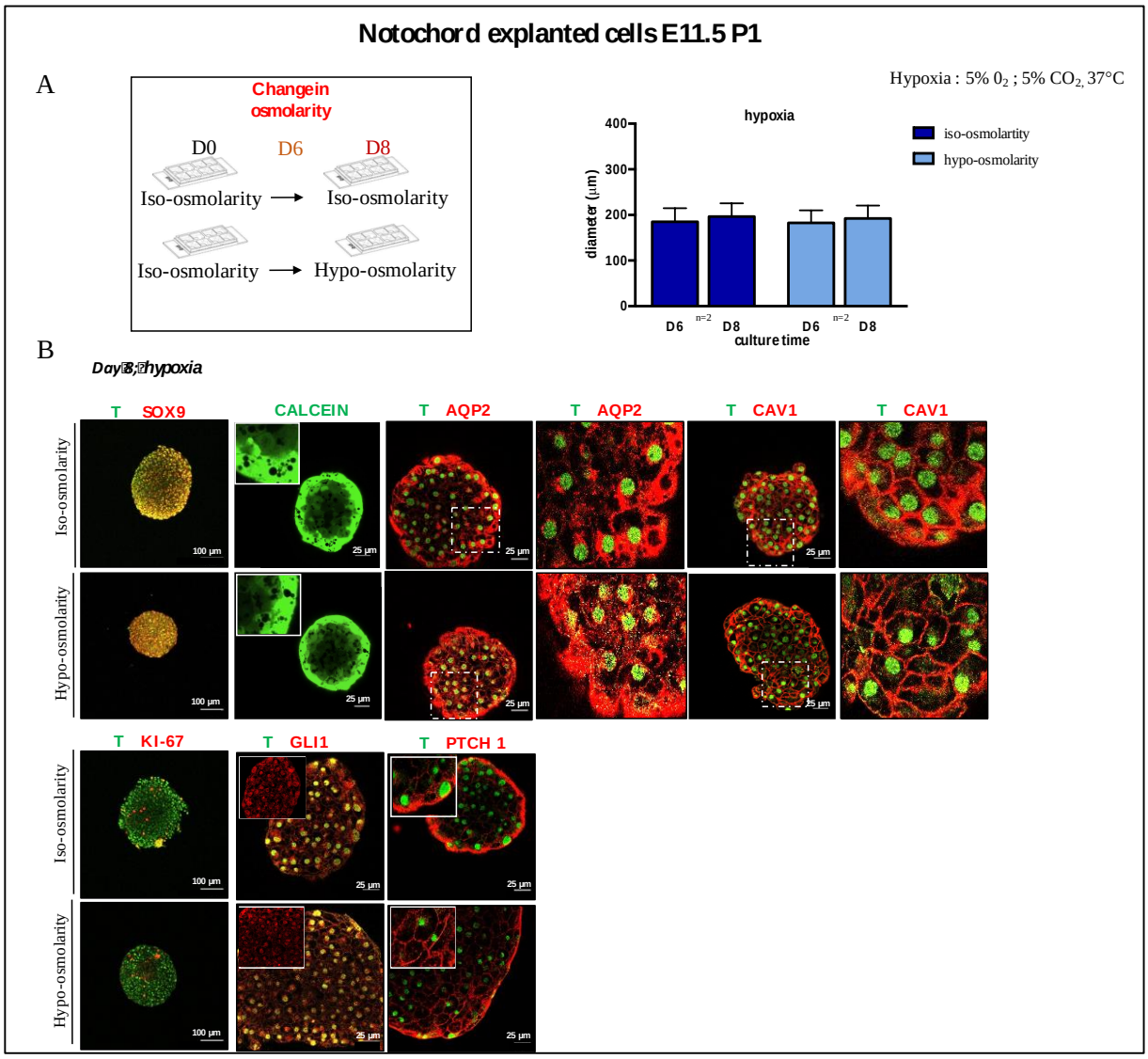


Figure 43: *Impact d'un choc osmotique sur la croissance et le phénotype d'explants de cellules de notochorde murine à E11.5 (11,5 jours post-conception) et après dissociation mécanique aux aiguilles de tungstène (E11.5 P1). (A) Plan expérimental indiquant les conditions contrôle pour lesquelles les explants sont cultivés dans un milieu iso-osmolaire (320mOsm/L) pendant huit jours (D8) et les conditions expérimentales pour lesquelles les explants sont cultivés en milieu iso-osmolaire pendant six jours puis cultivés en milieu hypo-osmolaire (150mOsm/L) pendant 48h. La détermination de la croissance des micromasses (mesure du diamètre en micromètre) a été réalisée à partir d'images obtenues en microscopie à contraste de phase (données non illustrées). Le nombre d'expérience est indiqué en dessous des histogrammes. n micromasses mesurées pour iso-osmolarité et hypo-osmolarité>25 par jour. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni ; p>0,05. (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants cultivés dans les deux conditions contrôle et les deux conditions expérimentales après huit jours de culture. n micromasses imagées ≥3 par marqueur et par condition. T, SOX9, AQP2 et la présence de vacuoles (détectées par marquage à la calcéine) sont des marqueurs phénotypiques des cellules de NP à P4. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. La protéine GLI1 est une cible directe de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) et PTCH 1 est le récepteur de la voie. T : BRACHYURY ; AQP2 : AQUAPORINE2 ; CAV1 : CAVEOLINE1 ; GLI1 : GLIOMA ASSOCIATED ONCOGEN HOMOLOG 1 ; PTCH 1 : PATCHED 1.*

III.2.2 Etude de la modulation de la voie de signalisation Shh sur des explants de cellules de notochorde (E11.5 P1) et de NP (P4 et P4 P1).

Les données de l'étude *in vivo* présentées dans l'article expérimental avancent un rôle de CAV1 dans la modulation de la prolifération des cellules du NP et une modulation de l'activité de la voie Shh durant la croissance post-natale. En revanche, une corrélation directe entre ces deux modulations n'a pas été montrée. Nous avons ainsi voulu étudier l'impact d'une activation ou d'une inhibition de l'activité de la voie Shh au sein d'explants de cellules de notochorde et de NP sur la distribution de CAV1 et la capacité proliférative.

Inhibition de l'activité de la voie de signalisation Shh

La voie de signalisation Shh a été inhibée par l'ajout de cyclopamine (inhibiteur du récepteur Smoothened) dans le milieu de culture des explants de NP (P4 et P4 P1). La cyclopamine a été appliquée pendant 48h à Jour3 ou Jour4, à différentes doses (0,5µM ; 1µM et 2µM) selon le papier de Mercier et al en 2013 montrant un début d'effet de la cyclopamine à 0.025µM et un fort effet à 2.5 µM (Mercier et al. 2013). La voie de signalisation Shh étant impliquée dans la prolifération des cellules du NP durant la croissance post-natale (Dahia et al. 2012), les explants ont été placés en hypoxie (condition pour laquelle la capacité proliférative est plus importante), afin de maximiser l'effet attendu de l'inhibition de la voie Shh. La cyclopamine étant resuspendue dans une solution de PBS-HBC (hydropropyl-β-cyclodextrin) permettant sa dissolution, une condition contrôle est réalisée avec des micromasses placées dans un milieu de culture contenant le même volume de PBS-HBC que la condition expérimentale pour laquelle la concentration maximale de cyclopamine testée est inférieure à 0,1% du volume final. Les résultats obtenus pour une croissance en hypoxie dans le milieu classique sont également représentés. Les résultats montrent tout d'abord que tout comme la condition contrôle, une tendance à l'augmentation du diamètre des micromasses cultivées en présence de PBS-HBC dans le milieu de culture est observée, pour une application à Jour3 ou Jour4 (***Figure 44A-B***). Ces données traduisent une absence de toxicité de cette solution pour les cellules. L'application de la cyclopamine à Jour3 montre une tendance à la diminution du diamètre des micromasses pour des doses de 1 et 2µM. L'application à Jour4 entraîne une tendance à la diminution du diamètre pour 0,5 et 1µM de cyclopamine. Par contre, l'effet inverse est observé pour une dose de 2µM. Ces résultats indiquent tout d'abord qu'il n'y a pas d'effet de la concentration de cyclopamine puisque la réponse cellulaire n'est pas augmentée

en réponse à une concentration de plus en plus forte. De plus, la variabilité des réponses au traitement peut introduire un biais dans l'interprétation des résultats et entrainer l'absence de conclusion forte.

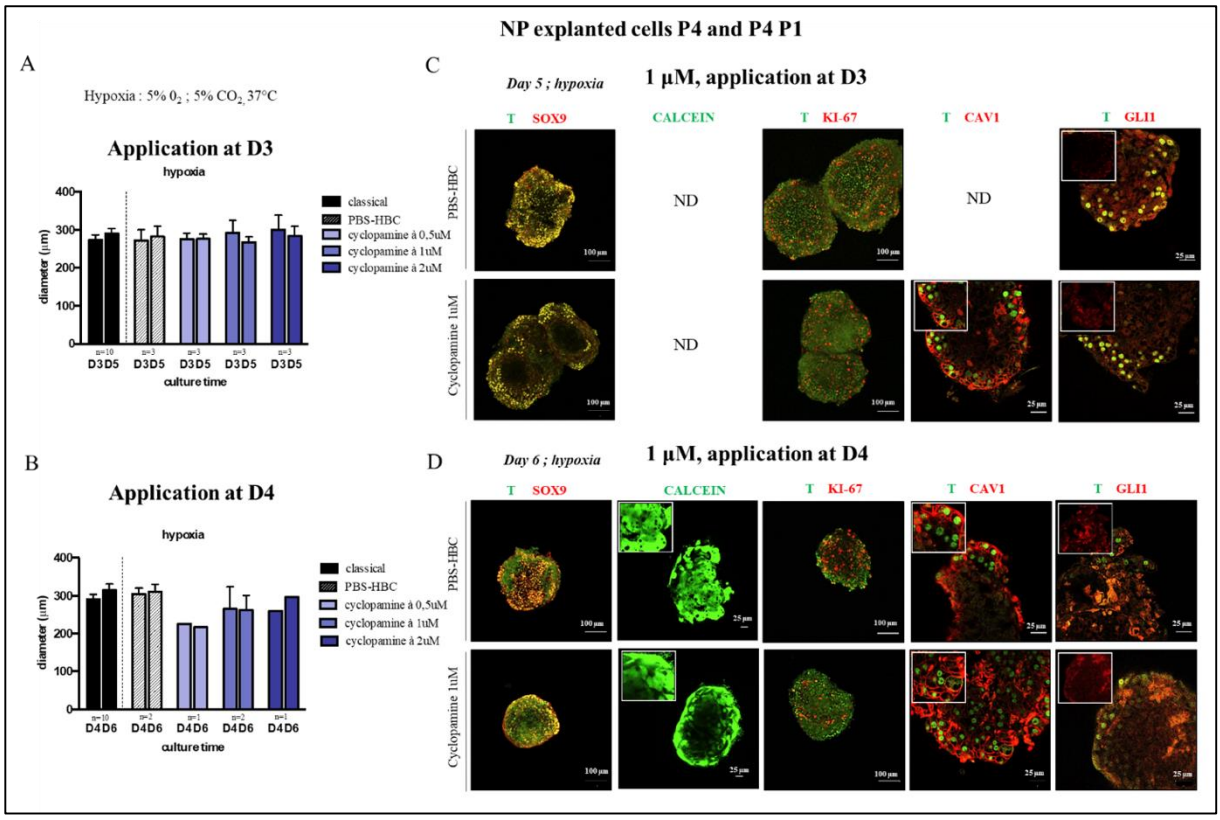


Figure 44: *Impact de l'inhibition de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) par la cyclopamine (inhibiteur du récepteur Smoothened) sur la croissance et le phénotype des cellules de NP murins à P4 (4 jours après la naissance) et P4 P1 (après dissociation mécanique). (A) La détermination de la croissance des micromasses en hypoxie (mesure du diamètre en micromètre) a été réalisée à partir d'images obtenues en microscopie à contraste de phase (données non illustrées) et déterminée en fonction de la concentration de cyclopamine ajoutée pendant 48h dans le milieu de culture au troisième jour (D3) ou (B) quatrième jour de culture (D4). La condition classique est un contrôle de croissance d'explants en hypoxie et la condition PBS-HBC est une condition contrôle de la toxicité éventuelle du PBS-HBC (dans lequel est diluée la cyclopamine) ajouté dans le milieu de culture. Le nombre d'expériences est indiqué en dessous des histogrammes. Application à Jour3 : n micromasses mesurées pour la condition classique>210 par jour ; n micromasses mesurées pour les autres conditions >10 par jour. Application à Jour4 : n micromasses mesurées pour la condition classique>175 par jour ; n mesurées pour les conditions PBS-HBC et cyclopamine 1 µM >30 par jour ; n micromasses mesurées pour les condition cyclopamine 0,5 µM et 2 uM >4 par jour. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni quand les n expérimentaux le permettent ; p>0,05. (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants après cinq jours de culture en condition contrôle PBS-HBC ou après trois jours de culture en condition contrôle puis deux jours de culture en présence de 1 µM de cyclopamine. (D) Immunofluorescences réalisées sur les explants après six jours de culture en condition contrôle PBS-HBC ou après quatre jours de culture en condition contrôle puis deux jours de culture en présence de 1 µM de cyclopamine. Pour l'application à D3, n micromasses imagées ≥2 par double marquage et par condition, sauf pour les marquages calcéine et T-CAV1 dans la condition PBS-HBC. Pour l'application à D4, n micromasses imagées ≥2 par marqueur et par condition. T, SOX9, et la présence de vacuoles (détectées par marquage à la calcéine) sont des marqueurs phénotypiques des cellules de NP à P4. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. La protéine GLI1 est une cible directe de la voie de signalisation Shh. T : BRACHYURY ; CAV1 : CAVEOLINE1 ; GLI1 : GLIOMA ASSOCIATED ONCOGENE 1 ; ND : résultat non défini.*

Des IF ont été réalisées pour toutes les conditions testées, mais ne sont présentés ici que les résultats obtenus pour la dose 1 µM, qui entraine une diminution de la croissance pour les deux jours d'application testés. Les IF révèlent tout d'abord un maintien de l'identité avec une majorité de cellules (T^+-$SOX9^+$) (***Figure 44C-D***). De manière intéressante, la densité des vacuoles tend à diminuer en présence de 1µM de cyclopamine ajouté à Jour4. En revanche, une absence d'effet visible sur la capacité proliférative des cellules et la distribution de CAV1 est à noter. Enfin, du fait de la difficulté d'obtenir un marquage de GLI1 de qualité (malgré l'utilisation de deux anticorps (R&D systems, AF3455 ; Abcam, ab49314) et des essais de dilutions et d'optimisation du temps de perméabilisation durant l'IF) il n'est pas toujours possible de déterminer de modification de la localisation subcellulaire ou de l'intensité du signal de GLI1. Une application de 1µM de cyclopamine à Jour3 tend tout de même à diminuer l'intensité du signal de GLI1 au sein des noyaux des cellules de NP, indiquant une diminution de l'activité de la voie de signalisation Shh, en comparaison à la condition contrôle.

La même expérience a été réalisée sur des explants de cellules de notochorde (E11.5 P1). Cette fois, la cyclopamine a été ajoutée au milieu de culture à Jour4 ou Jour7 pendant 48h (***Figure 45A-B***). Une application à Jour4 n'entraine pas de diminution du diamètre des micromasses en comparaison avec la condition contrôle, quel que soit la concentration de la cyclopamine, montrant une absence d'effet dose dépendante. Une application à Jour7 entraine en revanche une tendance à une plus faible croissance des micromasses cultivées en présence de 1µM de cyclopamine en comparaison au contrôle est observée. Enfin, une tendance à la diminution de la croissance est observée après ajout de 2µM de cyclopamine. Ayant observé une perte de l'identité cellulaire (cellules T^--$SOX9^+$) après ajout de 2µM à Jour4 (IF, données non illustrées dans le manuscrit), seules les IF pour l'ajout de 1µM sont présentées. Pour un ajout à Jour 7, l'effet de diminution du diamètre des micromasses n'étant visible qu'avec ajout de 2µM, seules les IF pour cette condition sont présentées. Nos résultats montrent qu'une application de cyclopamine à Jour4 n'entraine aucune modification de l'identité cellulaire, (cellules T^+-$SOX9^+$, vacuoles), de la capacité proliférative (cellules T^+-$KI\text{-}67^+$), ou de la distribution de GLI1 et PTCH 1 (***Figure 45C-D***).

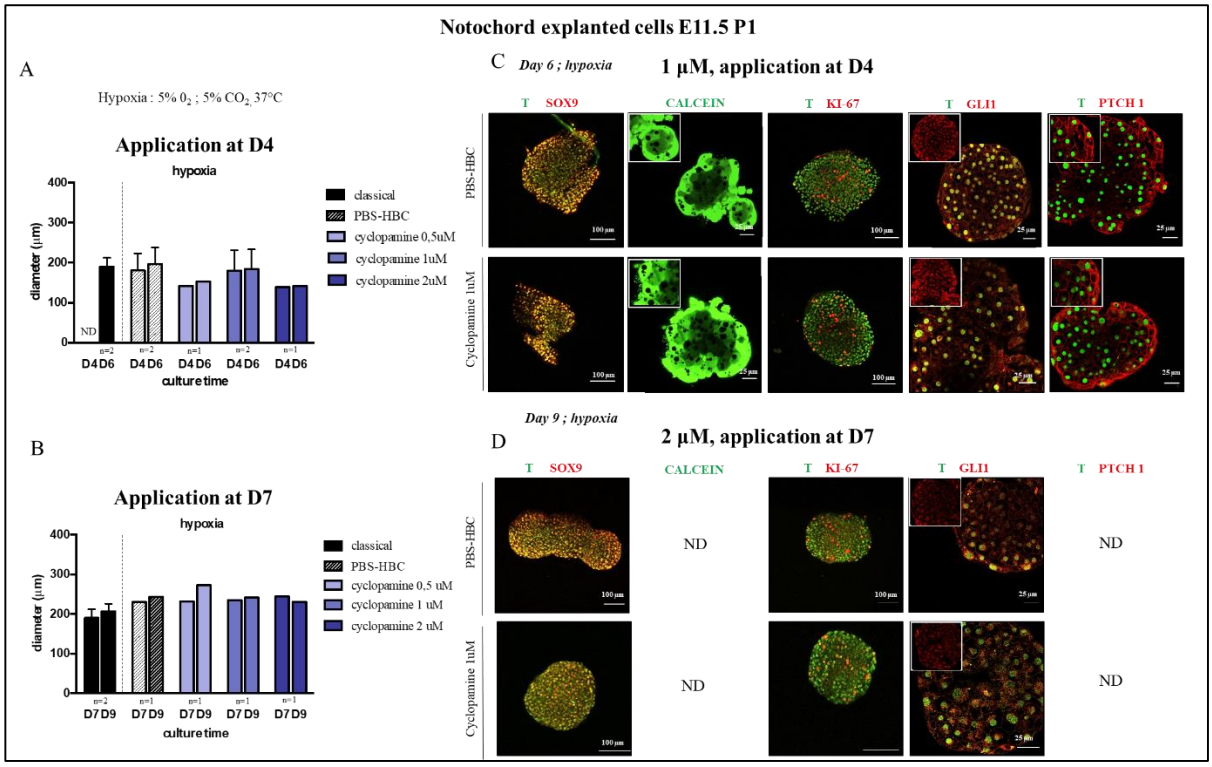


Figure 45: *Impact de l'inhibition de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) par la cyclopamine (inhibiteur du récepteur Smoothened) sur la croissance et le phénotype des cellules de notochorde murine à E11.5 (jour embryonnaire 11.5) après dissociation mécanique aux aiguilles de tungstène (E11.5 P1). (A) La détermination de la croissance des micromasses en hypoxie (mesure du diamètre en micromètre) a été réalisée à partir d'images obtenues en microscopie à contraste de phase (données non illustrées) et déterminée en fonction de la concentration de cyclopamine ajoutée pendant 48h dans le milieu de culture au quatrième jour de culture (D4) ou (B) septième jour de culture (D7). La condition classique est un contrôle de la croissance d'explants en hypoxie et la condition PBS-HBC est une condition contrôle de la toxicité éventuelle du PBS-HBC (dans lequel est diluée la cyclopamine) ajouté dans le milieu de culture. Le nombre d'expériences est indiqué en dessous des histogrammes. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni quand les n expérimentaux le permettent ; p>0,05. Application à Jour4 : n micromasses mesurées pour la condition classique>30 à jour6 ; n micromasses mesurées pour les conditions PBS-HBC et cyclopamine 1 µM>15 par jour ; n micromasses mesurées pour les conditions cyclopamine 0,5 µM et 2 uM >3 par jour. Application à Jour7 : n micromasses mesurées pour la condition classique>15 par jour ; n mesurées pour les autres conditions >4 par jour. (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants après quatre jours de culture en condition contrôle PBS-HBC ou après deux jours de culture en condition contrôle puis deux jours de culture en présence de 1 µM de cyclopamine. (D) Immunofluorescences réalisées sur les explants après sept jours de culture en condition contrôle PBS-HBC ou après cinq jours de culture en condition contrôle puis deux jours de culture en présence de 1 µM de cyclopamine.* Pour l'application à D4, n micromasses imagées ≥2 par marqueur et par condition. Pour l'application à D7, n micromasses imagées ≥1 par marqueur et par condition sauf pour le marquage calcéine et PTCH 1 dans les deux conditions. *SOX9, et les vacuoles (détectées par marquage à la calcéine) sont des marqueurs phénotypiques des cellules de notochorde à E11.5. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. La protéine GLI1 est une cible directe de la voie de signalisation Shh et PTCH 1 est le récepteur de la voie. T : BRACHYURY ; CAV1 : CAVEOLINE1 ; GLI1 : GLIOM ASSIOCIATED ONCOGENE 1 ; PTCH 1 : PATCHED 1. ND : résultat non défini.*

Activation de la voie de signalisation Shh

La voie de signalisation Shh a été activée par l'ajout de SAG (smoothened agonist) dans le milieu de culture des explants de NP (P4 et P4 P1). Le SAG a été appliqué pendant 48h à différents jours d'application (Jour3 et Jour7), ainsi que différentes doses (50nM et 100nM).

La voie de signalisation Shh étant impliquée dans la modulation de la prolifération des cellules du NP (Dahia et al. 2012), les explants ont été placés en normoxie (condition pour laquelle la capacité proliférative est plus faible), afin de maximiser l'effet attendu de l'activation de la voie Shh. Le SAG étant resuspendu dans une solution de DMSO (diméthyl sulfoxide), une condition contrôle a été réalisée avec des micromasses placées dans un milieu de culture contenant le même volume de DMSO que la condition expérimentale pour laquelle la concentration maximale de SAG testée est inférieure à <0,1% du volume final. Les résultats obtenus pour une croissance en normoxie dans le milieu classique sont également représentés. Les résultats montrent tout d'abord que tout comme la condition contrôle, une absence d'augmentation du diamètre des micromasses cultivées en présence de DMSO dans le milieu de culture est observée, pour une application à Jour3 ou Jour7 (***Figure 46A-B***). Les mesures de diamètre montrent une diminution significative de la taille des micromasses cultivées en présence de 50nM de SAG à partir de Jour3, mais une tendance à l'augmentation est observée avec 100nM, indiquant que la dose de 50nm n'est pas suffisante pour induire un effet sur la croissance des micromasses. Une application du SAG à Jour7 entraine une tendance à l'augmentation de la taille des micromasses avec les deux doses testées. Comme une tendance à l'augmentation du diamètre des micromasses est observée après ajout de SAG 100nM à Jour3 et Jour7, seules les IF correspondantes sont présentées. Les images obtenues révèlent un maintien de l'identité (T^+-$SOX9^+$; densité de vacuoles) et ne mettent pas en évidence d'augmentation de la capacité proliférative ou de modification de la distribution de CAV1 avec un ajout de SAG 100nM à Jour3 ou Jour7 (***Figure 46C-D***). Enfin, une tendance à l'augmentation du signal de GLI1 nucléaire est observée pour une application de SAG à Jour3 et à Jour7, indiquant une suractivation de la voie Shh en comparaison à la condition contrôle.

La même expérience a été réalisée sur des explants de cellules de notochorde (E11.5 P1). Cette fois, le SAG a été ajouté au milieu de culture à Jour4 ou Jour7 pendant 48h. Une application de SAG à Jour4 entraine une tendance à l'augmentation du diamètre des micromasses pour les deux doses testées, alors que la taille n'augmente pas dans le contrôle DMSO ***(Figure 47 A-B)***. L'augmentation du diamètre avec la dose de 100nM est également retrouvée pour une application à Jour7. L'augmentation du diamètre des micromasses en comparaison au contrôle n'étant visible qu'après un aout de 100nM de SAG, seules les IF obtenues pour cette condition sont présentées.

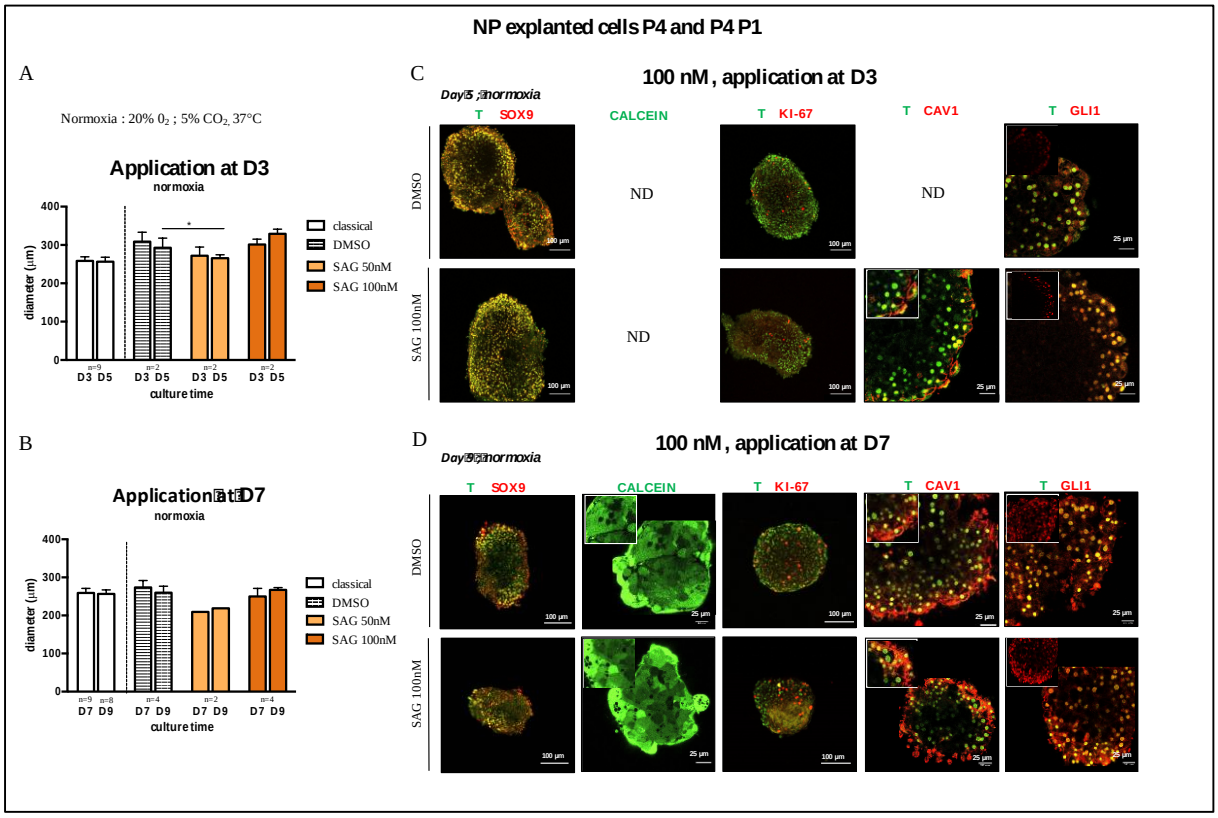


Figure 46: *Impact de la suractivation de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) par le SAG (agoniste du récepteur Smoothened) sur la croissance et le phénotype des cellules de NP murins à P4 (4 jours après la naissance) et P4 P1 (après dissociation mécanique). (A) La détermination de la croissance des micromasses en hypoxie (mesure du diamètre en micromètre) a été réalisée à partir d'images obtenues en microscopie à contraste de phase (données non illustrées) et déterminée en fonction de la concentration de SAG ajoutée pendant 48h dans le milieu de culture au troisième jour de culture (D3) ou (B) septième jour de culture (D7). La condition classique est un contrôle de croissance d'explants en normoxie et la condition DMSO est une condition contrôle de la toxicité éventuelle du DSMO (dans lequel est dilué le SAG) ajouté dans le milieu de culture. Le nombre d'expériences est indiqué en dessous des histogrammes. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. Application à Jour3 : n micromasses mesurées pour la condition classique>190 par jour ; n micromasses mesurées pour les autres conditions >4 par jour. Application à Jour7 : n micromasses mesurées pour la condition classique>195 par jour ; n mesurées pour les conditions DMSO et SAG 100nM >30 par jour ; n micromasses mesurées pour la condition SAG 50nM >5 par jour. ANOVA 2 voies, post-test de multiples comparaison Bonferroni quand les n expérimentaux le permettent ; *p<0,05. (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants cultivés après cinq jours de culture en condition contrôle DMSO ou après trois jours de culture en condition contrôle puis deux jours de culture en présence de 100nM de SAG. (D) Immunofluorescences réalisées sur les explants après neuf jours de culture en condition contrôle DMSO ou après sept jours de culture en condition contrôle puis deux jours de culture en présence de 100nM de SAG. Pour l'application à D3, n micromasses imagées ≥1 par double marquage et par condition, sauf pour le marquage calcéine et T-CAV1 dans la condition DMSO. Pour l'application à D7, n micromasses imagées ≥3 par marqueur et par condition. T, SOX9, et la présence de vacuoles (détectées par marquage à la calcéine) sont des marqueurs phénotypiques des cellules de NP à P4. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. La protéine GLI1 est une cible directe de la voie de signalisation Shh. T : BRACYURY ; CAV1 : CAVEOLINE1, GLI1 : GLIOMA ASSOCIATED ONCOGENE 1, ND : résultat non défini.*

Les IF ne révèlent pas de modification de l'identité (T^+-$SOX9^+$; densité de vacuoles), de la capacité prolifératives (T^+-$KI\text{-}67^+$) et de la distribution de CAV1 (***Figure 47 C-D***). Enfin, GLI1 est

détectée dans le noyau dans toutes les conditions, mais la qualité du marquage ne permet pas de déterminer de modification de l'intensité du signal nucléaire avec l'application du SAG.

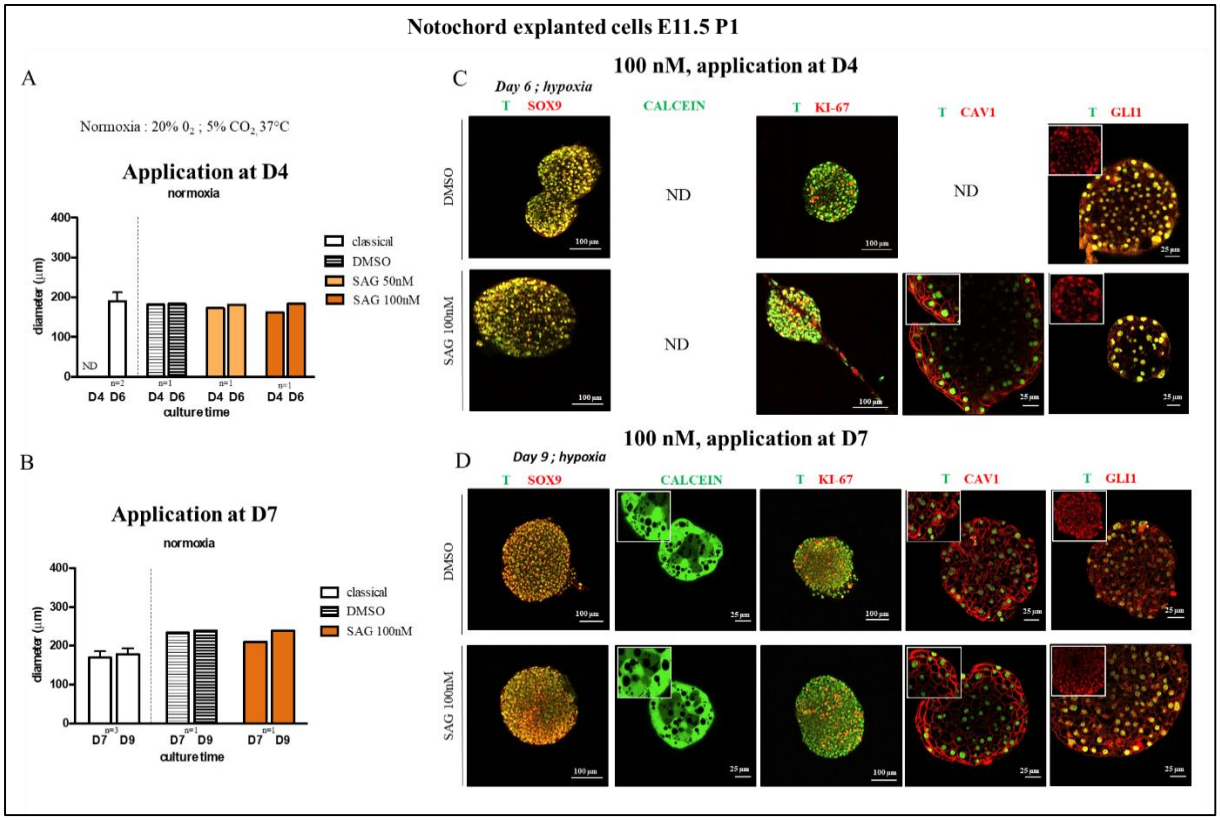


Figure 47: *Impact de la suractivation de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) par le SAG (agoniste du récepteur Smoothened) sur la croissance et le phénotype des cellules de notochorde à E11.5 (jour embryonnaire 11.5) après dissociation mécanique aux aiguilles de tungstène (E11.5 P1).. (A) La détermination de la croissance des micromasses en hypoxie (mesure du diamètre en micromètre) a été réalisée à partir d'images obtenues en microscopie à contraste de phase (données non illustrées) et déterminée en fonction de la concentration de SAG ajoutée pendant 48h dans le milieu de culture au quatrième jour de culture (D4) ou (B) septième jour de culture (D7). La condition classique est un contrôle de croissance d'explants en normoxie et la condition DMSO est une condition contrôle de la toxicité éventuelle du DSMO (dans lequel est dilué le SAG) ajouté dans le milieu de culture. Le nombre d'expériences est indiqué en dessous des histogrammes. Les résultats sont exprimés en moyenne ±SEM. Application à Jour4 : n micromasses mesurées pour la condition classique>10 pour Jour6 ; n micromasses mesurées pour les autres conditions >3 par jour. Application à Jour7 : n micromasses mesurées pour toutes les conditions >10 par jour. (C) Immunofluorescences réalisées sur les explants après six jours de culture en condition contrôle DMSO ou après quatre jours de culture en condition contrôle puis deux jours de culture en présence de 100nM de SAG. (D) Immunofluorescences réalisées sur les explants après neuf jours de culture en condition contrôle DMSO ou après sept jours de culture en condition contrôle puis deux jours de culture en présence de 100nM de SAG. Pour l'application à D4 n micromasses imagées ≥1 par marqueur et par condition sauf pour le marquage calcéine et CAV1 dans la condition DMSO. Pour l'application à D7, n micromasses imagées ≥1 par marqueur et par condition. T, SOX9, et la présence de vacuoles (détectées par marquage à la calcéine) sont des marqueurs phénotypiques des cellules de NP à P4. La protéine KI-67 est exprimée par les cellules qui sont dans le cycle cellulaire. La protéine GLI1 est une cible directe de la voie de signalisation Shh. T : BRACHYURY ; CAV1 : CAVEOLINE1, GLI1 : GLIOMA ASSOCIATED PROTEIN, ND : résultat non défini.*

CHAPITRE IV- DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus dans ma thèse sur l'étude de l'expression des protéines cavéolaire et de la densité des cavéoles au cours du temps, l'étude de l'impact de la perte des cavéoles sur l'expression des protéines cavéolaires, la capacité prolifération des cellules du NP et l'activité de voie de signalisation Shh sont rapportés dans la figure 50 (***Figure 50***). Les résultats de l'étude *in vitro* de l'impact de l'hypoxie et de l'osmolarité sur l'identité des cellules de notochorde (E11.5) et de NP (P4), la capacité prolifération, l'expression des protéines cavéolaires et la densité des cavéoles sont résumés dans une représentation schématique (***Figure 51***).

I Fonction des cavéoles/cavéoline1 dans le développement et la croissance du DIV

I.1 Densité cavéolaire et transformation notochorde-NP

L'étude de la densité et de la morphologie des cavéoles chez la souris montre une augmentation de la densité des cavéoles à la membrane des CNTS embryonnaires et matures entre le stade embryonnaire E14.5 et le stade post-natal P4, s'accompagnant d'un aplatissement à la membrane (cf Figure 1 du papier expérimental). De plus, une diminution de la densité est observée avec l'âge, entre 1 et 3 mois. Les analyses histologiques révèlent la présence de CAV1 et CAVINE1 au stade de notochorde embryonnaire, avant sa transformation en NP. Ces données sont en accord avec la littérature qui montre la détection des cavéoles au sein de la notocorde de poisson-zèbre (Nixon et al. 2007).

Les immunofluorescences sur coupes d'embryons montrent également un début d'expression de CAV1 et EHD2 dès E12.5 et CAVINE1 à E13.5. Ce résultat est en cohérence avec la littérature qui montre que l'expression de CAV1 membranaire permet le recrutement de CAVINE1 afin de former la cavéole (Bastiani et al. 2009). Le rôle de EHD2 dans la biogenèse des cavéoles n'est quant à lui pas connu En revanche, son implication dans la reformation des cavéoles après un désassemblage en réponse à un stress cellulaire a été prouvée (Torrino et al. 2018). Même si les données que nous avons obtenues ne mettent pas en évidence de phénotype à des stades précoces de développement en absence de *Cav1,* des analyses complémentaires en MET à E11.5 ; E12.5 et E13.5 permettraient de déterminer le stade embryonnaire de formation des cavéoles tout en indiquant une potentielle action de CAV1 membranaire

indépendante des cavéoles, comme retrouvé au sein des tissus qui expriment CAV1 sans présenter de cavéole (Harris et al. 2002; Masserini et al. 1999).

Les mécanismes d'action conduisant à la disparition des CNTs dans la région des futures vertèbres et à la condensation de ces cellules dans la région du futur NP, sont encore peu connus aujourd'hui. Des hypothèses d'une prolifération et apoptose préférentielle des CNTs respectivement dans les régions du futur NP et des futures vertèbres ainsi que l'importance des contraintes mécaniques dans ce processus sont avancées (Aszódi et al. 1998; Cotten et al. 1994). En effet, cette seconde hypothèse suggère que le développement des corps vertébraux exerce un stimulus mécanique sur la notochorde, induisant une migration des CNTs dans la région du futur NP (Rufai et al. 1995). La littérature montre que la voie de signalisation Hippo est impliquée dans la prolifération des cellules en réponse aux contraintes mécaniques et que les protéines YAP et TAZ de la voie sont essentielles à la formation des cavéoles chez le poisson-zèbre (Dupont et al. 2011 ; Rausch et al. 2019). Afin d'étudier une potentielle régulation de la prolifération des CNTs et cellules du NP par la voie Hippo, Kelly Coutant a durant son master1 mis au point la détection de la protéine YAP sur des coupes histologiques d'embryons à E13.5. Les résultats préliminaires obtenus montrent une localisation cytoplasmique de la protéine YAP au sein des cellules notochordales, au niveau de la région du futur NP comme de la future vertèbre. De manière intéressante, le signal YAP cytoplasmique semble plus important aux niveau des zones de formation de futures vertèbres, fortement soumises aux contraintes mécaniques et présentant peu de cellules prolifératives, suggérant une forte inhibition de la prolifération par l'inactivation de YAP dans ces zones. Ces données restent à confirmer sur un nombre plus important d'individus. De plus, l'absence de phénotype visible de la structure de la notochorde en absence de *Cav1* ne nous permet pas de prouver un rôle prépondérant des cavéoles dans la transformation de la notochorde en NP.

I.2 Evolution de la densité et la morphologie des cavéoles : de la croissance au vieillissement

L'augmentation de la densité et l'aplatissement des cavéoles observés à la membrane des CNTs matures à P4 pourrait être un mécanisme de réponse aux forts changements subis par le NP en croissance, notamment l'application de contraintes mécaniques quotidiennes, possiblement plus importantes que celles appliquées sur la notochorde.

Dès la maturité squelettique et avec le vieillissement, une diminution de la cellularité est observée dans le NP et ce dernier est majoritairement composé de NPcytes. Ces changements cellulaires altèrent alors la répartition des contraintes mécaniques sur l'ensemble du DIV. A 3 mois, le NP murin présente encore une majorité de CNTs mais il serait tout de même intéressant de réaliser une quantification des cavéoles en distinguant les deux populations cellulaires dans la perspective d'interpréter la diminution de la densité cavéolaire observée entre 1 et 3 mois.

I.3 Absence de phénotype visible chez les souris *Cav1*$^{-/-}$ malgré la densité cavéolaire importante

L'étude du phénotype des souris invalidées pour le gène *Cav1* ne révèle pas de défaut structurant de la notochorde embryonnaire et du NP (cf Figure2 du papier expérimental). Les images obtenues en MET montrant une densité importante des cavéoles au sein des membranes de cellules de notochorde embryonnaire et de NP, l'absence de défaut majeur au sein de ces tissus est surprenante. Des études chez le poisson zèbre montrent en revanche que l'absence de *Cav1* conduit à une interruption de la notochorde et que les mutants *Cavin1b* présentent des lésions de la notochorde, de plus en plus sévères suivant l'axe rostro-caudal (Lim et al. 2017; Nixon et al. 2007). De plus, dans ce modèle, l'application de contraintes mécaniques (stimulations électriques) entraine une destruction des cellules et une augmentation de la sévérité des lésions de la notochorde, conduisant à des défauts locomoteurs importants. Ces données indiquent donc une différence importante quant à l'implication des cavéoles dans le développement embryonnaire entre ces deux modèles animaux, suggérant également l'implication de mécanismes de compensation de la perte des cavéoles chez la souris. En effet, les souris invalidées pour *Cav1* et *Cavine1* survivent à l'âge adulte, mais présentent une hypofertilité et une durée de vie réduite (Parton et al. 2020b). A l'heure actuelle, les seules informations apportées sont encore une fois chez le poisson zèbre et démontrent que la destruction des cellules de notochorde en absence de cavéole, entraîne un relargage de nucléotides favorisant la trans-différenciation des cellules de la gaine péri-notochordale et leur invasion au sein de la notochorde (Garcia et al. 2017). Ce mécanisme entraine une restauration de la notocorde et un développement normal de la colonne vertébrale. Ces résultats sont toutefois non transposables au modèle murin, dans lequel la gaine péri-notochordale est définie comme acellulaire (Jurand 1974; Paavola et al. 1980).

Nous pouvons ainsi proposer quelques pistes de recherche pour l'élucidation de mécanismes de compensation de la perte des cavéoles, telles un rôle de CAV1 indépendant des cavéoles ou un développement altéré des vertèbres (qui exécraient alors une plus faible pression sur la notochorde, permettant la formation du NP malgré la réponse mécaniques altérée). L'élucidation de ces mécanismes de compensations dans le modèle murin permettrait alors d'augmenter les connaissances sur la formation du squelette axial et la mise en place du DIV dans ce modèle.

Dans ce contexte, des résultats préliminaires que nous avons déjà obtenus pourraient apporter une perspective de recherche intéressante. En effet, des figures autophagiques sont détectées en MET dès le développement embryonnaire (E14.5) et la croissance post-natale (P4) du DIV, uniquement chez les individus *Cav1*$^{-/-}$ (***Figure 48***).

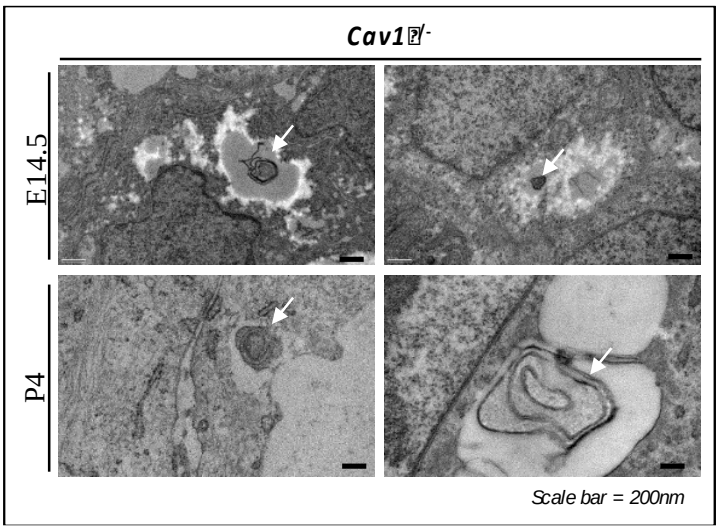


Figure 48: *Images de microscopie électronique à transmission (MET) de cellules de notochorde (E14.5) et de NP murins à P4 (4 jours après la naissance). Les flèches indiquent les structures autophagiques détectées uniquement chez les individus Cav1*$^{-/-}$*. Cav1 : cavéoline1.*

L'autophagie est considérée comme un mécanisme de protection adaptatif des cellules en réponse à différents stress (l'hypoxie ou les compressions mécaniques au sein du DIV), dans le but de dégrader des organelles ou protéines dysfonctionnelles (Choi et al. 2016 ; Ma et al. 2013; Shapiro et al. 2014). Cette étude est bien sûr à poursuivre, mais il est possible d'émettre l'hypothèse que l'augmentation du niveau d'autophagie en absence de cavéole serait dû à la réponse altérée des cellules du NP au stress hypoxique et/ou mécanique. Malgré l'absence de phénotype structurel de la notochorde en absence de *Cav1*, ces résultats suggèrent tout de même la présence d'un phénomène de compensation de la perte des cavéoles, qui serait mis en place précocement afin de permettre la formation du NP, mais qui a terme ne suffirait plus

à maintenir l'homéostasie discale et entrainerait l'apparition du processus dégénératif accéléré dès 1,5 mois chez les mutants *Cav1*$^{-/-}$ (Bach et al. 2016).

Tout comme pour l'étude du rôle de la signalisation Shh dans la formation du DIV, la réalisation de combinaisons de mutations conditionnelles des protéines cavéolaires permettrait de mieux appréhender la modulation des mécanismes d'action cellulaires et moléculaire en absence des cavéoles durant le développement embryonnaire. En effet, les études de l'activité de la voie Shh ont permis de faire avancer les connaissances sur la formation du DIV en montrant que Shh sécrété uniquement par la notochorde est requis pour la formation du DIV et en mettant en évidence une action temporelle de Shh avec des défauts structurants du squelette axial pour des invalidations avant E11.5 (Choi and Harfe 2011; Choi et al. 2012). Nos résultats montrent que CAVINE1 est exprimée au sein CNTs embryonnaires et cellules de NP, mais aussi au sein des cellules du sclérotome et de l'AF. Des mutations conditionnelles de *Cavine1* et *Cav1* au sein de la notochorde permettraient ainsi d'étudier l'impact de l'absence de cavéoles sur la formation du NP mais aussi de l'AF et de déterminer l'éventuelle implication des cavéoles présentent dans la notochorde et/ou le sclérotome dans ces processus. Une invalidation de *Ehd2* au sein de la notochorde permettrait également d'étudier l'impact de la perturbation de la dynamique des cavéoles en réponse aux contraintes mécaniques ou à l'hypoxie. Enfin, des invalidations conditionnelles de ces trois gènes, par exemple avant/après la formation de la gaine péri-notochordale, pourraient également apporter des informations quant au stade de biogenèse des cavéoles au sein de la notochorde et mettre en évidence des actions variables selon le stade de développement.

I.4 Rôle de CAV1 dans la modulation de la capacité prolifératives des cellules du NP

Malgré l'absence de phénotype visible en l'absence de *Cav1*, nos résultats montrent une augmentation de la capacité prolifératives des cellules durant la croissance post-natale du NP, ainsi qu'une modulation de l'activité de la voie de signalisation Shh (cf Figures 4 et 5 du papier expérimental). Le rôle de *Cav1* dans la modulation de la prolifération cellulaire avait déjà été décrit dans les cancers et dans le modèle de souris *Cav1*$^{-/-}$ qui présentent une hyper prolifération des cellules endothéliales pulmonaires (Li et al. 2006; Razani et al. 2001). C'est la première fois que cette fonction est décrite au sein du tissu discal. En effet, des études d'invalidation de *Cav1* chez la souris renseignent une augmentation de l'apoptose à partir de

1,5 mois (Bach et al. 2016b) et l'apparition d'une dégénérescence précoce à 3 mois mais pas de phénotype de prolifération cellulaire (Smolders et al. 2013). Notre étude augmente ainsi les connaissances sur la modulation de la prolifération des cellules du NP durant la croissance post-natale. De plus, ces résultats se démarquent des autres études publiées sur l'étude des fonctions de CAV1 dans le disque qui se concentrent sur les phases de vieillissement du DIV. L'ensemble de ces données permet d'appuyer l'hypothèse d'une dualité d'action CAV1 et des cavéoles en relation avec les stades de croissance, de maturation et de vieillissement du DIV. Ce mécanisme d'action est également proposé dans les cancers, dans lesquels *Cav1* a un rôle de suppresseur de tumeur dans le tissu sain ou les tumeurs primaires en inhibant la prolifération et en protégeant les cellules du stress, mais un rôle de pro-oncogène dans les tumeurs résistantes aux traitements et les métastase en favorisant l'invasion cellulaire et la résistance aux drogues (Raudenska et al. 2020).

Enfin, une piste d'étude possible afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation de la prolifération par CAV1 serait une étude quantitative et qualitative (mesure de la taille) des vacuoles. En effet, une étude chez le poisson-zèbre montre que l'absence ou la fragmentation des vacuoles au sein de la notochorde entraine une diminution de la taille des individus et des défauts de formation de la colonne vertébrale (Ellis et al. 2013). Chez la souris en revanche, l'absence de *Cav1* n'entraine pas de retard de croissance ou de diminution de la taille des animaux (Trushina et al. 2006). Cependant, une étude propose un modèle théorique dans lequel la présence de larges vacuoles au sein du NP juvénile permettrait l'activation de jonctions intercellulaires activant la voie de signalisation Hippo YAP/TAZ, régulant ainsi la prolifération et la croissance du tissu (Hong et al. 2019) (***Figure 49***). Une étude quantitative et qualitative des vacuoles au sein des NP *Cav1*$^{-/-}$ en croissance serait donc intéressante.

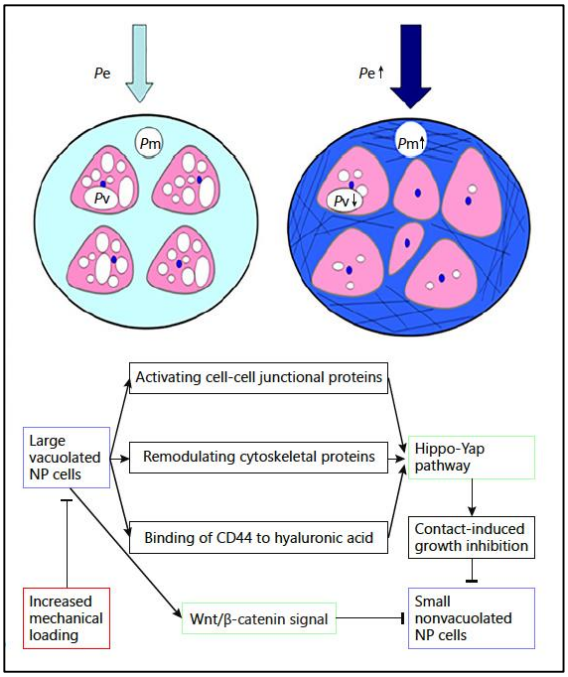


Figure 49: *Représentation schématique du rôle des vacuoles dans la réponse mécanique des cellules notochordales matures au sein du NP. Pe : contraintes mécaniques extracellulaires ; Pv : force mécanique exercée par les vacuoles ; Pm : force mécanique absorbée par la matrice extracellulaire. D'après Hong et al. 2019*

I.5 Lien entre l'activité de la voie de signalisation Shh et CAV1 ?

Les données de la littérature montrent que CAV1 a majoritairement un rôle inhibiteur sur l'activité des voies de signalisation et qu'elle est co-localisée avec le récepteur PTCH 1 *in vitro* (Karpen et al. 2001). De plus, la voie de signalisation Shh est fortement impliquée dans la prolifération des cellules du NP en croissance puisqu'une inhibition de SMO au sein des cellules du NP par la cyclopamine entraîne une diminution de la prolifération des cellules du NP et une diminution de l'expression des marqueurs phénotypiques T et SOX9 (Dahia et al. 2012). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que l'interaction directe de CAV1 et PTCH 1 à la membrane des cellules de NP entrainerait la modulation de son activité et donc de l'activité de la voie de signalisation Shh et potentiellement de la prolifération cellulaire. PTCH 1 étant également une cible directe de la voie Shh, il entraîne un rétrocontrôle négatif de l'activité de la voie. L'augmentation de son expression ne peut donc pas totalement traduire une augmentation de l'activité de la voie Shh. Il serait ainsi intéressant de réaliser des détections des protéines GLI1 et GLI3 sur des coupes de rachis de souris *Cav1*$^{+/+}$ et *Cav1*$^{-/-}$. Ces protéines participent à la cascade de signalisation Shh et sont respectivement activatrices et inhibitrices de la transcription des gènes cibles de la voie. Connaître leur profil d'expression traduirait donc plus précisément l'activité de la signalisation Shh en absence de *Cav1*.

De manière intéressante, les détections de KI-67 et PTCH 1 sur des coupes de rachis de souris *Cav1*$^{+/+}$ et *Cav1*$^{-/-}$ montrent une distribution préférentielle des cellules KI-67^{+} au niveau des couches cellulaires proches des contours du NP, et ce à tous les stades étudiés et en présence ou absence de *Cav1* (cf Figures 4, 5 et S2 du papier expérimental). Une distribution préférentielle de la luminance de PTCH 1 au niveau des couches cellulaires proches des contours du NP est également retrouvée à E17.5 et P4. Ces données indiquent premièrement que l'absence de *Cav1* ne conduit pas à une modification de la répartition des cellules prolifératives ni de l'activité de la voie Shh. Deuxièmement, ces données permettent également de suggérer que soit les cellules localisées dans les couches externes ne perçoivent pas les mêmes signaux que celles situées au centre du NP ou soit que les cellules localisées dans les couches externes n'ont pas les mêmes compétences à recevoir un même signal en comparaison aux cellules retrouvées plus au centre du NP. Il est possible de suggérer que les cellules localisées dans les couches externes du NP pourraient présenter une densité de cavéoles membranaires plus importante en comparaison au cellules situées plus au centre, entrainant des réponses aux contraintes mécaniques différentes et pouvant ainsi modulant l'activité de voies de signalisations telle la voie Shh.

Il serait intéressant de poursuivre l'analyse du lien entre CAV1 et la voie de signalisation Shh, notamment en étudiant le rôle du cil primaire. En effet, des données de la littérature montrent que des microdomaines enrichis en CAV1 sont présents à la base du cil primaire (essentiel à la transduction de la voie) et permettent la translocation et l'activation du récepteur SMO, dépendante de PTCH 1 (Schou et al. 2015). Une perte du cil primaire et/ou une modulation de l'activation de la voie Shh pourraient ainsi perturber la distribution ou l'expression de CAV1.

I.6 Quels éléments de réponse à l'apparition de la dégénérescence précoce en absence de *Cav1* ?

Notre étude permet de réaliser des avancées dans les connaissances sur le développement embryonnaire et la croissance post-natale du DIV, ainsi quand dans le rôle de *Cav1* dans ce dernier processus. En revanche, il reste aujourd'hui difficile de relier l'augmentation de la capacité proliférative et l'augmentation de l'activité de la voie de signalisation Shh avec l'apparition de la dégénérescence précoce à 3 mois chez les souris *Cav1*$^{-/-}$.

La dégénérescence discale est une pathologie multifactorielle et voit sa fréquence d'apparition augmenter par l'apparition préalable de maladies métaboliques telles l'obésité

ou le diabète (Kauppila 2009; Russo et al. 2019). Les souris invalidées pour *Cav1* présentent des troubles métaboliques décelables dès 3 mois (Razani et al. 2002). Cependant, l'augmentation du niveau d'apoptose au sein des NP de souris *Cav1*$^{-/-}$ dès 1,5 mois suggère que la dégénérescence discale observée à 3 mois serait une conséquence directe de la perte des cavéoles, et non pas une conséquence de l'apparition préalable d'anomalies métaboliques.

Nos résultats, ainsi que ceux présentés dans la littérature sur le rôle de CAV1 au sein du DIV, démontrent que le NP de souris *Cav1*$^{-/-}$ à 1 mois présente une capacité proliférative supérieure à celle de NP de souris *Cav1*$^{+/+}$, mais montre une forte augmentation de l'apoptose à 1,5 mois (Bach et al. 2016b). Ces données suggèrent l'implication de mécanismes encore non élucidés entrainant ces changements cellulaires majeurs au sein du NP, et il serait donc intéressant de se concentrer sur la fenêtre de temps 1mois – 1,5 mois pour élucider l'apparition de la dégénérescence discale en absence de *Cav1*.

II Modulation *in vitro* de la densité des cavéoles à la membrane de cellules de notochorde et de NP

Afin de mettre en évidence un lien direct entre la modulation de la capacité proliférative et la modulation de la voie de signalisation Shh par CAV1, nous avons utilisé un modèle de culture *in vitro* organotypique 3D d'explants de cellules de notochorde et de NP. Nous avons ainsi voulu étudier l'effet d'une modulation de la densité des cavéoles membranaires par l'hypoxie et l'osmolarité sur l'identité, le phénotype, et la prolifération des cellules de notochorde ou de NP ainsi que sur l'activité de la voie de signalisation Shh.

II.1 Intérêts du système de culture 3D organotypique d'explants de cellules de notochorde et de NP

Une revue de la littérature fait part des nombreuses études basées sur la mise au point et l'optimisation de systèmes de culture *in vitro* de cellules de NP provenant de différents modèles animaux (Hwang et al. 2014; Mern et al. 2012). Dans un premier temps, les cellules de NP étaient cultivées en 2D en monocouche dans des plaques traitées pour l'adhésion cellulaire. Cependant, ce type de culture montre une dédifférenciation des cellules de NP, qui présentent un phénotype fibrotique incluant une diminution de l'expression du COLLAGENE

DE TYPE II et une augmentation de l'expression du COLLAGENE DE TYPE I (Kluba et al. 2005; Potier et al. 2014a; Potier et al. 2014b). De plus, en culture 2D, les passages des cellules entraînent une diminution du nombre de cellules, une dédifférenciation avec la perte des marqueurs phénotypiques *Sox9, T, Ck8* (*cytokératine8*) et la présence de stress oxydatif conduisant à la sénescence (Ashraf et al. 2020). La culture en 3D (micromasses, culture des cellules dans un scaffold) fait alors l'objet de nombreuses études (Mern et al. 2012). Une majorité de ces études est basée sur l'impact de la culture en 3D, dans différents gels par exemple, sur le contenu en ADN et la teneur en GAG au sein de la MEC. En revanche, malgré le potentiel de dédifférenciation important des cellules du NP en culture, très peu d'études contrôlent la présence des marqueurs phénotypiques majeurs des cellules du NP tels *Sox9* et *T*. De plus, une grande majorité des études se concentrent sur des NP matures ou dégénérés, afin de mettre au point des protocoles avec supplémentation de différents facteurs permettant de redifférencier les cellules de NP dans un but de thérapie cellulaire de la DDL (Kushioka et al. 2019; Pratsinis and Kletsas 2015). Enfin, dans de nombreux protocoles, le DIV entier est cultivé (NP, AF et PLC), ce qui peut être une limite à l'étude de l'activité de voie de signalisation cellulaires telles les voies Shh et Wnt, qui sont actives de manière différentielle au sein des tissus du DIV (Dahia et al. 2009a). Dans ce projet, le système de culture 3D organotypique que nous avons développé sert d'outil pour moduler *in vitro* des paramètres reconnus du microenvironnement ou le niveau d'activation de voies de signalisation impliquées dans le développement ou dans l'homéostasie discale afin d'augmenter nos connaissances sur le développement embryonnaire et la croissance post-natale du DIV, ainsi que sur les fonctions des cavéoles.

Le tissu discal étant fortement hypoxique, la grande majorité des études *in vitro*, montrent une culture en hypoxie (5% CO_2 ; 5%O_2 ; 37°C) des cellules de NP (Mern et al. 2012). Nos résultats montrent le maintien de l'identité des explants de cellules de NP P4 (expression des marqueurs T, SOX9, présence de vacuoles intracytoplasmiques) après neufs jours de culture en hypoxie et en normoxie (cf Figure 6 du papier expérimental). Cependant, l'hypoxie entraîne une croissance plus importante des explants et une tendance à l'augmentation de la densité des vacuoles et de la capacité proliférative de cellules. Ces données sont en accord avec la littérature montrant une disparition progressive des NP après la naissance en absence de HIF1α (Merceron et al. 2014). Cette étude révèle également que l'absence de *Hif1α* n'entraine pas de modification structurelle de la notochorde à E13.5 mais conduit à réduction de la taille

et du nombre des vacuoles au sein des CNTs et à la formation de NP plus petits à E15.5 due à une forte apoptose. Ces données suggèrent un rôle de l'hypoxie dans le développement embryonnaire du DIV à partir de E15.5. Nos résultats montrent une croissance des explants E11.5 en hypoxie et normoxie, avec une tendance à une capacité prolifération augmentée en hypoxie (***Figure 35***). L'identité des cellules notochordales étant maintenues dans les deux conditions, ces données indiquent donc que l'hypoxie serait favorable pour le maintien de la capacité prolifération des CNTs *in vitro*.

Les explants de notochorde à E11.5 présentent très tôt après la mise en culture une disparition de la population de cellules T^+-$FOXA2^+$, en faveur de l'apparition d'une population T^+-$SOX9^+$, en hypoxie comme en normoxie. Il est connu dans la littérature que l'expression de *FoxA2* est perdue au sein de la notochorde à partir de E12.5, supposant un rôle de cette extinction dans la formation du futur NP (Maier et al. 2013; Uetzmann et al. 2008). De plus, nous détectons la présence de vacuoles au sein des explants E11.5 P1 après neuf jours de culture dans les deux conditions (***Figure 36***). Or, il est montré dans la littérature que la différenciation de somites, et l'élongation de la notochorde (E11.5) sont requis pour la formation des vacuoles (Wang et al. 2017). Ces données appuient alors l'hypothèse d'une maturation des CNTs au cours de la culture.

II.2 Implications des cavéoles dans l'adaptation des cellules du NP à l'hypoxie

Notre étude *in vitro* montre qu'à P4, l'hypoxie entraîne une diminution de la densité des cavéoles membranaires et conduit à un aplatissement des cavéoles à la membrane des cellules de NP après neuf jours de culture (cf Figure 6 du papier expérimental). La littérature montre que des adipocytes murins cultivés en hypoxie présentent cette même diminution de la densité cavéolaire, sans modification de la distribution et de l'expression de CAV1, mais avec une diminution de l'expression de CAVINE1 (Regazzetti et al. 2015). Nos résultats montrent également une localisation membranaire de CAV1 au sein des cellules de NP en hypoxie et en normoxie. En revanche, les variabilités obtenues pour nos analyses en western blot ne nous permettent pas de réaliser des quantifications fiables de l'expression des protéines cavéolaires et compléter les résultats de l'analyse en MET. Le modèle murin permet l'obtention de matériel biologique relativement rapidement, grâce à la durée de gestation courte, mais les explants de NP murins constituent un matériel quantitativement limité qui ne nous a permis de déposer que 2 µg de protéines totales pour l'analyse en western blot. Cette

faible quantité de protéines peut constituer une limite quant à la détection des protéines et expliquer les variabilités obtenues sur les trois expérimentations indépendantes (***Figure 38***). Les dissociations mécaniques réalisées sur les explants P4 entrainent une croissance des micromasses jusqu'à Jour11, suggérant une légère amplification de la population cellulaire en comparaison aux explants natifs qui croient jusqu'à Jour9. Dans le but d'obtenir plus de matériel biologique, nous avons également testé différentes enzymes pour entrainer une dissociation cellulaire (trypsine, collagénase, accutase) (données non illustrées), mais les cellules de NP étant très fragiles, nous n'avons pas réussi à amplifier la modulation cellulaire après dissociation. Des optimisations de ces protocoles permettraient alors d'avoir un matériel suffisant pour poursuivre les analyses en western blot.

En hypoxie, une tendance à l'augmentation de la capacité prolifération des cellules de NP est également observée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vivo* en absence de *Cav1*, et permettent d'émettre l'hypothèse que la diminution de la densité de cavéoles membranaires en réponse à l'hypoxie pourrait moduler la capacité prolifération des cellules de NP en croissance.

Les tests de changements de teneur en oxygène au cours de la culture, n'ont quant à eux pas permis de mettre en évidence de modulation de la densité cavéolaire ou de la capacité prolifération des cellules (***Figure 40***). Notre matériel d'étude étant limité, nous avions choisi d'appliquer un changement de teneur en oxygène pendant 24h, mais cette durée semble trop courte pour pouvoir observer un effet sur la croissance des micromasses et la densité cavéolaire. Des tests de changements de teneur en oxygène 48 à 72h seraient donc intéressants. En revanche, les résultats indiquent un impact du passage de la normoxie à l'hypoxie avec une augentation de tous les paramètres morphologiques (largeur, profondeur et largeur du col) (***Figure 41***). Celles-ci retrouveraient alors une morphologie proche de celle des cavéoles présentes à la membrane des explants cultivés en hypoxie. L'ensemble de ces données montre que les cavéoles sont des structures dynamiques au sein de notre système *in vitro* et que l'hypoxie est un stimulu pouvant impacter leur densité et leur morphologie.

Pour les explants à E11.5, nous retrouvons une tendance à l'augmentation de la capacité prolifération en hypoxie et une absence de modification de la distribution de CAV1 (***Figure 35***). Cependant, l'absence de quantification de la densité cavéolaires en absence de *Cav1*, ne nous permettent pas de suggérer un lien entre la réponse à l'hypoxie et les cavéoles durant le

développement embryonnaire et laissent à penser que l'hypoxie ne constitue pas un stimulus adéquat pour moduler la densité des cavéoles à E11.5.

II.3 Implications des cavéoles dans l'adaptation des cellules du NP à l'osmolarité du microenvironnement

Le NP est considéré comme un tissu hyper-osmotique, avec une osmolarité variable selon le rythme circadien, de 430 à 550 mOsm/L, en raison des différentes forces mécaniques appliquées (Ishihara et al. 1997). Une étude *in vitro* montre que la culture de cellules de NP humains en milieu hypo-osmolaire (300mOSm/L) entraîne une diminution de l'expression de marqueurs phénotypiques tels ACAN et COL2A, au profit d'une augmentation de l'expression de COL1A (Wuertz et al. 2007). Il peut exister un biais à notre étude du fait que le milieu de culture utilisé présente une osmolarité de 320mOsm/L, pouvant déjà créer une condition d'hypo-osmolarité pour les cellules du NP. Des tests de tolérance à l'osmolarité révèlent une viabilité des cellules du NP maintenue de 300 à 600 mOsm/L (Mavrogonatou and Kletsas 2009). Malgré l'absence de donnée sur la viabilité des cellules de NP dans un milieu à 150mOsm/L, nous avons choisi de tester cette osmolarité afin de potentialiser l'effet attendu d'une perturbation de la distribution de CAV1. Le maintien des marqueurs phénotypiques SOX9 et T ainsi que l'absence d'augmentation du niveau d'apoptose des cellules de NP (détection de la CASPASE3 ; données non illustrées) dans un milieu à 150mOsm/L suggèrent que les cellules sont viables et que l'identité des cellules du NP est maintenue. La littérature montre qu'une culture *ex-vivo* de DIV porcins pendant 7 jours dans un milieu hypo-osmolaire (330mOsm/L) entraine une diminution de l'expression de SOX9 en comparaison à la culture en milieu iso-osmolaire (430mOsm/L) (Li et al. 2016). Malgré une détection de ce marqueur en IF, une analyse de l'expression protéique de SOX9 pourrait donc être intéressante afin de valider nos résultats. Nos résultats montrent également que l'application d'un choc hypo-osmotique pendant 48h sur des explants de NP à P4 conduirait à une augmentation de la taille des vacuoles, et une augmentation du signal de AQP3 pouvant traduire alors d'un passage plus important de solutés et d'un gonflement des cellules (***Figure 42***).

L'application d'un choc hypo-osmotique (150mOsm/L) sur les cellules HeLa entraîne un désassemblage des cavéoles membranaires et une diminution de leur densité d'environ 30% (Sinha et al. 2011). De plus, ce choc conduit à une perte d'interaction CAV1/CAVINE1 et une augmentation de la dispersion de CAV1 en dehors de la cavéole (Sinha et al. 2011; Tachikawa

et al. 2017). Nos résultats montrent une perturbation de la distribution membranaire de CAV1 et une tendance à la diminution de la capacité prolifératives des cellules du NP. L'importante variabilité des niveaux d'expression des protéines cavéolaires détectées en western blot et le faible nombre d'expérimentations réalisées ne nous permettent pas d'avancer des résultats fiables (données non illustrées). Ces données, complétées avec une analyse en MET de la densité et de la morphologie des cavéoles, permettraient d'étudier dans son ensemble la modulation des fonctions cavéolaires au sein des cellules du NP en réponse à un changement de l'osmolarité du microenvironnement.

Pour l'élongation de la notochorde le long de l'axe rostro-caudal, il est montré chez le poisson-zèbre que les CNTs exercent une force contre la gaine péri-notochordale, faisant de la notochorde un tissu hyper-osmotique (Adams et al. 1990; (Ellis et al. 2013). De plus, la délétion de *Nfat5/TonEBP* (facteur de transcription osmo-adaptatif) chez la souris entraine un retard du développement de la colonne vertébrale, un aspect réduit du NP et une diminution de l'expression de T et COL2A (Tessier et al. 2020). De plus, une perturbation de l'activité de la voie de signalisation Shh est observée avec une augmentation de l'expression de GLI1 au sein de la notochorde à E12.5. Nos résultats préliminaires montrent que l'application d'un choc hypo-osmolaire de 48h sur des explants de cellules de notochorde à E11.5 n'entraine pas de modification du phénotype et de la capacité prolifératives (***Figure 43***). De plus, nos analyses ne permettent pas de visualiser un éventuel effet sur la détection de GLI1. Une analyse de la densité cavéolaire serait nécessaire afin de déterminer si l'osmolarité constitue un stimulus adéquat pour moduler la fonction des cavéoles au sein des CNTs embryonnaires, malgré la présence de vacuoles.

II.4 Effet d'une modulation de l'activité de la voie de signalisation Shh sur la distribution de CAV1 ?

Nous avons souhaité activer (SAG) et inhiber (cyclopamine) *in vitro* la voie de signalisation Shh et étudier l'effet de cette modulation sur la capacité prolifératives des cellules de notochorde et de NP et vérifier la distribution de CAV1 dans ces conditions expérimentales. Dans la littérature, une application *in vitro* de cyclopamine (250 µM) durant 2 à 5 jours sur des DIV murins entraine une diminution de la détection nucléaire de GLI1 et une diminution de la prolifération des cellules du NP (Dahia et al. 2012). L'application de SAG à 100nM et 500nM sur des cellules de NP de rat entraîne une augmentation du niveau d'ARNm de GLI1 (mais pas

de manière dose-dépendante) (Tessier et al. 2020). Ces données valident donc la modulation de l'activité de Shh par ces deux drogues.

Nos tests d'étude de l'impact de la modulation de la voie de signalisation Shh ne montrent pas de différence majeure dans la distribution de CAV1 et la capacité prolifératives des cellules de notochorde et de NP (***Figures 44-47***). De plus, les difficultés d'obtention d'un marquage de qualité de la protéine GLI1 dans les différentes conditions expérimentales ne nous permettent pas de vérifier l'effet des drogues et donc de valider la modulation de l'activité de la voie Shh. D'importantes variabilités de réponse cellulaire à l'application des agents pharmacologiques sont également observées, rendant nos conclusions difficiles pour certaines conditions.

Notre matériel d'étude étant restreint, nous avons choisi de tester seulement quelques concentrations de cyclopamine et de SAG. La réalisation d'une gamme de concentrations serait nécessaire afin de déterminer la concentration permettant une modulation optimale de l'activité Shh, sans toxicité pour les cellules. Nos essais de détermination du niveau d'expression des protéines cavéolaires et de GLI1 et PTCH 1 en western blot montrent une forte variabilité des résultats en n'ont pas mis en évidence de modification du niveau d'expression de GLI1 (données non illustrées). Ces données ne nous permettent donc pas de valider l'activation ou l'inhibition de l'activité de la voie Shh au sein des explants de cellules de NP.

Pour répondre à l'ensemble des questions encore en suspens sur le rôle des cavéoles dans le développement embryonnaire et les mécanismes moléculaires de la modulation de la capacité proliférative et de l'activité de la voie Shh par CAV1, il serait bien évidemment nécessaire de réaliser une culture *in vitro* d'explants de cellules de NP *Cav1*$^{+/+}$ et *Cav1*$^{-/-}$. Une comparaison de la réponse des cellules du NP aux différents stimuli (hypoxie, choc osmotique), en présence ou absence de cavéole pourra être réalisée. Malgré le modèle de souris invalidées pour *Cav1* à notre disposition, je n'ai pas pu réaliser cette étude durant ma thèse. En effet, les souris *Cav1*$^{-/-}$ présentent une hypofertilité, ce qui ne nous a pas permis de récolter le matériel biologique suffisant pour les études *in vivo* et *in vitro*.

A

	E11,5	E12,5	E13,5	E14,5	E17,5	P4	P21 1 month	3 months
CAVEOLIN1	No expression	NTCs membranes			NP cells membrane			
CAVIN1	No expression	No expression	NTCs membranes Sclerotomal cells membrane (pAF)		NP cells membrane AF cells nucleus		ND	ND
CAVEOLIN2	ND	ND	ND	NTCs membrane	ND	NP cells membrane	ND	ND
EHD2	No expression	NTCs membranes Sclerotomal cells membranes (pAF)			NP cells membrane		ND	ND

B

	E14.5	E17,5	P4	P21	1 month	3 months
Cav1 +/+						
CAVEOLIN1	NTCs membranes		NP cells membrane			ND
CAVIN1	NTCs membrane	ND	NP cells membrane	ND	ND	ND
	Sclerotomal cells membrane (pAF)	ND	AF cells nucleus			
CAVEOLIN2	NTCs membrane	ND	NP cells membrane	ND	ND	ND
EHD2	NTCs membrane	ND	NP cells membrane	ND	ND	ND
	Sclerotomal cells membrane (pAF)	ND				
Caveolae density	+	ND	+ +	ND	+++	+
Caveolae neck/depth ratio	>0,4	ND	>0,6	ND	>0,5	>0,5
Prolifération capacity	Yes No quantification	Yes +++++	Yes ++++	Yes +	NO	ND
PTCH 1 luminance	Yes No quantification	Yes +++++	Yes ++++	Yes +++	Yes ++	ND
Cav1 -/-						
CAVEOLIN1	No expression					
CAVIN1	Decreased expression at NTCs membranes	ND	Decreased at NP cells membranes	ND	ND	ND
CAVEOLIN2	Decreased expression, Golgi apparatus localisation	ND	Decreased expression, Golgi apparatus localisation	ND	ND	ND
EHD2	Decreased expression at NTCs membranes	ND	Decreased at NP cells membranes	ND	ND	ND
Caveolae density	0	ND	0	ND	0	ND
Prolifération capacity	Yes No quantification	Yes +++++	Yes ++++++	Yes +++	Yes +	ND
PTCH 1 luminance	Yes No quantification	Yes +++++	Yes ++++++	Yes ++++	Yes +++	ND

Figure 50: *Tableaux récapitulatifs de l'expression des protéines cavéolaires et de la densité et morphologie des cavéoles, du développement embryonnaire du DIV à la croissance post-natale et la maturation. (A) Expression et localisation subcellulaire des protéines cavéolaires CAVEOLINE1, CAVINE1, CAVEOLINE2 et EHD2 du jour 11.5 de développement embryonnaire (E11.5) à 3 mois après la naissance. ND : résultat non défini. (B) Comparaison de l'expression et localisation subcellulaire des protéines cavéolaires, ainsi que de la densité cavéolaire, la capacité proliférative des cellules et la luminance de PTCH 1 détectées sur des coupes histologiques d'embryons et de rachis de souris Cav1+/+ et Cav1-/-. La morphologie des cavéoles est décrite uniquement pour les individus Cav1$^{+/+}$, car les souris Cav1$^{-/-}$ présentent une absence de formation de cavéoles.*

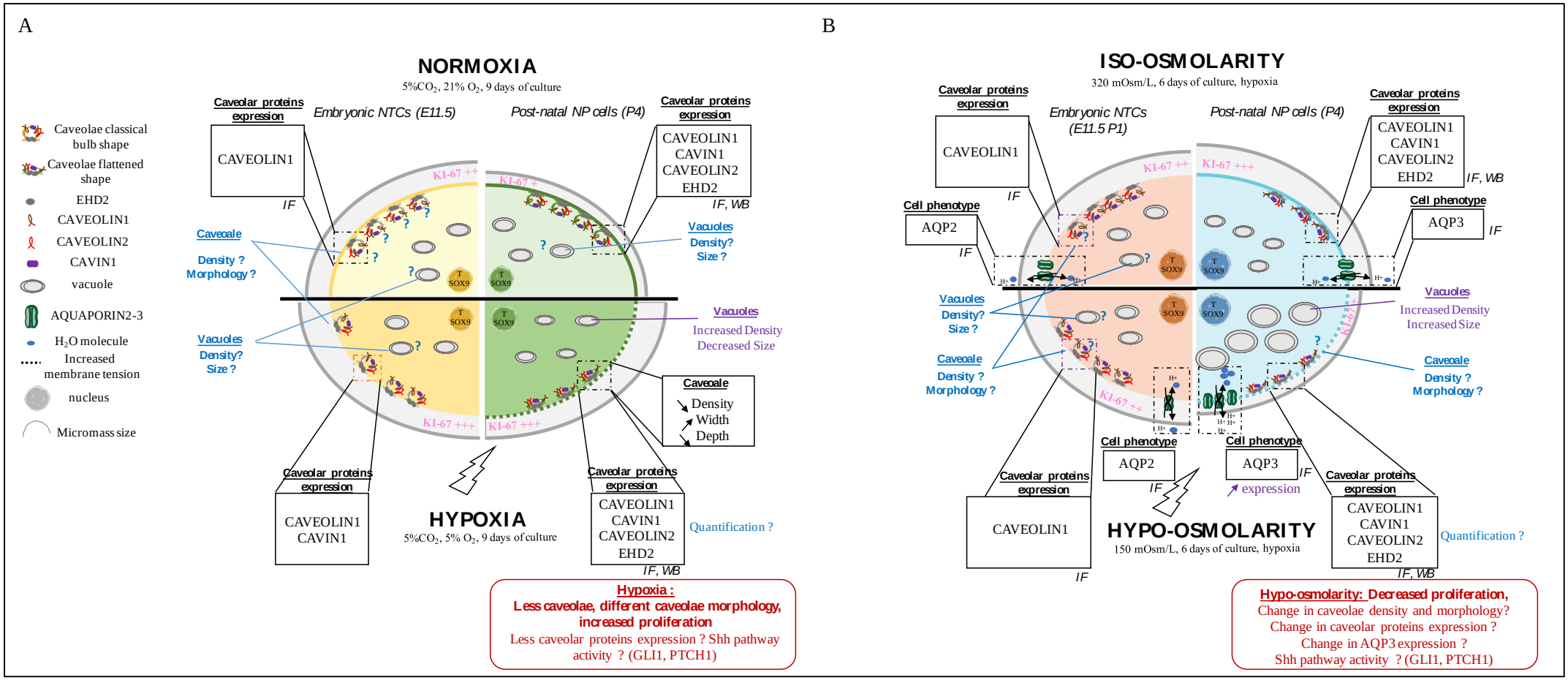


Figure 51: *Représentation schématique de l'étude in vitro de l'impact de (A) l'hypoxie et de (B) l'impact d'un choc osmotique sur les explants de cellules de notochorde à E11.5 (jour embryonnaire 11.5), E11.5 P1 (après passage) et de NP à P4 (quatre jours après la naissance). Les cadres noirs indiquent les résultats validés par notre étude, les parties violettes indiquent les résultats préliminaires qui sont à confirmer et les parties bleues correspondent aux résultats qui sont à obtenir. IF : immunofluorescence, WB : western blot, AQP2-3 : AQUAPORIN 2-3.*

CHAPITRE V- CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La compréhension des mécanismes régissant la formation du NP durant le développement embryonnaire et la détermination du phénotype des cellules notochordales dans un DIV en croissance constitue une nouvelle voie de recherche pour l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'augmentation des connaissances sur la formation et la croissance du DIV permettrait en effet de détecter de nouvelles cibles (voies de signalisation, protéines, facteurs ou enzymes) pour les stratégies de thérapie moléculaire et cellulaire qui permettent ainsi l'apport/la supplémentation ou l'inhibition de ces cibles, afin de contrecarrer le processus de dégénérescence ou de favoriser la régénération du tissu discal. Bien que la littérature souligne l'utilisation des cellules notochordales grâce à leur rôle de régulateur de l'homéostasie discale, le type cellulaire le plus adéquat (cellules notochordales embryonnaires ou matures) pouvant être injecté dans le DIV dans ces stratégies de médecine régénératrices n'est encore pas totalement déterminé. Ainsi, tout apport de connaissance sur l'identité (marqueurs biologiques), la morphologie, la physiologie et la fonction des cellules notochordales pourrait contribuer à la proposition de nouvelles pistes thérapeutiques intéressantes. La disparition de ces cellules limitant les capacités d'auto-renouvèlement et d'autoréparation du tissu discal, la compréhension de la capacité prolifératives des cellules notochordales permettrait une modulation de cette capacité au sein des cellules injectées dans le DIV dans le cadre des thérapies cellulaires. Notre modèle d'explants de cellules de NP murins a ainsi permis d'identifier différents stimuli (hypoxie, osmolarité) capables de moduler la prolifération des cellules notochordales et de challenger ces cellules. Enfin, ces travaux ouvrent également une piste de recherche intéressante dans le développement de stratégies de thérapies cellulaires basées sur la reprogrammation de cellules iPS en cellules de type notochordales. Ces cellules seraient alors injectées au sein du DIV partiellement dégénéré, afin d'apporter la population de cellules natives du NP et ainsi recréer un dialogue avec les NPcytes encore résidants. A l'heure actuelle, de nombreuses études visent à mettre au point un protocole robuste de différenciation. Des travaux dirigés par le Dr Anne Camus ont récemment permis de mettre en évidence l'importance de la transfection de l'ARNm du facteur de transcription *Noto* pour la différenciation des iPS en cellules de type notochordales (Colombier et al. 2020). De manière intéressante, une étude récente montre que des cellules iPS différenciées en cellules de type cellules de NP présentent après 20 jours de culture un phénotype proche de celui des cellules NP humains d'adolescents, avec notamment une

augmentation de l'expression de CAV1 en comparaison aux iPS non différenciées, suggérant que CAV1 peut constituer un marqueur phénotypique des cellules du NP (Zhang et al. 2020).

L'étude de la fonction des cavéoles/cavéoline1 dans le développement embryonnaire du DIV, suggère que la transformation la notochorde-NP ne serait pas entièrement expliquée par l'hypothèse de l'application de forces mécaniques par les futures vertèbres contraignant les CNTs à s'accumuler dans la région du futur NP. La perte des cavéoles (senseurs mécaniques importants) n'altérant pas la structure de la notochorde chez la souris, cela suggère l'implication d'autres processus cellulaires ou l'existence de mécanismes de compensations (autophagie) ou la présence de phénotypes subtiles (densité et morphologie des vacuoles) qu'il serait intéressant d'étudier. Le rôle de CAV1 dans la modulation de la prolifération et de l'activité de la voie de signalisation Shh, permet ainsi d'apporter une nouvelle pierre à l'édifice de la compréhension des mécanismes biologiques régissant le développement et la croissance du DIV et permet l'identification de CAV1 comme potentielle cible thérapeutique. Les différents stimuli appliqués quotidiennement sur le DIV (l'hypoxie, les contraintes mécaniques) favorisent l'apparition de la dégénérescence discale. La littérature montre également que l'application de contraintes de cisaillement conduit à la diminution de la densité cavéolaire à la membrane de cellules Hela (Sinha et al. 2011) et que la réponse à ces contraintes pourrait se faire *via* un lien direct entre les cavéoles et la voie de signalisation Hippo YAP/TAZ (Rausch et al. 2019). Ces données sont intéressantes dans la perspective de médecine régénératrice du DIV combinant la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse qu'une encapsulation des cellules notochordales au sein d'un hydrogel dont la rigidité et la teneur en oxygène pourrait être maitrisée et modulée permettrait de favoriser la prolifération des cellules notochordales, *via* une possible modulation de la densité et la morphologie des cavéoles. Cependant pour ce faire, la fonction des cavéoles/cavéoline1 à tous les stades de développement, de croissance et de maturation du disque doit être définie ainsi que l'environnement favorable pour la prolifération (densité des cavéoles et expression de CAV1). La littérature montre un rôle de *Cav1* à la fois de pro-oncogène et d'anti-oncogène selon le stade de progression et le type de cancers (Raudenska et al. 2020) et nos résultats suggèrent également une fonction différente des cavéoles/cavéoline1 dans le temps. De plus des études montrent une forte expression de CAV1 dans des NP murins et humains juvéniles mais mettent également en évidence une

augmentation de l'expression de CAV1 sein de DIV humains dégénérés en comparaison aux DIV sains, associée à l'augmentation de p16, marqueur de la sénéscence (Bach et al. 2016 ; Smolders et al. 2013 ; Zhang et al. 2020). La perspective d'une injection de cellules dans lesquelles l'action de *Cav1* serait totalement inhibée n'est pas envisageable au vue de l'apparition précoce de la dégénérescence observée dès 1,5 mois en absence de *Cav1* dans le modèle murin. Une thérapie suractivant *Cav1* pourrait entrainer une augmentation de la densité des cavéoles et ainsi modifier la réponse aux stress cellulaires, ce qui pourrait protéger les cellules du NP. En revanche, cela pourrait également conduire à une réduction de la capacité proliférative des cellules, constituant un frein à la régénération du disque. Ainsi, une stratégie d'injection de cellules exprimant *Cav1* encapsulées dans un hydrogel exerçant une contrainte mécanique appropriée, permettrait dans un premier temps de diminuer la densité des cavéoles et favoriser la prolifération de cellules du NP. Dans un deuxième temps, une fois l'hydrogel dégradé et le NP repeuplé, il serait envisageable de supplémenter le NP en *Cav1* (injection de mIARN ou microvésicules) afin de protéger les cellules précédemment injectées. Ces cellules iPS différenciées en cellules de type notochordales ou de NP constituerait un matériel biologique quantitativement plus important, qui permettrait ainsi de réduire l'utilisation des animaux et permettre la réalisation de nouvelles analyses (RT-qPCR, western blot, single cell RNAseq) dans le but de poursuivre l'étude du rôle des cavéoles/cavéolines dans le développement et la croissance du DIV.

Pour conclure, cette étude contribue à une meilleure compréhension des cellules notochordales et des mécanismes biologiques régissant le développement et la croissance du DIV, qui constitue une étape nécessaire pour l'établissement de stratégies de régénérescence du DIV. La littérature a démontré une dégénérescence précoce du NP murin en absence de *Cav1*, suggérant un rôle de *Cav1* dans la protection des cellules notochordes devant être étudié à des stades plus précoces de développement ou de croissance (Bach et al. 2016). Cette question a été abordée durant ma thèse, et malgré l'absence de phénotype visible durant le développement embryonnaire du DIV en absence de *Cav1*, cette étude doit être poursuivie, notamment pour la détermination des mécanismes de compensation ou des phénotypes non visibles existant. L'utilisation de note modèle d'explants de cellules de notochorde embryonnaire et de NP pourrait ainsi permettre la mise en évidence de ces mécanismes non identifiés par une étude *in vivo*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelkhalek, Hanaa Ben, Anja Beckers, Karin Schuster-Gossler, Maria N. Pavlova, Hannelore Burkhardt, Heiko Lickert, Janet Rossant, et al. 2004. “The Mouse Homeobox Gene Not Is Required for Caudal Notochord Development and Affected by the Truncate Mutation.” *Genes and Development* 18 (14): 1725–36. https://doi.org/10.1101/gad.303504.

Aboulaich, Nabila, Julia P. Vainonen, Peter Strålfors, and Alexander V. Vener. 2004. “Vectorial Proteomics Reveal Targeting, Phosphorylation and Specific Fragmentation of Polymerase I and Transcript Release Factor (PTRF) at the Surface of Caveolae in Human Adipocytes.” *Biochemical Journal* 383 (2): 237–48. https://doi.org/10.1042/BJ20040647.

Adams, D. S., R. Keller, and M. A.R. Koehl. 1990. “The Mechanics of Notochord Elongation, Straightening and Stiffening in the Embryo of Xenopus Laevis.” *Development* 110 (1): 115–30. https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00688.x.

Adams, Michael A., Polly Lama, Uruj Zehra, and Patricia Dolan. 2015. “Why Do Some Intervertebral Discs Degenerate, When Others (in the Same Spine) Do Not?” *Clinical Anatomy* 28 (2): 195–204. https://doi.org/10.1002/ca.22404.

Agarwal, Anil K., Elif Arioglu, Salome de Almeida, Nurullah Akkoc, Simeon I. Taylor, Anne M. Bowcock, Robert I. Barnes, and Abhimanyu Garg. 2002. “AGPAT2 Is Mutated in Congenital Generalized Lipodystrophy Linked to Chromosome 9q34.” *Nature Genetics* 31 (1): 21–23. https://doi.org/10.1038/ng880.

Aguiar, Dean J., Sandra L. Johnson, and Theodore R. Oegema. 1999. “Notochordal Cells Interact with Nucleus Pulposus Cells: Regulation of Proteoglycan Synthesis.” *Experimental Cell Research* 246 (1): 129–37. https://doi.org/10.1006/excr.1998.4287.

Aigner, T., K. R. Greskötter, J. C.T. Fairbank, K. Von Der Mark, and J. P.G. Urban. 1998. “Variation with Age in the Pattern of Type X Collagen Expression in Normal and Scoliotic Human Intervertebral Discs.” *Calcified Tissue International* 63 (3): 263–68. https://doi.org/10.1007/s002239900524.

Ain, David L., David P. Slovut, Ravi Kamath, and Michael R. Jaff. 2012. “The Association between Peripheral Artery and Lumbar Spine Disease: A Single-Center Study.” *American Journal of Medicine* 125 (4): 411–15. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.09.008.

Albert Pol, †, and and Robert G. Parton* Sally Martin,* Manuel A. Ferna´ndez,† Mercedes Ingelmo-Torres,† Charles Ferguson,* Carlos Enrich. 2005. “Cholesterol and Fatty Acids Regulate Dynamic Caveolin Trafficking through the Golgi Complex and between the Cell Surface and Lipid Bodies□.” *Molecular Biology of the Cell* 16 (1): 2091–2105. https://doi.org/10.1091/mbc.E04.

An, Howard S., Koichi Masuda, and Nozomu Inoue. 2006. “Intervertebral Disc Degeneration: Biological and Biomechanical Factors.” *Journal of Orthopaedic Science* 11 (5): 541–52. https://doi.org/10.1007/s00776-006-1055-4.

Andersson, Gunnar B J. 1999. “Epidemiological Features of Chronic Low-Back Pain.” *The Lancet* 354 (9178): 581–85. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01312-4.

Ando, Takashi, Kei Semba, Hiroko Suda, Akira Sei, Hiroshi Mizuta, Masatake Araki, Kuniya Abe, et al. 2011. “The Floor Plate Is Sufficient for Development of the Sclerotome and Spine without the Notochord.” *Mechanisms of Development* 128 (1–2): 129–40. https://doi.org/10.1016/j.mod.2010.11.005.

Andrea Vortkamp,* Kaechoong Lee, Beate Lanske, and Clifford J. Tabint Gino V. Segre, Henry M. Kronenberg. 1996. “Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and Elat Elated Protein” 273 (August).

Andreu-Cervera, Abraham, Isabelle Anselme, Alice Karam, Martin Catala, and Sylvie Schneider-Maunoury. 2018. “The Ciliopathy Gene FTM/Rpgrip1l Controls Mouse Forebrain Patterning via

Region-Specific Modulation of Hedgehog/Gli Signaling." *BioRxiv* 39 (13): 2398–2415. https://doi.org/10.1101/408120.

Andreu-Cervera, Abraham, Martin Catala, and Sylvie Schneider-Maunoury. 2021. "Cilia, Ciliopathies and Hedgehog-Related Forebrain Developmental Disorders." *Neurobiology of Disease* 150: 105236. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105236.

Ang, Siew Lan, and Janet Rossant. 1994. "HNF-3β Is Essential for Node and Notochord Formation in Mouse Development." *Cell* 78 (4): 561–74. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90522-3.

Antoniou, John, Nora M. Goudsouzian, Terrence F. Heathfield, Neil Winterbottom, Thomas Steffen, A. Robin Poole, Max Aebi, and Mauro Alini. 1996. "The Human Lumbar Endplate: Evidence of Changes in Biosynthesis and Denaturation of the Extracellular Matrix with Growth, Maturation, Aging, and Degeneration." *Spine* 21 (10): 1153–61. https://doi.org/10.1097/00007632-199605150-00006.

Arai, Fumio, Atsushi Hirao, Masako Ohmura, Hidetaka Sato, Sahoko Matsuoka, Keiyo Takubo, Keisuke Ito, Gou Young Koh, and Toshio Suda. 2004. "Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche." *Cell* 118 (2): 149–61. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.004.

Ariotti, Nicholas, Manuel A. Fernández-Rojo, Yong Zhou, Michelle M. Hill, Travis L. Rodkey, Kerry L. Inder, Lukas B. Tanner, Markus R. Wenk, John F. Hancock, and Robert G. Parton. 2014. "Caveolae Regulate the Nanoscale Organization of the Plasma Membrane to Remotely Control Ras Signaling." *Journal of Cell Biology* 204 (5): 777–92. https://doi.org/10.1083/jcb.201307055.

Arndt, Joseph, Yann Philippe Charles, Christelle Koebel, Ioan Bogorin, and Jean Paul Steib. 2012. "Bacteriology of Degenerated Lumbar Intervertebral Disks." *Journal of Spinal Disorders and Techniques* 25 (7): 211–16. https://doi.org/10.1097/BSD.0b013e318269851a.

Ashraf, Sajjad, Kenny Chatoor, Jasmine Chong, Robert Pilliar, Paul Santerre, and Rita Kandel. 2020. "Transforming Growth Factor β Enhances Tissue Formation by Passaged Nucleus Pulposus Cells In Vitro." *Journal of Orthopaedic Research* 38 (2): 438–49. https://doi.org/10.1002/jor.24476.

Aszódi, Attila, Danny Chan, Ernst Hunziker, John F. Bateman, and Reinhard Fässler. 1998. "Collagen II Is Essential for the Removal of the Notochord and the Formation of Intervertebral Discs." *Journal of Cell Biology* 143 (5): 1399–1412. https://doi.org/10.1083/jcb.143.5.1399.

Bach, F. C., S. A.H. de Vries, F. M. Riemers, J. Boere, F. W.M. van Heel, M. van Doeselaar, S. S. Goerdayal, et al. 2016a. "Soluble and Pelletable Factors in Porcine, Canine and Human Notochordal Cell-Conditioned Medium: Implications for IVD Regeneration." *European Cells and Materials* 32: 163–80. https://doi.org/10.22203/eCM.v032a11.

Bach, Frances C., Ying Zhang, Alberto Miranda-Bedate, Lucy C. Verdonschot, Niklas Bergknut, Laura B. Creemers, Keita Ito, et al. 2016b. "Increased Caveolin-1 in Intervertebral Disc Degeneration Facilitates Repair." *Arthritis Research and Therapy* 18 (1): 1–15. https://doi.org/10.1186/S13075-016-0960-Y.

Baffi, Michael O., Erin Slattery, Philip Sohn, Harold L. Moses, Anna Chytil, and Rosa Serra. 2004. "Conditional Deletion of the TGF-β 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." *Developmental Biology* 276 (1): 124–42. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.027.

Bai, Lin, Xiaoli Deng, Juanjuan Li, Miao Wang, Qian Li, Wei An, Deli A, and Yu Sheng Cong. 2011. "Regulation of Cellular Senescence by the Essential Caveolar Component PTRF/Cavin-1." *Cell Research* 21 (7): 1088–1101. https://doi.org/10.1038/cr.2011.56.

Bai, Xiangli, Xiong Jia, Yajing Lu, Lin Zhu, Ying Zhao, Wenzhuo Cheng, Meng Shu, and Si Jin. 2020. "Salidroside-Mediated Autophagic Targeting of Active Src and Caveolin-1 Suppresses Low-Density Lipoprotein Transcytosis across Endothelial Cells." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020 (Ldl). https://doi.org/10.1155/2020/9595036.

Balaskas, Nikolaos, Ana Ribeiro, Jasmina Panovska, Eric Dessaud, Noriaki Sasai, Karen M. Page, James Briscoe, and Vanessa Ribes. 2012. "Gene Regulatory Logic for Reading the Sonic Hedgehog Signaling Gradient in the Vertebrate Neural Tube." *Cell* 148 (1–2): 273–84. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.047.

Barrionuevo, Francisco, Stefan Bagheri-Fam, Jürgen Klattig, Ralf Kist, Makoto M. Taketo, Christoph Englert, and Gerd Scherer. 2006. "Homozygous Inactivation of Sox9 Causes Complete XY Sex Reversal in Mice." *Biology of Reproduction* 74 (1): 195–201. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045930.

Bastiani, Michele, Libin Liu, Michelle M. Hill, Mark P. Jedrychowski, Susan J. Nixon, Harriet P. Lo, Daniel Abankwa, et al. 2009. "MURC/Cavin-4 and Cavin Family Members Form Tissue-Specific Caveolar Complexes." *Journal of Cell Biology* 185 (7): 1259–73. https://doi.org/10.1083/jcb.200903053.

Bauer, Philip M, Jun Yu, Yan Chen, Reed Hickey, Pascal N Bernatchez, Robin Looft-Wilson, Yan Huang, Frank Giordano, Radu V Stan, and William C Sessa. 2005. "Endothelial-Specific Expression of Caveolin-1 Impairs Microvascular Permeability and Angiogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (1): 204–9. https://doi.org/10.1073/pnas.0406092102.

Bedore, Jake, Wei Sha, Matthew R. McCann, Shangxi Liu, Andrew Leask, and Cheryle A. Séguin. 2013. "Impaired Intervertebral Disc Development and Premature Disc Degeneration in Mice with Notochord-Specific Deletion of CCN2." *Arthritis and Rheumatism* 65 (10): 2634–44. https://doi.org/10.1002/art.38075.

Bendayan, Moïse, and Eugenio A. Rasio. 1996. "Transport of Insulin and Albumin by the Microvascular Endothelium of the Rete Mirabile." *Journal of Cell Science* 109 (7): 1857–64.

Bernick, S, and R Cailliet. 1982. "Bernick_1982_Vertebral End-Plate Changes with Aging_Spine.Pdf." *Spine*.

Besse, Laurianne, Mariame Neti, Isabelle Anselme, Christoph Gerhardt, Ulrich Rüther, Christine Laclef, and Sylvie Schneider-Maunoury. 2011. "Primary Cilia Control Telencephalic Patterning and Morphogenesis via Gli3 Proteolytic Processing." *Development* 138 (10): 2079–88. https://doi.org/10.1242/dev.059808.

Bian, Qin, Lei Ma, Amit Jain, Janet L. Crane, Khaled Kebaish, Mei Wan, Zhengdong Zhang, et al. 2017. "Mechanosignaling Activation of TGFβ Maintains Intervertebral Disc Homeostasis." *Bone Research* 5 (January): 1–14. https://doi.org/10.1038/boneres.2017.8.

Binch, Abbie L.A., Joan C. Fitzgerald, Emily A. Growney, and Frank Barry. 2021. "Cell-Based Strategies for IVD Repair: Clinical Progress and Translational Obstacles." *Nature Reviews Rheumatology* 17 (3): 158–75. https://doi.org/10.1038/s41584-020-00568-w.

Bishop, Paul B., and Richard H. Pearce. 1993. "The Proteoglycans of the Cartilaginous End-plate of the Human Intervertebral Disc Change after Maturity." *Journal of Orthopaedic Research* 11 (3): 324–31. https://doi.org/10.1002/jor.1100110303.

Bitgood, Mark J., Liya Shen, and Andrew P. McMahon. 1996. "Sertoli Cell Signaling by Desert Hedgehog Regulates the Male Germline." *Current Biology* 6 (3): 298–304. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00480-3.

Blouin, Cédric M., Soazig Le Lay, Françoise Lasnier, Isabelle Dugail, and Eric Hajduch. 2008. “Regulated Association of Caveolins to Lipid Droplets during Differentiation of 3T3-L1 Adipocytes.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376 (2): 331–35. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.154.

Bonilla, E., K. Fischbeck, and D. L. Schotland. 1981. “Freeze-Fracture Studies of Muscle Caveolae in Human Muscular Dystrophy.” *American Journal of Pathology* 104 (2): 167–73.

Borenstein, David. 2013. “Mechanical Low Back Pain - A Rheumatologist’s View.” *Nature Reviews Rheumatology* 9 (11): 643–53. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.133.

Borycki, Anne-gaelle, Lori Mendham, and Charles P Emerson. 1998. “Control of Somite Patterning by Sonic Hedgehog and Its Downstream Signal Response Genes” 790: 777–90.

Boyd, Nolan L, Heonyong Park, Hong Yi, Yong Chool Boo, George P Sorescu, Michelle Sykes, and Hanjoong Jo. 2003. “Chronic Shear Induces Caveolae Formation and Alters ERK and Akt Responses in Endothelial Cells.” *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1113–H1122. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00302.2003.

Bron, Johannes Leendert, Marco N. Helder, Hans Jorg Meisel, Barend J. Van Royen, and Theodoor H. Smit. 2009. “Repair, Regenerative and Supportive Therapies of the Annulus Fibrosus: Achievements and Challenges.” *European Spine Journal* 18 (3): 301–13. https://doi.org/10.1007/s00586-008-0856-x.

Cai, Jingli, Ming Yang, Elizabeth Poremsky, Sarah Kidd, Jay S. Schneider, and Lorraine Iacovitti. 2010. “Dopaminergic Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Survive and Integrate into 6-OHDA-Lesioned Rats.” *Stem Cells and Development* 19 (7): 1017–23. https://doi.org/10.1089/scd.2009.0319.

Cairns, Dana M., Mie Elissa Sato, Philip G. Lee, Andrew B. Lassar, and Li Zeng. 2008. “A Gradient of Shh Establishes Mutually Repressing Somitic Cell Fates Induced by Nkx3.2 and Pax3.” *Developmental Biology* 323 (2): 152–65. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.08.024.

Cameron, Patricia L., Johnna W. Ruffin, Roni Bollag, Howard Rasmussen, and Richard S. Cameron. 1997. “Identification of Caveolin and Caveolin-Related Proteins in the Brain.” *Journal of Neuroscience* 17 (24): 9520–35. https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-24-09520.1997.

Che, Hui, Jie Li, You Li, Cheng Ma, Huan Liu, Jingyi Qin, Jianghui Dong, et al. 2020. “P16 Deficiency Attenuates Intervertebral Disc Degeneration by Adjusting Oxidative Stress and Nucleus Pulposus Cell Cycle.” *ELife* 9: 80–90. https://doi.org/10.7554/eLife.52570.

Chelberg, M., G. Banks, D. Geiger, and T. Oegema. 1995. “Identification of Hetereogeneous Cell Populations in Normal Human Intervertebral Disc.” *Journal of Anatomy* 186 (1): 43–43.

Cheng, Jade P.X., and Benjamin J. Nichols. 2016. “Caveolae: One Function or Many?” *Trends in Cell Biology* 26 (3): 177–89. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.010.

Chi-Chung Hui Diane Slusarski Kenneth A.Platt Robert Holmgren Alexandra L.Joyner. 1994. “Expression of Three Mouse Homologs of the Drosophila Segment Polarity Gene Cubitus Interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in Ectoderm- and Mesoderm-Derived Tissues Suggests Multiple Roles during Postimplantation Development.” *Developmental Biology* 162 (2): 402–13. https://doi.org/doi.org/10.1006/dbio.1994.1097.

Chiang, Chin, Ying Litingtung, Eric Lee, Keith E. Young, Jeffrey L. Corden, Heiner Westphal, and Philip A. Beachy. 1996. “Cyclopia and Defective Axial Patterning in Mice Lacking Sonic Hedgehog Gene Function.” *Nature*. https://doi.org/10.1038/383407a0.

Cho, Kyung A., and Sang Chul Park. 2005. “Caveolin-1 as a Prime Modulator of Aging: A New Modality for Phenotypic Restoration?” *Mechanisms of Ageing and Development* 126 (1): 105–10. https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.09.029.

Choi, Hyowon, Christophe Merceron, Laura Mangiavini, Erin L. Seifert, Ernestina Schipani, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2016. “Hypoxia Promotes Noncanonical Autophagy in Nucleus Pulposus Cells Independent of MTOR and HIF1A Signaling.” *Autophagy* 12 (9): 1631–46. https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1192753.

Choi, K.-S., and B. D. Harfe. 2011. “Hedgehog Signaling Is Required for Formation of the Notochord Sheath and Patterning of Nuclei Pulposi within the Intervertebral Discs.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (23): 9484–89. https://doi.org/10.1073/pnas.1007566108.

Choi, Kyung Suk, and Brian D Harfe. 2011. “Hedgehog Signaling Is Required for Formation of the Notochord Sheath and Patterning of Nuclei Pulposi within the Intervertebral Discs.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23): 9484–89. https://doi.org/10.1073/pnas.1007566108.

Choi, Kyung Suk, Chanmi Lee, and Brian D. Harfe. 2012. “Sonic Hedgehog in the Notochord Is Sufficient for Patterning of the Intervertebral Discs.” *Mechanisms of Development* 129 (9–12): 255–62. https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.07.003.

Christ, Bodo, and Jörg Wilting. 1992. “From Somites to Vertebral Column.” *Annals of Anatomy* 174 (1): 23–32. https://doi.org/10.1016/S0940-9602(11)80337-7.

Clouet, Johann, Marion Fusellier, Anne Camus, Catherine Le Visage, and Jérôme Guicheux. 2018. “Intervertebral Disc Regeneration: From Cell Therapy to the Development of Novel Bioinspired Endogenous Repair Strategies.” *Advanced Drug Delivery Reviews*. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.017.

Clouet, Johann, Gaël Grimandi, Marianne Pot-Vaucel, Martial Masson, Hakim B. Fellah, Lydie Guigand, Yan Cherel, et al. 2009. “Identification of Phenotypic Discriminating Markers for Intervertebral Disc Cells and Articular Chondrocytes.” *Rheumatology (Oxford, England)* 48 (11): 1447–50. https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep262.

Cohen, Alex W., Robert Hnasko, William Schubert, and Michael P. Lisanti. 2004. “Role of Caveolae and Caveolins in Health and Disease.” *Physiological Reviews* 84 (4): 1341–79. https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2003.

Cohen, Alex W., Babak Razani, Xiao Bo Wang, Terry P. Combs, Terence M. Williams, Philipp E. Scherer, and Michael P. Lisanti. 2003. “Caveolin-1-Deficient Mice Show Insulin Resistance and Defective Insulin Receptor Protein Expression in Adipose Tissue.” *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285 (1): C222–35. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00006.2003.

Cole, Tak Chun, Daniel Burkhardt, Linda Frost, and Peter Ghosh. 1985. “The Proteoglycans of the Canine Intervertebral Disc.” *BBA - General Subjects* 839 (2): 127–38. https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90029-7.

Colella, Fabio, João Pedro Garcia, Marco Sorbona, Andrea Lolli, Bernardo Antunes, Domenico D’Atri, Florian P.Y. Barré, et al. 2020. “Drug Delivery in Intervertebral Disc Degeneration and Osteoarthritis: Selecting the Optimal Platform for the Delivery of Disease-Modifying Agents.” *Journal of Controlled Release* 328 (May): 985–99. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.08.041.

Colombier, Pauline, Johann Clouet, Cécile Boyer, Maeva Ruel, Gaelle Bonin, Julie Lesoeur, Anne Moreau, et al. 2016. “TGF-B1 and GDF5 Act Synergistically to Drive the Differentiation of Human Adipose Stromal Cells toward Nucleus Pulposus -like Cells.” *Stem Cells* 34 (3): 653–67. https://doi.org/10.1002/stem.2249.

Colombier, Pauline, Johann Clouet, Olivier Hamel, Laurent Lescaudron, and Jérôme Guicheux. 2014. "The Lumbar Intervertebral Disc: From Embryonic Development to Degeneration." *Joint Bone Spine* 81 (2): 125–29. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.07.012.

Colombier, Pauline, Boris Halgand, Claire Ch, Caroline Chariau, Valentin François-campion, Nicolas Vedrenne, Johann Clouet, Laurent David, and Anne Camus. 2020. "NOTO Transcription Factor Directs Human InducedPluripotent Stem Cell-Derived MesendodermProgenitors to a Notochordal Fate." *Cellls*, no. Ddd.

Corallo, Diana, Valeria Trapani, and Paolo Bonaldo. 2015. "The Notochord: Structure and Functions." *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (16): 2989–3008. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1897-z.

Corbit, Kevin C, Pia Aanstad, Veena Singla, Andrew R Norman, Didier Y R Stainier, and Jeremy F Reiter. 2005. "Vertebrate Smoothened Functions at the Primary Cilium" 437 (October): 1018–21. https://doi.org/10.1038/nature04117.

Coric, Domagoj, Kenneth Pettine, Andrew Sumich, and Margaret O. Boltes. 2013. "Prospective Study of Disc Repair with Allogeneic Chondrocytes: Presented at the 2012 Joint Spine Section Meeting - Clinical Article." *Journal of Neurosurgery: Spine* 18 (1): 85–95. https://doi.org/10.3171/2012.10.SPINE12512.

Cornejo, M. C., S. K. Cho, C. Giannarelli, J. C. Iatridis, and D. Purmessur. 2015. "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 and Cartilage* 23 (3): 487–96. https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.12.010.

Cotten, A., M. Sakka, A. Drizenko, J. Clarisse, and J. P. Francke. 1994. "Antenatal Differentiation of the Human Intervertebral Disc." *Surgical and Radiologic Anatomy* 16 (1): 53–56. https://doi.org/10.1007/BF01627921.

Czarny, Malgorzata, Yaakov Lavie, Giusy Fiucci, and Mordechai Liscovitch. 1999. "Localization of Phospholipase D in Detergent-Insoluble, Caveolin-Rich Membrane Domains: Modulation by Caveolin-1 Expression and Caveolin." *Journal of Biological Chemistry* 274 (5): 2717–24. https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2717.

Dahia, Chitra Lekha, Eric J. Mahoney, Atiq A. Durrani, and Christopher Wylie. 2009a. "Intercellular Signaling Pathways Active during Intervertebral Disc Growth, Differentiation, and Aging." *Spine* 34 (5): 456–62. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181913e98.

Dahia, Chitra Lekha, Eric J. Mahoney, Atiq A. Durrani, and Christopher Wylie.. 2009b. "Postnatal Growth, Differentiation, and Aging of the Mouse Intervertebral Disc." *Spine* 34 (5): 447–55. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181990c64.

Dahia, Chitra Lekha, Eric Mahoney, and Christopher Wylie. 2012. "Shh Signaling from the Nucleus Pulposus Is Required for the Postnatal Growth and Differentiation of the Mouse Intervertebral Disc." *PLoS ONE* 7 (4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035944.

Dai, Sheng Ming, Zheng Zheng Shan, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko-Hongo, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, and Kazuo Yudoh. 2006. "Catabolic Stress Induces Features of Chondrocyte Senescence through Overexpression of Caveolin 1: Possible Involvement of Caveolin 1-Induced down-Regulation of Articular Chondrocytes in the Pathogenesis of Osteoarthritis." *Arthritis and Rheumatism* 54 (3): 818–31. https://doi.org/10.1002/art.21639.

Davidson, Bruce P., Simon J. Kinder, Kirsten Steiner, Gary C. Schoenwolf, and Patrick P.L. Tam. 1999. "Impact of Node Ablation on the Morphogenesis of the Body Axis and the Lateral Asymmetry of the Mouse Embryo during Early Organogenesis." *Developmental Biology* 211 (1): 11–26.

https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9276.

Delous, Marion, Lekbir Baala, Rémi Salomon, Christine Laclef, Jeanette Vierkotten, Kàlmàn Tory, Christelle Golzio, et al. 2007. “The Ciliary Gene RPGRIP1L Is Mutated in Cerebello-Oculo-Renal Syndrome (Joubert Syndrome Type B) and Meckel Syndrome.” *Nature Genetics* 39 (7): 875–81. https://doi.org/10.1038/ng2039.

Demissew Shenegelegn Mern, Anja Beierfuß, Claudius Thomé and Aldemar Andres Hegewald. 2012. “Enhancing Human Nucleus Pulposus Cells Forbiological Treatment Approaches of Degenerativeintervertebral Disc Diseases: A Systematic Review.” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 8: 925–36. https://doi.org/10.1002/term.

Deutsch, Urban, Gregory R. Dressler, and Peter Gruss. 1988. “Pax 1, a Member of a Paired Box Homologous Murine Gene Family, Is Expressed in Segmented Structures during Development.” *Cell* 53 (4): 617–25. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90577-6.

Deyo, Richard A., and Sohail K. Mirza. 2006. “Trends and Variations in the Use of Spine Surgery.” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 443: 139–46. https://doi.org/10.1097/01.blo.0000198726.62514.75.

Dietzen, D. J., W. R. Hastings, and D. M. Lublin. 1995. “Caveolin Is Palmitoylated on Multiple Cysteine Residues. Palmitoylation Is Not Necessary for Localization of Caveolin to Caveolae.” *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6838.

Ding, Lei, Qingmin Zeng, Jingping Wu, Defang Li, Houlei Wang, Wei Lu, Zengxin Jiang, and Guoxiong Xu. 2017. “Caveolin-1 Regulates Oxidative Stress-Induced Senescence in Nucleus Pulposus Cells Primarily via the P53/P21 Signaling Pathway in Vitro.” *Molecular Medicine Reports* 16 (6): 9521–27. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7789.

DiPaola, Christian P., James C. Farmer, Katia Manova, and Lee A. Niswander. 2005. “Molecular Signaling in Intervertebral Disk Development.” *Journal of Orthopaedic Research* 23 (5): 1112–19. https://doi.org/10.1016/j.orthres.2005.03.008.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, and E. M. Horwitz. 2006. “Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement.” *Cytotherapy* 8 (4): 315–17. https://doi.org/10.1080/14653240600855905.

Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, et al. 2001. “Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice.” *Science* 293 (5539): 2449–52. https://doi.org/10.1126/science.1062688.

Dudhia, J. 2005. “Aggrecan, Aging and Assembly in Articular Cartilage.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (19–20): 2241–56. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5217-x.

Dupont, Sirio, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giulitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, et al. 2011. “Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction.” *Nature* 474 (7350): 179–84. https://doi.org/10.1038/nature10137.

Elliott, Dawn M., Chandra S. Yerramalli, Jesse C. Beckstein, John I. Boxberger, Wade Johannessen, and Edward J. Vresilovic. 2008. “The Effect of Relative Needle Diameter in Puncture and Sham Injection Animal Models of Degeneration.” *Spine* 33 (6): 588–96. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318166e0a2.

Ellis, Kathryn, Jennifer Bagwell, and Michel Bagnat. 2013. “Notochord Vacuoles Are Lysosome-Related Organelles That Function in Axis and Spine Morphogenesis.” *Journal of Cell Biology* 200 (5): 667–79. https://doi.org/10.1083/jcb.201212095.

Ellis, Kathryn, Brenton D. Hoffman, and Michel Bagnat. 2013. “The Vacuole Within.” *BioArchitecture* 3 (3): 64–68. https://doi.org/10.4161/bioa.25503.

Elmasry, Shady, Shihab Asfour, Juan Pablo De Rivero Vaccari, and Francesco Travascio. 2015. “Effects of Tobacco Smoking on the Degeneration of the Intervertebral Disc: A Finite Element Study.” *PLoS ONE* 10 (8): 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136137.

Emery, A. E H. 1998. “Fortnightly Review: The Muscular Dystrophies.” *Bmj* 317 (7164): 991–95. https://doi.org/10.1136/bmj.317.7164.991.

Erwin, W. Mark. 2008. “The Notochord, Notochordal Cell and CTGF/CCN-2: Ongoing Activity from Development through Maturation.” *Journal of Cell Communication and Signaling* 2 (3–4): 59–65. https://doi.org/10.1007/s12079-008-0031-5.

Erwin, W. Mark, Keith Ashman, Paul O’Donnel, and Robert D. Inman. 2006. “Nucleus Pulposus Notochord Cells Secrete Connective Tissue Growth Factor and Up-Regulate Proteoglycan Expression by Intervertebral Disc Chondrocytes.” *Arthritis and Rheumatism* 54 (12): 3859–67. https://doi.org/10.1002/art.22258.

Erwin, W. Mark, Diana Islam, Eftekhar Eftekarpour, Robert D. Inman, Muhammad Zia Karim, and Michael G. Fehlings. 2013. “Intervertebral Disc-Derived Stem Cells: Implications for Regenerative Medicine and Neural Repair.” *Spine* 38 (3): 211–16. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318266a80d.

Fabrizio Russo, MD1, Luca Ambrosio, MD1, Kevin Ngo, MS2, Gianluca Vadalà, MD, PhD1, Vincenzo Denaro, MD1, Yong Fan, PhD3, Gwendolyn Sowa, MD, PhD4, James D. Kang, MD5, Nam Vo, PhD2. 2019. “The Role of Type I Diabetes in Intervertebral Disc Degeneration Fabrizio.” *Spine*, 1177–85. https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000003054.

Fan, Chen Ming, and Marc Tessier-Lavigne. 1994. “Patterning of Mammalian Somites by Surface Ectoderm and Notochord: Evidence for Sclerotome Induction by a Hedgehog Homolog.” *Cell* 79 (7): 1175–86. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90009-4.

Farhat, Nada, Nathalie Thorin-Trescases, Guillaume Voghel, Louis Villeneuve, Maya Mamarbachi, Louis P. Perrault, Michel Carrier, and Eric Thorin. 2008. “Stress-Induced Senescence Predominates in Endothelial Cells Isolated from Atherosclerotic Chronic Smokers.” *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 86 (11): 761–69. https://doi.org/10.1139/Y08-082.

Fecchi, Katia, Sara Travaglione, Francesca Spadaro, Adriano Quattrini, Isabella Parolini, Giovanni Piccaro, Carla Raggi, et al. 2012. “Human Melanoma Cells Express FGFR/Src/Rho Signaling That Entails an Adhesion-Independent Caveolin-1 Membrane Association.” *International Journal of Cancer* 130 (6): 1273–83. https://doi.org/10.1002/ijc.26092.

Feng, Chencheng, Huan Liu, Minghui Yang, Yang Zhang, Bo Huang, and Yue Zhou. 2016. “Disc Cell Senescence in Intervertebral Disc Degeneration: Causes and Molecular Pathways.” *Cell Cycle* 15 (13): 1674–84. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1152433.

Fielding, Phoebe E., and Christopher J. Fielding. 1996. “Intracellular Transport of Low Density Lipoprotein Derived Free Cholesterol Begins at Clathrin-Coated Pits and Terminates at Cell Surface Caveolae.” *Biochemistry* 35 (47): 14932–38. https://doi.org/10.1021/bi9613382.

Forsythe, J A, B H Jiang, N V Iyer, F Agani, S W Leung, R D Koos, and G L Semenza. 1996. “Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1.” *Molecular and Cellular Biology* 16 (9): 4604–13. https://doi.org/10.1128/mcb.16.9.4604.

Fort, Cécile, and Philippe Bastin. 2014. “Élongation De L’Axonème Et Dynamique Du Transport Intraflagellaire.” *Medecine/Sciences* 30 (11): 955–61. https://doi.org/10.1051/medsci/20143011008.

Foti, Michelangelo, Geneviève Porcheron, Margot Fournier, Christine Maeder, and Jean Louis Carpentier. 2007. “The Neck of Caveolae Is a Distinct Plasma Membrane Subdomain That Concentrates Insulin Receptors in 3T3-L1 Adipocytes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (4): 1242–47. https://doi.org/10.1073/pnas.0610523104.

Frank, Philippe G., Hyangkyu Lee, David S. Park, Narendra N. Tandon, Phillip E. Scherer, and Michael P. Lisanti. 2004. “Genetic Ablation of Caveolin-1 Confers Protection Against Atherosclerosis.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (1): 98–105. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000101182.89118.E5.

Frapin, Leslie, Johann Clouet, Vianney Delplace, Marion Fusellier, Jérôme Guicheux, and Catherine Le Visage. 2019. “Lessons Learned from Intervertebral Disc Pathophysiology to Guide Rational Design of Sequential Delivery Systems for Therapeutic Biological Factors.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 149–150: 49–71. https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.08.007.

Freemont, A. J. 2009. “The Cellular Pathobiology of the Degenerate Intervertebral Disc and Discogenic Back Pain.” *Rheumatology* 48 (1): 5–10. https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken396.

Friedenstein, A. J., I. I. Piatetzky-Shapiro, and K. V. Petrakova. 1966. “Osteogenesis in Transplants of Bone Marrow Cells.” *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 16 (3): 381–90.

Friedenstein, Alexander J., Ruben K. Chailakhyan, Nataly V. Latsinik, Andrey F. Panasyuk, and Iren V. Keiliss-Borok. 1974. “Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues.” *Transplantation*. https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001.

Fujimoto, Toyoshi, Hiroshi Kogo, Kimiko Ishiguro, Kumi Tauchi, and Ryuji Nomura. 2001. “Caveolin-2 Is Targeted to Lipid Droplets, a New ‘Membrane Domain’ in the Cell.” *Journal of Cell Biology* 152 (5): 1079–85. https://doi.org/10.1083/jcb.152.5.1079.

Galbiati, Ferruccio, Jeffrey A. Engelman, Daniela Volonte, Xiao Lan Zhang, Carlo Minetti, Maomi Li, Harry Hou, Burkhard Kneitz, Winfried Edelmann, and Michael P. Lisanti. 2001. “Caveolin-3 Null Mice Show a Loss of Caveolae, Changes in the Microdomain Distribution of the Dystrophin-Glycoprotein Complex, and T-Tubule Abnormalities.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (24): 21425–33. https://doi.org/10.1074/jbc.M100828200.

Gantenbein-Ritter, Benjamin, Lorin M. Benneker, Mauro Alini, and Sibylle Grad. 2011. “Differential Response of Human Bone Marrow Stromal Cells to Either TGF-B1 or RhGDF-5.” *European Spine Journal* 20 (6): 962–71. https://doi.org/10.1007/s00586-010-1619-z.

Gao, Runping, and David R. Brigstock. 2003. “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.” *Hepatology Research* 27 (3): 214–20. https://doi.org/10.1016/S1386-6346(03)00241-9.

Gao, Runping, and David R. Brigstock. 2004. “Connective Tissue Growth Factor (CCN2) Induces Adhesion of Rat Activated Hepatic Stellate Cells by Binding of Its C-Terminal Domain to Integrin Avβ3 and Heparan Sulfate Proteoglycan.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (10): 8848–55. https://doi.org/10.1074/jbc.M313204200.

García-Cardeña, Guillermo, Roger Fan, David F. Stern, Jianwei Liu, and William C. Sessa. 1996. “Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Regulated by Tyrosine Phosphorylation and Interacts with Caveolin-1.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (44): 27237–40. https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27237.

Garcia, Jamie, Jennifer Bagwell, Brian Njaine, James Norman, Daniel S. Levic, Susan Wopat, Sara E. Miller, et al. 2017. “Sheath Cell Invasion and Trans-Differentiation Repair Mechanical Damage

Caused by Loss of Caveolae in the Zebrafish Notochord." *Current Biology* 27 (13): 1982-1989.e3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.035.

Gerdes, Jantje M., Yangfan Liu, Norann A. Zaghloul, Carmen C. Leitch, Shaneka S. Lawson, Masaki Kato, Philip A. Beachy, et al. 2007. "Disruption of the Basal Body Compromises Proteasomal Function and Perturbs Intracellular Wnt Response." *Nature Genetics* 39 (11): 1350–60. https://doi.org/10.1038/ng.2007.12.

Ghitescu, L., A. Fixman, M. Simionescu, and N. Simionescu. 1986. "Specific Binding Sites for Albumin Restricted to Plasmalemmal Vesicles of Continuous Capillary Endothelium: Receptor-Mediated Transcytosis." *Journal of Cell Biology* 102 (4): 1304–11. https://doi.org/10.1083/jcb.102.4.1304.

Gkantiragas, I, B Brügger, E Stüven, D Kaloyanova, X Y Li, K Löhr, F Lottspeich, F T Wieland, and J B Helms. 2001. "Sphingomyelin-Enriched Microdomains at the Golgi Complex." *Molecular Biology of the Cell* 12 (6): 1819–33. https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1819.

Gluais, Maude, Johann Clouet, Marion Fusellier, Cyrille Decante, Constantin Moraru, Maeva Dutilleul, Joëlle Veziers, et al. 2019. "In Vitro and in Vivo Evaluation of an Electrospun-Aligned Microfibrous Implant for Annulus Fibrosus Repair." *Biomaterials* 205 (February): 81–93. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.010.

Glyn-Jones, S., A. J.R. Palmer, R. Agricola, A. J. Price, T. L. Vincent, H. Weinans, and A. J. Carr. 2015. "Osteoarthritis." *The Lancet* 386 (9991): 376–87. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60802-3.

Goetz, Sarah C., and Kathryn V. Anderson. 2010. "The Primary Cilium: A Signalling Centre during Vertebrate Development." *Nature Reviews Genetics* 11 (5): 331–44. https://doi.org/10.1038/nrg2774.

Goodrich, Lisa V., Ljiljana Milenković, Kay M. Higgins, and Matthew P. Scott. 1997. "Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse Patched Mutants." *Science* 277 (5329): 1109–13. https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1109.

Gruber, Helen E., Jane A. Ingram, H. James Norton, and Edward N. Hanley. 2007. "Senescence in Cells of the Aging and Degenerating Intervertebral Disc: Immunolocalization of Senescence-Associated β-Galactosidase in Human and Sand Rat Discs." *Spine* 32 (3): 321–27. https://doi.org/10.1097/01.brs.0000253960.57051.de.

Grunhagen, Thijs, Aboulfazl Shirazi-Adl, Jeremy C.T. Fairbank, and Jill P.G. Urban. 2011. "Intervertebral Disk Nutrition: A Review of Factors Influencing Concentrations of Nutrients and Metabolites." *Orthopedic Clinics of North America* 42 (4): 465–77. https://doi.org/10.1016/j.ocl.2011.07.010.

Guenther, Matthew G., Garrett M. Frampton, Frank Soldner, Dirk Hockemeyer, Maya Mitalipova, Rudolf Jaenisch, and Richard A. Young. 2010. "Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 7 (2): 249–57. https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.015.

Gunja-Smith, Zeenat, and J. Frederick Woessner. 1993. "Activation of Cartilage Stromelysin-1 at Acid PH and Its Relation to Enzyme PH Optimum and Osteoarthritis." *Agents and Actions* 40 (3–4): 228–31. https://doi.org/10.1007/BF01984067.

Gustavsson, Johanna, Santiago Parpal, Margareta Karlsson, Cecilia Ramsing, Hans Thorn, Marie Borg, Margaretha Lindroth, Kajsa Holmgren Peterson, Karl-Eric Magnusson, and Peter Strålfors. 1999. "Localization of the Insulin Receptor in Caveolae of Adipocyte Plasma Membrane." *The FASEB Journal* 13 (14): 1961–71. https://doi.org/10.1096/fasebj.13.14.1961.

Guyer, Richard D., Paul C. McAfee, Stephen H. Hochschuler, Scott L. Blumenthal, Ira L. Fedder, Donna D. Ohnmeiss, and Bryan W. Cunningham. 2004. "Prospective Randomized Study of the Charité

Artificial Disc: Data from Two Investigational Centers." *Spine Journal* 4 (6 SUPPL.): S252–59. https://doi.org/10.1016/j.spinee.2004.07.019.

Hammerschmidt, Matthias, Adam Brook, and Andrew P. McMahon. 1997. "The World According to Hedgehog." *Trends in Genetics* 13 (1): 14–21. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(96)10051-2.

Hansen, Carsten G, Nicholas A Bright, Gillian Howard, and Benjamin J Nichols. 2009. "SDPR Induces Membrane Curvature and Functions in the Formation of Caveolae." *Nature Cell Biology* 11 (7): 807–14. https://doi.org/10.1038/ncb1887.

Hansen, Carsten Gram, Gillian Howard, and Benjamin J. Nichols. 2011. "Pacsin 2 Is Recruited to Caveolae and Functions in Caveolar Biogenesis." *Journal of Cell Science* 124 (16): 2777–85. https://doi.org/10.1242/jcs.084319

Harris, James, Dirk Werling, Jayne C. Hope, Geraldine Taylor, and Chris J. Howard. 2002. "Caveolae and Caveolin in Immune Cells: Distribution and Functions." *Trends in Immunology* 23 (3): 158–64. https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02161-5.

Harrop, James S., Jim A. Youssef, Mitch Maltenfort, Peggy Vorwald, Pascal Jabbour, Christopher M. Bono, Neil Goldfarb, Alexander R. Vaccaro, and Alan S. Hilibrand. 2008. "Lumbar Adjacent Segment Degeneration and Disease after Arthrodesis and Total Disc Arthroplasty." *Spine* 33 (15): 1701–7. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31817bb956.

Hayashi, Yukiko K., Chie Matsuda, Megumu Ogawa, Kanako Goto, Kayo Tominaga, Satomi Mitsuhashi, Young Eun Park, et al. 2009. "Human PTRF Mutations Cause Secondary Deficiency of Caveolins Resulting in Muscular Dystrophy with Generalized Lipodystrophy." *Journal of Clinical Investigation* 119 (9): 2623–33. https://doi.org/10.1172/JCI38660.

Hayer, Arnold, Miriam Stoeber, Christin Bissig, and Ari Helenius. 2010. "Biogenesis of Caveolae: Stepwise Assembly of Large Caveolin and Cavin Complexes." *Traffic* 11 (3): 361–82. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01023.x.

He, Qing, Zhanguo Gao, Jun Yin, Jin Zhang, Zhong Yun, and Jianping Ye. 2011. "Regulation of HIF-1α Activity in Adipose Tissue by Obesity-Associated Factors: Adipogenesis, Insulin, and Hypoxia." *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 300 (5): 877–85. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00626.2010.

Head, Brian P., and Paul A. Insel. 2007. "Do Caveolins Regulate Cells by Actions Outside of Caveolae?" *Trends in Cell Biology* 17 (2): 51–57. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.11.008.

Heathfield, Sarah Kathleen, Christine Lyn Le Maitre, and Judith Alison Hoyland. 2008. "Caveolin-1 Expression and Stress-Induced Premature Senescence in Human Intervertebral Disc Degeneration." *Arthritis Research and Therapy* 10 (4): 1–9. https://doi.org/10.1177/0954410016650710.

Henry, Nina, Johann Clouet, Jean Le Bideau, Catherine Le Visage, and Jérôme Guicheux. 2018. "Innovative Strategies for Intervertebral Disc Regenerative Medicine: From Cell Therapies to Multiscale Delivery Systems." *Biotechnology Advances* 36 (1): 281–94. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.009.

Henry, Nina, Pauline Colombier, Laurent Lescaudron, Olivier Hamel, Jean Le Bideau, Jérôme Guicheux, and Johann Clouet. 2014. "Regenerative Medicine of the Intervertebral Disc: From Pathophysiology to Clinical Application." *Médecine Sciences : M/S* 30 (12): 1091–1100. https://doi.org/10.1051/medsci/20143012012.

Hill, Michelle M., Michele Bastiani, Robert Luetterforst, Matthew Kirkham, Annika Kirkham, Susan J. Nixon, Piers Walser, et al. 2008. "PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation and Function." *Cell* 132 (1): 113–24.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.042.

Hoernke, Maria, Jagan Mohan, Elin Larsson, Jeanette Blomberg, Dana Kahra, Sebastian Westenhoff, Christian Schwieger, and Richard Lundmark. 2017. "EHD2 Restrains Dynamics of Caveolae by an ATPdependent, Membrane-Bound, Open Conformation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (22): E4360–69. https://doi.org/10.1073/pnas.1614066114.

Hohaus, C., T. M. Ganey, Y. Minkus, and H. J. Meisel. 2008. "Cell Transplantation in Lumbar Spine Disc Degeneration Disease." *European Spine Journal* 17 (SUPPL. 4): 492–503. https://doi.org/10.1007/s00586-008-0750-6.

Holm, S., A. Maroudas, J. P.G. Urban, G. Selstam, and A. Nachemson. 1981. "Nutrition of the Intervertebral Disc: Solute Transport and Metabolism." *Connective Tissue Research* 8 (2): 101–19. https://doi.org/10.3109/03008208109152130.

Hong, Xin, Cong Zhang, Feng Wang, and Xiao Tao Wu. 2019. "Large Cytoplasmic Vacuoles within Notochordal Nucleus Pulposus Cells: A Possible Regulator of Intracellular Pressure That Shapes the Cytoskeleton and Controls Proliferation." *Cells Tissues Organs* 206 (1–2): 9–15. https://doi.org/10.1159/000493258.

Hosogai, Naomi, Atsunori Fukuhara, Kazuya Oshima, Yugo Miyata, Sachiyo Tanaka, Katsumori Segawa, Shigetada Furukawa, et al. 2007. "Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation." *Diabetes* 56 (4): 901–11. https://doi.org/10.2337/db06-0911.

Hsieh, Adam H., and Julianne D. Twomey. 2010. "Cellular Mechanobiology of the Intervertebral Disc: New Directions and Approaches." *Journal of Biomechanics* 43 (1): 137–45. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.019.

Hu, Ming Hsiao, Li Wei Hung, Shu Hua Yang, Yuan Hui Sun, Tiffany Ting Fang Shih, and Feng Huei Lin. 2011. "Lovastatin Promotes Redifferentiation of Human Nucleus Pulposus Cells During Expansion in Monolayer Culture." *Artificial Organs* 35 (4): 411–16. https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2010.01070.x.

Huang, Yong Can, Jill P.G. Urban, and Keith D.K. Luk. 2014. "Intervertebral Disc Regeneration: Do Nutrients Lead the Way?" *Nature Reviews Rheumatology* 10 (9): 561–66. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.91.

Huangfu, Danwei, and Kathryn V Anderson. 2005. "Cilia and Hedgehog Responsiveness in the Mouse," no. 3: 2–7.

Humzah, M. D., and R. W. Soames. 1988. "Human Intervertebral Disc: Structure and Function." *The Anatomical Record* 220 (4): 337–56. https://doi.org/10.1002/ar.1092200402.

Hunter, Christopher J., Sophia Bianchi, Phil Cheng, and Ken Muldrew. 2007. "Osmoregulatory Function of Large Vacuoles Found in Notochordal Cells of the Intervertebral Disc Running Title: An Osmoregulatory Vacuole." *MCB Molecular and Cellular Biomechanics* 4 (4): 227–37. https://doi.org/10.3970/mcb.2007.004.227.

Hunter, Christopher J., John R. Matyas, and Neil A. Duncan. 2004. "Cytomorphology of Notochordal and Chondrocytic Cells from the Nucleus Pulposus: A Species Comparison." *Journal of Anatomy* 205 (5): 357–62. https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2004.00352.x.

Hwang, Priscilla Y., Jun Chen, Liufang Jing, Brenton D. Hoffman, and Lori A. Setton. 2014. "The Role Of Extracellular Matrix Elasticity and Composition In Regulating the Nucleus Pulposus Cell Phenotype in the Intervertebral Disc: A Narrative Review." *Journal of Biomechanical Engineering* 136 (2): 021010. https://doi.org/10.1115/1.4026360.

Ishihara, Hirokazu, Katarina Warensjo, Sally Roberts, and Jill P.G. Urban. 1997. “Proteoglycan Synthesis in the Intervertebral Disk Nucleus: The Role of Extracellular Osmolality.” *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 272 (5 41-5). https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.5.c1499.

Ishikawa, Hiroaki, and Wallace F. Marshall. 2014. “Mechanobiology of Ciliogenesis.” *BioScience* 64 (12): 1084–91. https://doi.org/10.1093/biosci/biu173.

J.J. CASSIDY, A. HILTNER and E. BAER. 1989. “Hierarchical Structure of the Intervertebral Disc.” *Connective Tissue Research* 23: 75–88. https://doi.org/10.3109/03008208909103905.

Jansa, Petr, Stephen W. Mason, Urs Hoffmann-Rohrer, and Ingrid Grummt. 1998. “Cloning and Functional Characterization of PTRF, a Novel Protein Which Induces Dissociation of Paused Ternary Transcription Complexes.” *EMBO Journal* 17 (10): 2855–64. https://doi.org/10.1093/emboj/17.10.2855.

Jeong, Yongsu, and Douglas J Epstein. 2003. “Distinct Regulators of Shh Transcription in the Floor Plate and Notochord Indicate Separate Origins for These Tissues in the Mouse Node,” 3891–3902. https://doi.org/10.1242/dev.00590.

Jia, Yibin, Nana Wang, Jianbo Wang, Hui Tian, Wei Ma, Kai Wang, Bingxu Tan, et al. 2014. “Down-Regulation of Stromal Caveolin-1 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Potent Predictor of Lymph Node Metastases, Early Tumor Recurrence, and Poor Prognosis.” *Annals of Surgical Oncology* 21 (1): 329–36. https://doi.org/10.1245/s10434-013-3225-x.

Jiang, Libo, Fenglai Yuan, Xiaofan Yin, and Jian Dong. 2014. “Responses and Adaptations of Intervertebral Disc Cells to Microenvironmental Stress: A Possible Central Role of Autophagy in the Adaptive Mechanism.” *Connective Tissue Research* 55 (5–6): 311–21. https://doi.org/10.3109/03008207.2014.942419.

Jin, Lin Yu, Xiao Xing Song, and Xin Feng Li. 2020. “The Role of Estrogen in Intervertebral Disc Degeneration.” *Steroids* 154 (September 2019): 108549. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108549.

Johnson, Randy L., Ed Laufer, Robert D. Riddle, and Cliff Tabin. 1994. “Ectopic Expression of Sonic Hedgehog Alters Dorsal-Ventral Patterning of Somites.” *Cell* 79 (7): 1165–73. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90008-6.

Johnson, Z. I., Z. R. Schoepflin, H. Choi, I. M. Shapiro, and M. V. Risbud. 2015. “Disc in Flames: Roles of TNF-α and IL-1β in Intervertebral Disc Degeneration.” *European Cells and Materials* 30: 104–17. https://doi.org/10.22203/eCM.v030a08.

Johnstone, B., J. P.G. Urban, S. Roberts, and J. Menage. 1992. “The Fluid Content of the Human Intervertebral Disc: Comparison between Fluid Content and Swelling Pressure Profiles of Discs Removed at Surgery and Those Taken Postmortem.” *Spine*. https://doi.org/10.1097/00007632-199204000-00006.

Joo, H. J., D. K. Oh, Y. S. Kim, K. B. Lee, and S. J. Kim. 2004. “Increased Expression of Caveolin-1 and Microvessel Density Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.” *BJU International* 93 (3): 291–96. https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2004.04604.x.

Joshi, Bharat, Michele Bastiani, Scott S. Strugnell, Cecile Boscher, Robert G. Parton, and Ivan R. Nabi. 2012. “Phosphocaveolin-1 Is a Mechanotransducer That Induces Caveola Biogenesis via Egr1 Transcriptional Regulation.” *Journal of Cell Biology* 199 (3): 425–35. https://doi.org/10.1083/jcb.201207089.

Jurand, A. 1974. “Some Aspects of the Development of the Notochord in Mouse Embryos.” *Journal of*

Embryology and Experimental Morphology 32 (1): 1–33. https://doi.org/10.1242/dev.32.1.1.

K. Wuertz, J.P.G. Urban, J. Klasen, A. Ignatius, H.-J. Wilke, L. Claes, C. Neidlinger-Wilke. 2007. "Influence of Extracellular Osmolarity and Mechanical Stimulation on Gene Expression of Intervertebral Disc Cells." *Journal of Orthopaedic Research September* 25 (november): 1513–22. https://doi.org/DOI 10.1002/jor.20436.

Karlsson, Margareta, Hans Thorn, Santiago Parpal, Peter Strålfors, and Johanna Gustavsson. 2002. "Insulin Induces Translocation of Glucose Transporter GLUT4 to Plasma Membrane Caveolae in Adipocytes." *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (2): 249–51. https://doi.org/10.1096/fj.01-0646fje.

Karpen, Heidi E., John T. Bukowski, Thomas Hughes, Jean Philíppe Gratton, William C. Sessa, and Mac R. Gailani. 2001. "The Sonic Hedgehog Receptor Patched Associates with Caveolin-1 in Cholesterol-Rich Microdomains of the Plasma Membrane." *Journal of Biological Chemistry* 276 (22): 19503–11. https://doi.org/10.1074/jbc.M010832200.

Karussis, Dimitrios, Ibrahim Kassis, Basan Gowda S. Kurkalli, and Shimon Slavin. 2008. "Immunomodulation and Neuroprotection with Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells (MSCs): A Proposed Treatment for Multiple Sclerosis and Other Neuroimmunological/Neurodegenerative Diseases." *Journal of the Neurological Sciences* 265 (1–2): 131–35. https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.05.005.

Kauppila, L. I. 2009. "Atherosclerosis and Disc Degeneration/Low-Back Pain - A Systematic Review." *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 37 (6): 661–70. https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2009.02.006.

Kempson, G. E., Helen Muir, C. Pollard, and M. Tuke. 1973. "The Tensile Properties of the Cartilage of Human Femoral Condyles Related to the Content of Collagen and Glycosaminoglycans." *BBA - General Subjects* 297 (2): 456–72. https://doi.org/10.1016/0304-4165(73)90093-7.

Kepler, Christopher K., Ravi K. Ponnappan, Chadi A. Tannoury, Marakand V. Risbud, and David G. Anderson. 2013. "The Molecular Basis of Intervertebral Disc Degeneration." *Spine Journal* 13 (3): 318–30. https://doi.org/10.1016/j.spinee.2012.12.003.

Ketteler, Julia, and Diana Klein. 2018. "Caveolin-1, Cancer and Therapy Resistance." *International Journal of Cancer* 143 (9): 2092–2104. https://doi.org/10.1002/ijc.31369.

Kim, C. A., Marc Delépine, Emilie Boutet, Haquima El Mourabit, Soazig Le Lay, Muriel Meier, Mona Nemani, et al. 2008. "Association of a Homozygous Nonsense Caveolin-1 Mutation with Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (4): 1129–34. https://doi.org/10.1210/jc.2007-1328.

Kim, Jung Whan, Irina Tchernyshyov, Gregg L. Semenza, and Chi V. Dang. 2006. "HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: A Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia." *Cell Metabolism* 3 (3): 177–85. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002.

Kim, Ki Won, Ha Na Chung, Kee Yong Ha, Jun Seok Lee, and Young Yul Kim. 2009. "Senescence Mechanisms of Nucleus Pulposus Chondrocytes in Human Intervertebral Discs." *Spine Journal* 9 (8): 658–66. https://doi.org/10.1016/j.spinee.2009.04.018.

Kirkham, Matthew, Akikazu Fujita, Rahul Chadda, Susan J. Nixon, Teymuras V. Kurzchalia, Deepak K. Sharma, Richard E. Pagano, John F. Hancock, Satyajit Mayor, and Robert G. Parton. 2005. "Ultrastructural Identification of Uncoated Caveolin-Independent Early Endocytic Vehicles." *Journal of Cell Biology* 168 (3): 465–76. https://doi.org/10.1083/jcb.200407078.

Kirkham, Matthew, Susan J. Nixon, Mark T. Howes, Laurent Abi-Rached, Diane E. Wakeham, Michael Hanzal-Bayer, Charles Ferguson, et al. 2008. “Evolutionary Analysis and Molecular Dissection of Caveola Biogenesis.” *Journal of Cell Science* 121 (12): 2075–86. https://doi.org/10.1242/jcs.024588.

Kluba, Torsten, Thomas Niemeyer, Christoph Gaissmaier, and Tatiana Gründer. 2005. “Human Anulus Fibrosis and Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc.” *Spine* 30 (24): 2743–48. https://doi.org/10.1097/01.brs.0000192204.89160.6d.

Koehler, Karl R., Philippe Tropel, Jonathan W. Theile, Takako Kondo, Theodore R. Cummins, Stéphane Viville, and Eri Hashino. 2011. “Extended Passaging Increases the Efficiency of Neural Differentiation from Induced Pluripotent Stem Cells.” *BMC Neuroscience* 12. https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-82.

Kolluru, Gopi Krishna, Jamila H. Siamwala, and Suvro Chatterjee. 2010. “ENOS Phosphorylation in Health and Disease.” *Biochimie* 92 (9): 1186–98. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.020.

Kondo, Naoki, Takahito Yuasa, Kengo Shimono, Weien Tung, Takahiro Okabe, Rika Yasuhara, Maurizio Pacifici, Yejia Zhang, Masahiro Iwamoto, and Motomi Enomoto-Iwamoto. 2011. “Intervertebral Disc Development Is Regulated by Wnt/β-Catenin Signaling.” *Spine* 36 (8). https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181f52cb5.

Korecki, Casey L., Juan M. Taboas, Rocky S. Tuan, and James C. Iatridis. 2010. “Notochordal Cell Conditioned Medium Stimulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation toward a Young Nucleus Pulposus Phenotype.” *Stem Cell Research and Therapy* 1 (2). https://doi.org/10.1186/scrt18.

Krajewska, Wanda M, and Izabela Maslowska. 2004. “Caveolins: Structure and Function in Signal Transduction Wanda.” *Cellular & Molecular Biology Letters* 9 (December 2003): 195–220.

Kurzchalia, T. V., P. Dupree, R. G. Parton, R. Kellner, H. Virta, M. Lehnert, and K. Simons. 1992. “VIP21, a 21-KD Membrane Protein Is an Integral Component of Trans-Golgi- Network-Derived Transport Vesicles.” *Journal of Cell Biology* 118 (5): 1003–14. https://doi.org/10.1083/jcb.118.5.1003.

Kushioka, Junichi, Takashi Kaito, R. Chijimatsu, Rintaro Okada, Hiroyuki Ishiguro, Zeynep Bal, Joe Kodama, et al. 2019. “A Novel and Efficient Method for Culturing Mouse Nucleus Pulposus Cells.” *Spine Journal* 19 (9): 1573–83. https://doi.org/10.1016/j.spinee.2019.04.005.

Kyung-Suk Choi, Chanmi Lee, and Brian D. Harfe. 2012. “Sonic Hedgehog in the Notochord Is Sufficient for Patterning of the Intervertebral Discs.” *Magn Reson Imaging* 31 (3): 477–79. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage.

Laclef, Christine. 2014. “Le Cil Primaire, Orchestrateur de La Morphogenèse Cérébrale.” *Medecine/Sciences* 30 (11): 980–90. https://doi.org/10.1051/medsci/20143011012.

Laclef, Christine, Isabelle Anselme, Laurianne Besse, Martin Catala, Aurélien Palmyre, Dominique Baas, Marie Paschaki, et al. 2015. “The Role of Primary Cilia in Corpus Callosum Formation Is Mediated by Production of the Gli3 Repressor.” *Human Molecular Genetics* 24 (17): 4997–5014. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv221.

Lahtinen, Ulla, Masanori Honsho, Robert G. Parton, Kai Simons, and Paul Verkade. 2003. “Involvement of Caveolin-2 in Caveolar Biogenesis in MDCK Cells.” *FEBS Letters* 538 (1–3): 85–88. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00135-2.

Lamaze, Christophe, and Stéphanie Torrino. 2015. “Caveolae and Cancer: A New Mechanical Perspective.” *Biomedical Journal* 38 (5): 367–79. https://doi.org/10.4103/2319-4170.164229.

Lan, Tao, Yu-chen Zheng, Ning-dao Li, Xiao-sheng Chen, Zhe Shen, and Bin Yan. 2021. “CRISPR/DCas9-Mediated Parkin Inhibition Impairs Mitophagy and Aggravates Apoptosis of Rat Nucleus Pulposus

Cells Under Oxidative Stress." *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (April): 1–10. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.674632.

Laurila, Kirsti, Reija Autio, Lingjia Kong, Elisa Närvä, Samer Hussein, Timo Otonkoski, Riitta Lahesmaa, and Harri Lähdesmäki. 2014. "Integrative Genomics and Transcriptomics Analysis of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells." *BioData Mining* 7 (1): 1–16. https://doi.org/10.1186/s13040-014-0032-2.

Lawson, Lisa Y., and Brian D. Harfe. 2017. "Developmental Mechanisms of Intervertebral Disc and Vertebral Column Formation." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 6 (6). https://doi.org/10.1002/wdev.283.

Le Lay, Soazig Le, Eric Hajduch, Margaret R. Lindsay, Xavier Le Lièpvre, Christoph Thiele, Pascal Ferré, Robert G. Parton, Teymuras Kurzchalia, Kai Simons, and Isabelle Dugail. 2006. "Cholesterol-Induced Caveolin Targeting to Lipid Droplets in Adipocytes: A Role for Caveolar Endocytosis." *Traffic* 7 (5): 549–61. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00406.x.

Lee, H., D. Volonte, F. Galbiati, P. Iyengar, D. M. Lublin, D. B. Bregman, M. T. Wilson, et al. 2000. "Constitutive and Growth Factor-Regulated Phosphorylation of Caveolin-1 Occurs at the Same Site (Tyr-14) in Vivo: Identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 Signaling Cassette." *Molecular Endocrinology* 14 (11): 1750–75. https://doi.org/10.1210/mend.14.11.0553.

Lee, Jeffrey, Kenneth A. Platt, Patricia Censullo, and Ariel Ruiz I Altaba. 1997. "Gli1 Is a Target of Sonic Hedgehog That Induces Ventral Neural Tube Development." *Development* 124 (13): 2537–52.

Lefebvre, Véronique. 2019. "Roles and Regulation of SOX Transcription Factors in Skeletogenesis." *Current Topics in Developmental Biology* 133: 171–93. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.007.

Li, Guoan, Shaobai Wang, Peter Passias, Qun Xia, Gang Li, and Kirkham Wood. 2009. "Segmental in Vivo Vertebral Motion during Functional Human Lumbar Spine Activities." *European Spine Journal* 18 (7): 1013–21. https://doi.org/10.1007/s00586-009-0936-6.

Li, Likun, Chengzhen Ren, Guang Yang, Alexei A. Goltsov, Ken Ichi Tabata, and Timothy C. Thompson. 2009. "Caveolin-1 Promotes Autoregulatory, Akt-Mediated Induction of Cancer-Promoting Growth Factors in Prostate Cancer Cells." *Molecular Cancer Research* 7 (11): 1781–91. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0255.

Li, Pei, Yibo Gan, Yuan Xu, Songtao Li, Lei Song, Sukai Li, Huijuan Li, and Qiang Zhou. 2016. "Osmolarity Affects Matrix Synthesis in the Nucleus Pulposus Associated with the Involvement of MAPK Pathways: A Study of Ex Vivo Disc Organ Culture System." *Journal of Orthopaedic Research* 34 (6): 1092–1100. https://doi.org/10.1002/jor.23106.

Li, Shengwen, Ferruccio Galbiati, Daniela Volonte', Massimo Sargiacomo, Jeffrey A. Engelman, Kallol Das, Philipp E. Scherer, and Michael P. Lisanti. 1998. "Mutational Analysis of Caveolin-Induced Vesicle Formation. Expression of Caveolin-1 Recruits Caveolin-2 to Caveolae Membranes." *FEBS Letters* 434 (1–2): 127–34. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00945-4.

Li, Siyuan, Victor C. Duance, and Emma J. Blain. 2008. "Zonal Variations in Cytoskeletal Element Organization, MRNA and Protein Expression in the Intervertebral Disc." *Journal of Anatomy* 213 (6): 725–32. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00998.x.

Li, Tianhong, Federica Sotgia, Magalis A. Vuolo, Maomi Li, Wan Cai Yang, Richard G. Pestell, Joseph A. Sparano, and Michael P. Lisanti. 2006. "Caveolin-1 Mutations in Human Breast Cancer: Functional Association with Estrogen Receptor α-Positive Status." *American Journal of Pathology* 168 (6): 1998–2013. https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051089.

Li, Xinhua, Shuting Yang, Lin Han, Keya Mao, and Shuying Yang. 2020. "Ciliary IFT80 Is Essential for

Intervertebral Disc Development and Maintenance." *FASEB Journal* 34 (5): 6741–56. https://doi.org/10.1096/fj.201902838R.

Liebscher, Thomas, Mathias Haefeli, Karin Wuertz, Andreas G. Nerlich, and Norbert Boos. 2011. "Age-Related Variation in Cell Density of Human Lumbar Intervertebral Disc." *Spine* 36 (2): 153–59. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181cd588c.

Lim, Ye Wheen, Harriet P. Lo, Charles Ferguson, Nick Martel, Jean Giacomotto, Guillermo A. Gomez, Alpha S. Yap, Thomas E. Hall, and Robert G. Parton. 2017. "Caveolae Protect Notochord Cells against Catastrophic Mechanical Failure during Development." *Current Biology* 27 (13): 1968-1981.e7. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.067.

Lisanti, Michael P., Philipp E. Scherer, Jolanta Vidugiriene, Zhao Lan Tang, Anne Hermanowski-Vosatka, Ya Huei Tu, Richard F. Cook, and Massimo Sargiacomo. 1994. "Characterization of Caveolin-Rich Membrane Domains Isolated from an Endothelial-Rich Source: Implications for Human Disease." *Journal of Cell Biology* 126 (1): 111–26. https://doi.org/10.1083/jcb.126.1.111.

Liu, Libin. 2020. "Lessons from Cavin-1 Deficiency" 48: 147–54.

Liu, Libin, Dennis Brown, Mary McKee, Nathan K. LeBrasseur, Dan Yang, Kenneth H. Albrecht, Katya Ravid, and Paul F. Pilch. 2008. "Deletion of Cavin/PTRF Causes Global Loss of Caveolae, Dyslipidemia, and Glucose Intolerance." *Cell Metabolism* 8 (4): 310–17. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.008.

Liu, Libin, Carsten G. Hansen, Brian J. Honeyman, Benjamin J. Nichols, and Paul F. Pilch. 2014. "Cavin-3 Knockout Mice Show That Cavin-3 Is Not Essential for Caveolae Formation, for Maintenance of Body Composition, or for Glucose Tolerance." *PLoS ONE* 9 (7): 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102935.

Liu, Libin, and Paul F. Pilch. 2008. "A Critical Role of Cavin (Polymerase I and Transcript Release Factor) in Caveolae Formation and Organization." *Journal of Biological Chemistry* 283 (7): 4314–22. https://doi.org/10.1074/jbc.M707890200.

Liu, Yongxing, Mohamed N. Rahaman, and B. Sonny Bal. 2014. "Modulating Notochordal Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Natural Nucleus Pulposus Tissue Matrix." *PLoS ONE* 9 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100885.

Llorente, Alicia, María C. de Marco, and Miguel A. Alonso. 2004. "Caveolin-1 and MAL Are Located on Prostasomes Secreted by the Prostate Cancer PC-3 Cell Line." *Journal of Cell Science* 117 (22): 5343–51. https://doi.org/10.1242/jcs.01420.

Logozzi, Mariantonia, Angelo De Milito, Luana Lugini, Martina Borghi, Luana Calabrò, Massimo Spada, Maurizio Perdicchio, et al. 2009. "High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin-1 in Plasma of Melanoma Patients." *PLoS ONE* 4 (4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005219.

Loh, Yuin Han, Qiang Wu, Joon Lin Chew, Vinsensius B. Vega, Weiwei Zhang, Xi Chen, Guillaume Bourque, et al. 2006. "The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells." *Nature Genetics* 38 (4): 431–40. https://doi.org/10.1038/ng1760.

Lowe, L. A., S. Yamada, and M. R. Kuehn. 2001. "Genetic Dissection of Nodal Function in Patterning the Mouse Embryo." *Development* 128 (10): 1831–43.

Ludwig, Alexander, Gillian Howard, Carolina Mendoza-Topaz, Thomas Deerinck, Mason Mackey, Sara Sandin, Mark H. Ellisman, and Benjamin J. Nichols. 2013. "Molecular Composition and Ultrastructure of the Caveolar Coat Complex." *PLoS Biology* 11 (8). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001640.

Luoma, Katariina, Hilkka Riihimäki, Ritva Luukkonen, Raili Raininko, Eira Viikari-Juntura, and Antti

Lamminen. 2000. “Low Back Pain in Relation to Lumbar Disc Degeneration.” *Spine* 25 (4): 487–92. https://doi.org/10.1097/00007632-200002150-00016.

M T Modic, T J Masaryk, J S Ross, J R Carter. 1988. “Imaging of Degenerative Disk Disease.” *Radiology* 168: 177–86. https://doi.org/10.1148/radiology.168.1.3289089.

Ma, K. G., Z. W. Shao, S. H. Yang, J. Wang, B. C. Wang, L. M. Xiong, Q. Wu, and S. F. Chen. 2013. “Autophagy Is Activated in Compression-Induced Cell Degeneration and Is Mediated by Reactive Oxygen Species in Nucleus Pulposus Cells Exposed to Compression.” *Osteoarthritis and Cartilage* 21 (12): 2030–38. https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.10.002.

Maier, Jennifer A, Yin Ting Lo, and Brian D Harfe. 2013. “Foxa1 and Foxa2 Are Required for Formation of the Intervertebral Discs.” *PLoS ONE* 8 (1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055528.

Maitre, Christine Le, Anthony Freemont, and Judith Hoyland. 2007. “Accelerated Cellular Senescence in Degenerate Intervertebral Discs: A Possible Role in the Pathogenesis of Intervertebral Disc Degeneration.” *Arthritis Research & Therapy* 9 (3): R45. https://doi.org/10.1186/ar2198.

Maitre, Christine Lyn Le, Jennie Frain, Jane Millward-Sadler, Andrew P. Fotheringham, Anthony John Freemont, and Judith Alison Hoyland. 2009. “Altered Integrin Mechanotransduction in Human Nucleus Pulposus Cells Derived from Degenerated Discs.” *Arthritis and Rheumatism* 60 (2): 460–69. https://doi.org/10.1002/art.24248.

Maitre, Christine Lyn Le, Anthony J. Freemont, and Judith Alison Hoyland. 2005. “The Role of Interleukin-1 in the Pathogenesis of Human Intervertebral Disc Degeneration.” *Arthritis Research & Therapy* 7 (4): 732–45. https://doi.org/10.1186/ar1732.

Makarand V Risbud 1 , Zachary R Schoepflin, Fackson Mwale, Rita A Kandel, Sibylle Grad, James C Iatridis, Daisuke Sakai, Judith A Hoyland. 2015. “Defining the Phenotype of Young Healthy Nucleus Pulposus Cells: Recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 Annual ORS Meeting.” *J Orthop Res* 33 (3): 283–93. https://doi.org/doi:10.1002/jor.22789.

Martel-Pelletier, Johanne, Andrew J. Barr, Flavia M. Cicuttini, Philip G. Conaghan, Cyrus Cooper, Mary B. Goldring, Steven R. Goldring, Graeme Jones, Andrew J. Teichtahl, and Jean Pierre Pelletier. 2016. “Osteoarthritis.” *Nature Reviews Disease Primers* 2. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.72.

Martin J Cohn, Brian D Harfe Kyung-Suk Choi 1. 2008. “Identification of Nucleus Pulposus Precursor Cells and Notochordal Remnants in the Mouse: Implications for Disk Degeneration and Chordoma Formation.” *Developmental Dynamics* 237 (12): 3953–58. https://doi.org/10.1002/dvdy.21805.Identification.

Martin, James A., and Joseph A. Buckwalter. 2002. “Aging, Articular Cartilage Chondrocyte Senescence and Osteoarthritis.” *Biogerontology* 3 (5): 257–64. https://doi.org/10.1023/A:1020185404126.

Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Renee M. Balliet, Dayana B. Rivadeneira, Barbara Chiavarina, Stephanos Pavlides, Chenguang Wang, Diana Whitaker-Menezes, et al. 2010. “Oxidative Stress in Cancer Associated Fibroblasts Drives Tumor-Stroma Co-Evolution: A New Paradigm for Understanding Tumor Metabolism, the Field Effect and Genomic Instability in Cancer Cells.” *Cell Cycle* 9 (16): 3256–76. https://doi.org/10.4161/cc.9.16.12553.

Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. 2015. “Caveolae and Signalling in Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 15 (4): 225–37. https://doi.org/10.1038/nrc3915.

Masserini, Massimo, Paola Palestini, and Marina Pitto. 1999. “Glycolipid-Enriched Caveolae and Caveolae-like Domains the Nervous System.” *Journal of Neurochemistry* 73 (1): 1–11. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730001.x.

Matta, Ajay, and W. Mark Erwin. 2020. “Injectable Biologics for the Treatment of Degenerative Disc Disease.” *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 13 (6): 680–87. https://doi.org/10.1007/s12178-020-09668-2.

Matthaeus, Claudia, Ines Lahmann, Séverine Kunz, Wenke Jonas, Arthur Alves Melo, Martin Lehmann, Elin Larsson, et al. 2020. “EHD2-Mediated Restriction of Caveolar Dynamics Regulates Cellular Fatty Acid Uptake.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (13): 7471–81. https://doi.org/10.1073/pnas.1918415117.

Mavrogonatou, Eleni, and Dimitris Kletsas. 2009. “High Osmolality Activates the G1 and G2 Cell Cycle Checkpoints and Affects the DNA Integrity of Nucleus Pulposus Intervertebral Disc Cells Triggering an Enhanced DNA Repair Response.” *DNA Repair* 8 (8): 930–43. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.05.005.

Mayer, Jillian E., James C. Iatridis, Danny Chan, Sheeraz A. Qureshi, Omri Gottesman, and Andrew C. Hecht. 2013. “Genetic Polymorphisms Associated with Intervertebral Disc Degeneration.” *Spine Journal* 13 (3): 299–317. https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.01.041.

McCann, M. R., O. J. Tamplin, J. Rossant, and C. A. Seguin. 2012. “Tracing Notochord-Derived Cells Using a Noto-Cre Mouse: Implications for Intervertebral Disc Development.” *Disease Models & Mechanisms* 5 (1): 73–82. https://doi.org/10.1242/dmm.008128.

McMahon, Kerrie Ann, Hubert Zajicek, Wei Ping Li, Michael J. Peyton, John D. Minna, V. James Hernandez, Katherine Luby-Phelps, and Richard G.W. Anderson. 2009. “SRBC/Cavin-3 Is a Caveolin Adapter Protein That Regulates Caveolae Function.” *EMBO Journal* 28 (8): 1001–15. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.46.

Merceron, Christophe, Laura Mangiavini, Alexander Robling, Tremika Leshan Wilson, Amato J. Giaccia, Irving M. Shapiro, Ernestina Schipani, and Makarand V. Risbud. 2014. “Loss of HIF-1α in the Notochord Results in Cell Death and Complete Disappearance of the Nucleus Pulposus.” *PLoS ONE* 9 (10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110768.

Mercier, Sandra, Véronique David, Leslie Ratié, Isabelle Gicquel, Sylvie Odent, and Valérie Dupé. 2013. “NODAL and SHH Dose-Dependent Double Inhibition Promotes an HPE-like Phenotype in Chick Embryos.” *DMM Disease Models and Mechanisms* 6 (2): 537–43. https://doi.org/10.1242/dmm.010132.

Michael P. Lisanti, Philipp E. Scherer, ZhaoLan Tang and Massimo Sargiacomo. 1994. “Caveolae, Caveolin and Caveolin-Rich Membrane Domains : A Signalling Hypothesis.” *Trends in Cell Biology* 4: 231–35. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.095451.

Mineo, Chieko, Yun Shu Ying, Christine Chapline, Susan Jaken, and Richard G.W. Anderson. 1998. “Targeting of Protein Kinase Cα to Caveolae.” *Journal of Cell Biology* 141 (3): 601–10. https://doi.org/10.1083/jcb.141.3.601.

Minogue, Ben M., Stephen M. Richardson, Leo A.H. Zeef, Anthony J. Freemont, and Judith A. Hoyland. 2010a. “Transcriptional Profiling of Bovine Intervertebral Disc Cells: Implications for Identification of Normal and Degenerate Human Intervertebral Disc Cell Phenotypes.” *Arthritis Research and Therapy* 12 (1): 1–20. https://doi.org/10.1186/ar2929.

Minogue, Ben M., Stephen M. Richardson, Leo A H Zeef, Anthony J. Freemont, and Judith A. Hoyland. 2010b. “Characterization of the Human Nucleus Pulposus Cell Phenotype and Evaluation of Novel Marker Gene Expression to Define Adult Stem Cell Differentiation.” *Arthritis and Rheumatism* 62 (12): 3695–3705. https://doi.org/10.1002/art.27710.

Mohan, Jagan, Björn Morén, Elin Larsson, Mikkel R. Holst, and Richard Lundmark. 2015. “Cavin3 Interacts with Cavin1 and Caveolin1 to Increase Surface Dynamics of Caveolae.” *Journal of Cell*

Science 128 (5): 979–91. https://doi.org/10.1242/jcs.161463.

Mohanty, Sarthak, and Chitra L. Dahia. 2019. "Defects in Intervertebral Disc and Spine during Development, Degeneration, and Pain: New Research Directions for Disc Regeneration and Therapy." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 8 (4): 1–24. https://doi.org/10.1002/wdev.343.

Monier, Solange, Robert G Parton, Frank Vogel, Joachim Behlke, Annemarie Henske, and Teymuras V Kurzchalia. 1995. "VIP21-Caveolin, a Membrane Protein Constituent of the Caveolar Coat, Oligomerizes in Vivo and in Vitro." *Molecular Biology of the Cell* 6 (July): 911–27. https://doi.org/10.1091/mbc.6.7.911.

Montesano, R., J. Roth, A. Robert, and L. Orci. 1982. "Non-Coated Membrane Invaginations Are Involved in Binding and Internalization of Cholera and Tetanus Toxins." *Nature* 296 (5858): 651–53. https://doi.org/10.1038/296651a0.

Moore, R. J. 2000. "The Vertebral End-Plate: What Do We Know?" *European Spine Journal* 9 (2): 92–96. https://doi.org/10.1007/s005860050217.

Mora, Rosalia, Vera L. Bonilha, Alan Marmorstein, Philipp E. Scherer, Dennis Brown, Michael P. Lisanti, and Enrique Rodriguez-Boulan. 1999. "Caveolin-2 Localizes to the Golgi Complex but Redistributes to Plasma Membrane, Caveolae, and Rafts When Co-Expressed with Caveolin-1." *Journal of Biological Chemistry* 274 (36): 25708–17. https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25708.

Morén, Björn, Claudio Shah, Mark T. Howes, Nicole L. Schieber, Harvey T. McMahon, Robert G. Parton, Oliver Daumke, and Richard Lundmark. 2012. "EHD2 Regulates Caveolar Dynamics via ATP-Driven Targeting and Oligomerization." *Molecular Biology of the Cell* 23 (7): 1316–29. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0787.

Moreno-Vicente, Roberto, Dácil María Pavón, Inés Martín-Padura, Mauro Català-Montoro, Alberto Díez-Sánchez, Antonio Quílez-Álvarez, Juan Antonio López, et al. 2018. "Caveolin-1 Modulates Mechanotransduction Responses to Substrate Stiffness through Actin-Dependent Control of YAP." *Cell Reports* 25 (6): 1622-1635.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.024.

Moroishi, Toshiro, Tomoko Hayashi, Wei-Wei Pan, Yu Fujita, Matthew V Holt, Jun Qin, Dennis A Carson, and Kun-Liang Guan. 2016. "The Hippo Pathway Kinases LATS1/2 Suppress Cancer Immunity Graphical Abstract HHS Public Access." *Cell* 167 (6): 1525–39. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.005.

Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T. V. Kurzchalia, and K. Simons. 1995. "VIP21/Caveolin Is a Cholesterol-Binding Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (22): 10339–43. https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10339.

Mwale, F., P. Roughley, J. Antoniou, M. Alini, A. Hollander, T. Kirsch, and I. Stokes. 2004. "Distinction between the Extracellular Matrix of the Nucleus Pulposus and Hyaline Cartilage: A Requisite for Tissue Engineering of Intervertebral Disc." *European Cells and Materials* 8: 58–64. https://doi.org/10.22203/eCM.v008a06.

Nachemson, Alf. 1969. "Intradiscal Measurements of Ph in Patients with Lumbar Rhizopathies." *Acta Orthopaedica* 40 (1): 23–42. https://doi.org/10.3109/17453676908989482.

Nassoy, Pierre, and Christophe Lamaze. 2012. "Stressing Caveolae New Role in Cell Mechanics." *Trends in Cell Biology* 22 (7): 381–89. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.007.

Nauta, Alma J., and Willem E. Fibbe. 2007. "Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells." *Blood* 110 (10): 3499–3506. https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069716.

Nerlich, Andreas G., Beatrice E. Bachmeier, and Norbert Boos. 2005. "Expression of Fibronectin and

TGF-B1 MRNA and Protein Suggest Altered Regulation of Extracellular Matrix in Degenerated Disc Tissue." *European Spine Journal* 14 (1): 17–26. https://doi.org/10.1007/s00586-004-0745-x.

Nichols, Ben. 2003. "Caveosomes and Endocytosis of Lipid Rafts." *Journal of Cell Science* 116 (23): 4707–14. https://doi.org/10.1242/jcs.00840.

Nimri, Lili, Hossei Barak, Lutz Graeve, and Betty Schwartz. 2013. "Restoration of Caveolin-1 Expression Suppresses Growth, Membrane-Type-4 Metalloproteinase Expression and Metastasis-Associated Activities in Colon Cancer Cells." *Molecular Carcinogenesis* 52 (11): 859–70. https://doi.org/10.1002/mc.21927.

Nixon, Susan J., Adrian Carter, Jeremy Wegner, Charles Ferguson, Matthias Floetenmeyer, Jamie Riches, Brian Key, Monte Westerfield, and Robert G. Parton. 2007. "Caveolin-1 Is Required for Lateral Line Neuromast and Notochord Development." *Journal of Cell Science* 120 (13): 2151–61. https://doi.org/10.1242/jcs.003830.

Norris, D. P., and D. T. Grimes. 2012. "Mouse Models of Ciliopathies: The State of the Art." *Disease Models & Mechanisms* 5 (3): 299–312. https://doi.org/10.1242/dmm.009340.

Oegema, Theodore R., David S. Bradford, Katherine M. Cooper, and Robert E. Hunter. 1983. "Comparison of the Biochemistry of Proteoglycans Isolated from Normal, Idiopathic Scoliotic and Cerebral Palsy Spines." *Spine* 8 (4): 378–84. https://doi.org/10.1097/00007632-198305000-00007.

Ogata, Takehiro, Tomomi Ueyama, Koji Isodono, Masashi Tagawa, Naofumi Takehara, Tsuneaki Kawashima, Koichiro Harada, et al. 2008. "MURC, a Muscle-Restricted Coiled-Coil Protein That Modulates the Rho/ROCK Pathway, Induces Cardiac Dysfunction and Conduction Disturbance." *Molecular and Cellular Biology* 28 (10): 3424–36. https://doi.org/10.1128/mcb.02186-07.

Oh, Phil, Deirdre P. McIntosh, and Jan E. Schnitzer. 1998. "Dynamin at the Neck of Caveolae Mediates Their Budding to Form Transport Vesicles by GTP-Driven Fission from the Plasma Membrane of Endothelium." *Journal of Cell Biology* 141 (1): 101–14. https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.101.

Ohba, Tetsuro, Hirotaka Haro, Takashi Ando, Masanori Wako, Fumiko Suenaga, Yoshinori Aso, Kensuke Koyama, Yoshiki Hamada, and Atsuhito Nakao. 2009. "TNF-α-Induced NF-KB Signaling Reverses Age-Related Declines in VEGF Induction and Angiogenic Activity in Intervertebral Disc Tissues." *Journal of Orthopaedic Research* 27 (2): 229–35. https://doi.org/10.1002/jor.20727.

Ohsawa, Yutaka, Hiroki Hagiwara, Masashi Nakatani, Akihiro Yasue, Keiji Moriyama, Tatsufumi Murakami, Kunihiro Tsuchida, Sumihare Noji, and Yoshihide Sunada. 2006. "Muscular Atrophy of Caveolin-3-Deficient Mice Is Rescued by Myostatin Inhibition." *Journal of Clinical Investigation* 116 (11): 2924–34. https://doi.org/10.1172/JCI28520.

Oliazadeh, Niaz, Kristen F. Gorman, Robert Eveleigh, Guillaume Bourque, and Alain Moreau. 2017. "Identification of Elongated Primary Cilia with Impaired Mechanotransduction in Idiopathic Scoliosis Patients." *Scientific Reports* 7 (April 2016): 1–16. https://doi.org/10.1038/srep44260.

Osafune, Kenji, Leslie Caron, Malgorzata Borowiak, Rita J. Martinez, Claire S. Fitz-Gerald, Yasunori Sato, Chad A. Cowan, Kenneth R. Chien, and Douglas A. Melton. 2008. "Marked Differences in Differentiation Propensity among Human Embryonic Stem Cell Lines." *Nature Biotechnology* 26 (3): 313–15. https://doi.org/10.1038/nbt1383.

P Brinckmann, W Frobin, E Hierholzer, M Horst. 1976. "Deformation of the Vertebral End-Plate under Axial Loading of the Spine." Spine. https://doi.org/10.1097/00007632-198311000-00007.

Paavola, L. G., D. B. Wilson, and E. M. Center. 1980. "Histochemistry of the Developing Notochord, Perichordal Sheath and Vertebrae in Danforth's Short-Tail (Sd) and Normal C57BL/6 Mice." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* Vol. 55 (215): 227–45.

Park, Woong Yang, Jeong Soo Park, Kyung A. Cho, Deok In Kim, Young Gyu Ko, Jeong Sun Seo, and Sang Chul Park. 2000. “Up-Regulation of Caveolin Attenuates Epidermal Growth Factor Signaling in Senescent Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20847–52. https://doi.org/10.1074/jbc.M908162199.

Parton, Robert G., Miguel A. del Pozo, Stéphane Vassilopoulos, Ivan R. Nabi, Soazig Le Lay, Richard Lundmark, Anne K. Kenworthy, et al. 2020. “Caveolae: The FAQs.” *Traffic* 21 (1): 181–85. https://doi.org/10.1111/tra.12689.

Parton, Robert G., and Ayanthi A. Richards. 2003. “Lipid Rafts and Caveolae as Portals for Endocytosis: New Insights and Common Mechanisms.” *Traffic* 4 (11): 724–38. https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00128.x.

Patani, Neill, Maryou B. Lambros, Rachael Natrajan, Konstantin J. Dedes, Felipe C. Geyer, Eric Ward, Lesley Ann Martin, Mitch Dowsett, and Jorge S. Reis-Filho. 2012. “Non-Existence of Caveolin-1 Gene Mutations in Human Breast Cancer.” *Breast Cancer Research and Treatment* 131 (1): 307–10. https://doi.org/10.1007/s10549-011-1761-2.

Pattappa, Girish, Zhen Li, Marianna Peroglio, Nadine Wismer, Mauro Alini, and Sibylle Grad. 2012. “Diversity of Intervertebral Disc Cells: Phenotype and Function.” *Journal of Anatomy* 221 (6): 480–96. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01521.x.

Paul, Ronjon, Rex C. Haydon, Hongwei Cheng, Akira Ishikawa, Nikola Nenadovich, Wei Jiang, Lan Zhou, et al. 2003. “Potential Use of Sox9 Gene Therapy for Intervertebral Degenerative Disc Disease.” *Spine* 28 (8): 755–63. https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000058946.64222.92.

Peck, Sun H., Kendra K. McKee, John W. Tobias, Neil R. Malhotra, Brian D. Harfe, and Lachlan J. Smith. 2017. “Whole Transcriptome Analysis of Notochord-Derived Cells during Embryonic Formation of the Nucleus Pulposus.” *Scientific Reports* 7 (1): 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10692-5.

Pelkmans, L, J Kartenback, and A Helenius. 2001. “Caveolar Endocytosis of Simian Virus 40 Reveals a Novel Two-Step Vesicular Transport Pathway to the ER.” *Nature Cell Biol* 3 (5): 473–83.

Perea-Gomez, Aitana, Francis D.J. Vella, William Shawlot, Mustapha Oulad-Abdelghani, Claire Chazaud, Chikara Meno, Veronique Pfister, et al. 2002. “Nodal Antaginists in the Anterior Visceral Endoderm Prevent the Formation of Multiple Primitive Streaks.” *Developmental Cell* 3 (5): 745–56. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00321-0.

Pfirrmann, Christian W.A., Alexander Metzdorf, Marco Zanetti, Juerg Hodler, and Norbert Boos. 2001. “Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration.” *Spine* 26 (17): 1873–78. https://doi.org/10.1097/00007632-200109010-00011.

Piccolo, S., S. Dupont, and M. Cordenonsi. 2014. “The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond.” *Physiological Reviews* 94 (4): 1287–1312. https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014.

Piprode, Vikrant, Sarthak Mohanty, Raffaella Bonavita, Sarah Loh, Rajakumar Anbazhagan, Chandan Saini, Robert Pinelli, Paul Pricop, and Chitra L. Dahia. 2020. “ An Optimized Step-by-step Protocol for Isolation of Nucleus Pulposus, Annulus Fibrosus, and End Plate Cells from the Mouse Intervertebral Discs and Subsequent Preparation of High-quality Intact Total RNA .” *Jor Spine* 3 (3): 1–14. https://doi.org/10.1002/jsp2.1108.

Pockert, Aneta J., Stephen M. Richardson, Christine L. Le Maitre, Malcolm Lyon, Jonathan A. Deakin, David J. Buttle, Anthony J. Freemont, and Judith A. Hoyland. 2009. “Modified Expression of the ADAMTS Enzymes and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 during Human Intervertebral Disc Degeneration.” *Arthritis and Rheumatism* 60 (2): 482–91. https://doi.org/10.1002/art.24291.

Pol, Albert, Robert Luetterforst, Margaret Lindsay, Sanna Heino, Elina Ikonen, and Robert G. Parton. 2001. “A Caveolin Dominant Negative Mutant Associates with Lipid Bodies and Induces Intracellular Cholesterol Imbalance.” *Journal of Cell Biology* 152 (5): 1057–70. https://doi.org/10.1083/jcb.152.5.1057.

Potier, E., S. de Vries, M. van Doeselaar, and K. Ito. 2014. “Potential Application of Notochordal Cells for Intervertebral Disc Regeneration: An in Vitro Assessment.” *European Cells and Materials* 28: 68–81. https://doi.org/10.22203/eCM.v028a06.

Potier, Esther, and Keita Ito. 2014. “Using Notochordal Cells of Developmental Origin to Stimulate Nucleus Pulposus Cells and Bone Marrow Stromal Cells for Intervertebral Disc Regeneration.” *European Spine Journal* 23 (3): 679–88. https://doi.org/10.1007/s00586-013-3107-86

Pratsinis, Harris, and Dimitris Kletsas. 2015. “Organotypic Cultures of Intervertebral Disc Cells: Responses to Growth Factors and Signaling Pathways Involved.” *BioMed Research International* 2015. https://doi.org/10.1155/2015/427138.

Purmessur, Devina, Clare C. Guterl, Samuel K. Cho, Marisa C. Cornejo, Ying W. Lam, Bryan A. Ballif, Damien M. Laudier, and James C. Iatridis. 2013. “Dynamic Pressurization Induces Transition of Notochordal Cells to a Mature Phenotype While Retaining Production of Important Patterning Ligands from Development.” *Arthritis Research and Therapy* 15 (5): R122. https://doi.org/10.1186/ar4302.

Purmessur, Devina, Schek R.M., Abbott R.D., Ballif B.A., Godburn K.E., and Iatridis J.C. 2011. “Notochordal Conditioned Media from Tissue Increases Proteoglycan Accumulation and Promotes a Healthy Nucleus Pulposus Phenotype in Human Mesenchymal Stem Cells.” *Arthritis ResearchandTherapy*13(3).http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L51456195%5Cnhttp://arthritisresearch.com/content/13/3/R81%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/ar3344%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=14786354&id=doi:10.1186/ar3344&ati.

Raj, P Prithvi. 2008. “Intervertebral Disc : Pathophysiology-Treatment” 8 (1): 18–44.

Rannou, François, Tzong Shyuan Lee, Rui Hai Zhou, Jennie Chin, Jeffrey C. Lotz, Marie Anne Mayoux-Benhamou, Jacques Patrick Barbet, Alain Chevrot, and John Y.J. Shyy. 2004. “Intervertebral Disc Degeneration: The Role of the Mitochondrial Pathway in Annulus Fibrosus Cell Apoptosis Induced by Overload.” *American Journal of Pathology* 164 (3): 915–24. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63179-3.

Raudenska, Martina, Jaromir Gumulec, Jan Balvan, and Michal Masarik. 2020. “Caveolin-1 in Oncogenic Metabolic Symbiosis.” *International Journal of Cancer* 147 (7): 1793–1807. https://doi.org/10.1002/ijc.32987.

Rausch, Valentina, Jonathan R. Bostrom, Jiwon Park, Isabel R. Bravo, Yi Feng, David C. Hay, Brian A. Link, and Carsten G. Hansen. 2019. “The Hippo Pathway Regulates Caveolae Expression and Mediates Flow Response via Caveolae.” *Current Biology* 29 (2): 242-255.e6. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.066.

Razani, B, J A Engelman, X B Wang, W Schubert, X L Zhang, C B Marks, F Macaluso, et al. 2001. “Caveolin-1 Null Mice Are Viable, but Show Evidence of Hyper- Proliferative and Vascular Abnormalities.” *J Biol Chem* 16 (718): 16. https://doi.org/10.1074/jbc.M105408200.

Razani, Babak, Terry P. Combs, Xiao Bo Wang, Philippe G. Frank, David S. Park, Robert G. Russell, Maomi Li, et al. 2002. “Caveolin-1-Deficient Mice Are Lean, Resistant to Diet-Induced Obesity, and Show Hypertriglyceridemia with Adipocyte Abnormalities.” *Journal of Biological Chemistry*

Regazzetti, Claire, Karine Dumas, Sandra Lacas-Gervais, Faustine Pastor, Pascal Peraldi, Stéphanie

Bonnafous, Isabelle Dugail, et al. 2015. “Hypoxia Inhibits Cavin-1 and Cavin-2 Expression and down-Regulates Caveolae in Adipocytes.” *Endocrinology* 156 (3): 789–801. https://doi.org/10.1210/en.2014-1656.

Repetto, Silvia, Massimo Bado, Paolo Broda, Giuseppe Lucania, Emiliana Masetti, Federica Sotgia, Ilaria Carbone, et al. 1999. “Increased Number of Caveolae and Caveolin-3 Overexpression in Duchenne Muscular Dystrophy.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261 (3): 547–50. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1055.

Ribes, Vanessa, and James Briscoe. 2009. “Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (2): 1–16. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002014.

Richardson, Stephen M., Francesca E. Ludwinski, Kanna K. Gnanalingham, Ross A. Atkinson, Anthony J. Freemont, and Judith A. Hoyland. 2017. “Notochordal and Nucleus Pulposus Marker Expression Is Maintained by Sub-Populations of Adult Human Nucleus Pulposus Cells through Aging and Degeneration.” *Scientific Reports* 7 (1): 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01567-w.

Rippe, Bengt, Bert Inge Rosengren, Ola Carlsson, and Daniele Venturoli. 2002. “Transendothelial Transport: The Vesicle Controversy.” *Journal of Vascular Research* 39 (5): 375–90. https://doi.org/10.1159/000064521.

Risbud, Makarand V., Asha Guttapalli, David G. Stokes, David Hawkins, Keith G. Danielson, Thomas P. Schaer, Todd J. Albert, and Irving M. Shapiro. 2006. “Nucleus Pulposus Cells Express HIF-1?? Under Normoxic Culture Conditions: A Metabolic Adaptation to the Intervertebral Disc Microenvironment.” *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (1): 152–59. https://doi.org/10.1002/jcb.20765.

Risbud, Makarand V., Ernestina Schipani, and Irving M. Shapiro. 2010. “Hypoxic Regulation of Nucleus Pulposus Cell Survival: From Niche to Notch.” *American Journal of Pathology* 176 (4): 1577–83. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090734.

Risbud, Makarand V., Zachary R. Schoepflin, Fackson Mwale, Rita A. Kandel, Sibylle Grad, James C. Iatridis, Daisuke Sakai, and Judith A. Hoyland. 2015. “Defining the Phenotype of Young Healthy Nucleus Pulposus Cells: Recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 Annual ORS Meeting.” *Journal of Orthopaedic Research* 33 (3): 283–93. https://doi.org/10.1002/jor.22789.

Risbud, Makarand V., and Irving M. Shapiro. 2014. “Role of Cytokines in Intervertebral Disc Degeneration: Pain and Disc Content.” *Nature Reviews Rheumatology* 10 (1): 44–56. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.160.

Rizzo, Victor, Christine Morton, Natacha DePaola, Jan E. Schnitzer, and Peter F. Davies. 2003. “Recruitment of Endothelial Caveolae into Mechanotransduction Pathways by Flow Conditioning in Vitro.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 285 (4 54-4): 1720–29. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00344.2002.

Roberts, S., E. H. Evans, D. Kletsas, D. C. Jaffray, and S. M. Eisenstein. 2006. “Senescence in Human Intervertebral Discs.” *European Spine Journal* 15 (SUPPL. 3): 312–16. https://doi.org/10.1007/s00586-006-0126-8.

Roberts, S., J. Menage, V. Duance, S. Wotton, and S. Ayad. 1991. “1991 Volvo Award in Basic Sciences: Collagen Types around the Cells of the Intervertebral Disc and Cartilage End Plate: An Immunolocalization Study.” *Spine*. https://doi.org/10.1097/00007632-199109000-00003.

Roberts, Sally, Jill P.G. Urban, Helena Evans, and Stephen M. Eisenstein. 1996. “Transport Properties of the Human Cartilage Endplate in Relation to Its Composition and Calcification.” *Spine*.

https://doi.org/10.1097/00007632-199602150-00003.

Roberts, BSc, PhD, J. MENAGE, and PhD J.P.G. URBAN, BSc. 1989. “Biochemical and Structural Properties of the Cartilage End-Plate and Its Relation to the IVD.” *Spine*.

Rodrigo, Isabel, Robert E. Hill, Rudi Balling, Andrea Münsterberg, and Kenji Imai. 2003. “Pax1 and Pax9 Activate Bapx1 to Induce Chondrogenic Differentation in the Sclerotome.” *Development* 130 (3): 473–82. https://doi.org/10.1242/dev.00240.

Rohde, Manfred, Ellruth Müller, Gursharan S. Chhatwal, and Susanne R. Talay. 2003. “Host Cell Caveolae Act as an Entry-Port for Group A Streptococci.” *Cellular Microbiology* 5 (5): 323–42. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00279.x.

Rothberg, K G, J E Heuser, W C Donzell, Y S Ying, J R Glenney, and R G W Anderson. 1992. “Caveolin, a Protein-Component of Caveolae Membrane Coats.” *Cell* 68 (4): 673–82. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90143-Z.

Rouhani, Foad, Natsuhiko Kumasaka, Miguel Cardoso de Brito, Allan Bradley, Ludovic Vallier, and Daniel Gaffney. 2014. “Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *PLoS Genetics* 10 (6). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004432.

Rufai, A., M. Benjamin, and J. R. Ralphs. 1995. “The Development of Fibrocartilage in the Rat Intervertebral Disc.” *Anatomy and Embryology* 192 (1): 53–62. https://doi.org/10.1007/BF00186991.

Sadowska, A., T. Kameda, O. Krupkova, and Karin Wuertz-Kozak. 2018. “Osmosensi Ng, Osmosi Gnalli Ng and i Nflammati on: How i Ntervertebral Di Sc Cells Respond to Altered Osmolari Ty.” *European Cells and Materials* 36: 231–50. https://doi.org/10.22203/eCM.v036a17.

Sakai, Daisuke, and Gunnar B.J. Andersson. 2015. “Stem Cell Therapy for Intervertebral Disc Regeneration: Obstacles and Solutions.” *Nature Reviews Rheumatology* 11 (4): 243–56. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.13.

Sakai, Daisuke, Joji Mochida, Yukihiro Yamamoto, Takeshi Nomura, Masahiko Okuma, Kazuhiro Nishimura, Tomoko Nakai, Kiyoshi Ando, and Tomomitsu Hotta. 2003. “Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Embedded in Atelocollagen® Gel to the Intervertebral Disc: A Potential Therapeutic Model for Disc Degeneration.” *Biomaterials* 24 (20): 3531–41. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00222-9.

Sakai, Daisuke, Yoshihiko Nakamura, Tomoko Nakai, Taishi Mishima, Shunichi Kato, Sibylle Grad, Mauro Alini, et al. 2012. “Exhaustion of Nucleus Pulposus Progenitor Cells with Ageing and Degeneration of the Intervertebral Disc.” *Nature Communications* 3 (May). https://doi.org/10.1038/ncomms2226.

Sakai, Daisuke, Jordy Schol, Frances C. Bach, Adel Tekari, Nobuho Sagawa, Yoshihiko Nakamura, Samantha C.W. Chan, et al. 2018. “Successful Fishing for Nucleus Pulposus Progenitor Cells of the Intervertebral Disc across Species.” *Jor Spine* 1 (2): e1018. https://doi.org/10.1002/jsp2.1018.

Salem, Ahmed F., Gloria Bonuccelli, Generoso Bevilacqua, Hwyda Arafat, Richard G. Pestell, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. 2011. “Caveolin-1 Promotes Pancreatic Cancer Cell Differentiation and Restores Membranous E-Cadherin via Suppression of the Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Cell Cycle* 10 (21): 3692–3700. https://doi.org/10.4161/cc.10.21.17895.

Sanguinetti, Amy R., and Cynthia Corley Mastick. 2003. “C-Abl Is Required for Oxidative Stress-Induced Phosphorylation of Caveolin-1 on Tyrosine 14.” *Cellular Signalling* 15 (3): 289–98. https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00090-6.

Sasaki, Hiroshi, Chi Chung Hui, Masato Nakafuku, and Hisato Kondoh. 1997. “A Binding Site for Gli Proteins Is Essential for HNF-3β Floor Plate Enhancer Activity in Transgenics and Can Respond to Shh in Vitro.” *Development* 124 (7): 1313–22.

Scherer, Philipp E., Michael P. Lisanti, Giulia Baldini, Massimo Sargiacomo, Cynthia Corley Mastick, and Harvey F. Lodish. 1994. “Induction of Caveolin during Adipogenesis and Association of GLUT4 with Caveolin-Rich Vesicles.” *Journal of Cell Biology* 127 (5): 1233–43. https://doi.org/10.1083/jcb.127.5.1233.

Scherer, Philipp E, Y Lewis, Daniela Volonte, Jeffrey A Engelman, Ferruccio Galbiati, Jacques Couet, D Stave Kohtz, Elly Van Donselaar, Peter Peters, and Michael P Lisanti. 1997. “Cell-Type and Tissue-Specific Expression of Caveolin-2” 272 (46): 29337–46.

Schmitz, Tara C., Elias Salzer, João F. Crispim, Georgina Targa Fabra, Catherine LeVisage, Abhay Pandit, Marianna Tryfonidou, Christine Le Maitre, and Keita Ito. 2020. “Characterization of Biomaterials Intended for Use in the Nucleus Pulposus of Degenerated Intervertebral Discs.” *Acta Biomaterialia* 114: 1–15. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.08.001.

Schou, K. B., L. B. Pedersen, and S. T. Christensen. 2015. “Ins and Outs of GPCR Signaling in Primary Cilia.” *EMBO Reports* 16 (9): 1099–1113. https://doi.org/10.15252/embr.201540530.

Schwartz, RS, and F Hildebrandt. 2011. “Ciliopathies.” *New England Journal …* 364 (16): 1533–43. https://doi.org/10.1056/NEJMra1010172.Ciliopathies.

Sedding, Daniel G., Jennifer Hermsen, Ulrike Seay, Oliver Eickelberg, Wolfgang Kummer, Carsten Schwencke, Ruth H. Strasser, Harald Tillmanns, and Ruediger C. Braun-Dullaeus. 2005. “Caveolin-1 Facilitates Mechanosensitive Protein Kinase B (Akt) Signaling in Vitro and in Vivo.” *Circulation Research* 96 (6): 635–42. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000160610.61306.0f.

Seki, Shoji, Yumiko Asanuma-Abe, Koichi Masuda, Yoshiharu Kawaguchi, Kunihiro Asanuma, Carol Muehleman, Akiko Iwai, and Tomoatsu Kimura. 2009. “Effect of Small Interference RNA (SiRNA) for ADAMTS5 on Intervertebral Disc Degeneration in the Rabbit Anular Needle-Puncture Model.” *Arthritis Research and Therapy* 11 (6): 1–10. https://doi.org/10.1186/ar2851.

Senju, Yosuke, Yuzuru Itoh, Kazunori Takano, Sayaka Hamada, and Shiro Suetsugu. 2011. “Essential Role of PACSIN2/Syndapin-II in Caveolae Membrane Sculpting.” *Journal of Cell Science* 124 (12): 2032–40. https://doi.org/10.1242/jcs.086264.

Shapiro, Irving M., Robert Layfield, Martin Lotz, Carmine Settembre, and Caroline Whitehouse. 2014. “Boning up on Autophagy :The Role of Autophagy in Skeletal Biology.” *Autophagy* 10 (1): 7–19. https://doi.org/10.4161/auto.26679.

Shaul, Philip W., Eric J. Smart, Lisa J. Robinson, Zohre German, Ivan S. Yuhanna, Yunshu Ying, Richard G.W. Anderson, and Thomas Michel. 1996. “Acylation Targets Endothelial Nitric-Oxide Synthase to Plasmalemmal Caveolae.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (11): 6518–22. https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6518.

Shi, Yang, Kirkwood A. Pritchard, Patricia Holman, Parvaneh Rafiee, Owen W. Griffith, B. Kalyanaraman, and John E. Baker. 2000. “Chronic Myocardial Hypoxia Increases Nitric Oxide Synthase and Decreases Caveolin-3.” *Free Radical Biology and Medicine* 29 (8): 695–703. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00364-6.

Shirazi-Adl, A., M. Taheri, and J. P.G. Urban. 2010. “Analysis of Cell Viability in Intervertebral Disc: Effect of Endplate Permeability on Cell Population.” *Journal of Biomechanics* 43 (7): 1330–36. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.01.023.

Shvets, Elena, Vassilis Bitsikas, Gillian Howard, Carsten Gram Hansen, and Benjamin J. Nichols. 2015.

"Dynamic Caveolae Exclude Bulk Membrane Proteins and Are Required for Sorting of Excess Glycosphingolipids." *Nature Communications* 6. https://doi.org/10.1038/ncomms7867.

Singh, Vibha, and Christophe Lamaze. 2020. "Membrane Tension Buffering by Caveolae: A Role in Cancer?" *Cancer and Metastasis Reviews* 39 (2): 505–17. https://doi.org/10.1007/s10555-020-09899-2.

Sinha, Bidisha, Darius Köster, Richard Ruez, Pauline Gonnord, Michele Bastiani, Daniel Abankwa, Radu V. Stan, et al. 2011. "Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae." *Cell* 144 (3): 402–13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031.

Sloan, Erica K., Daniel R. Ciocca, Normand Pouliot, Anthony Natoli, Christina Restall, Michael A. Henderson, Mariel A. Fanelli, Fernando D. Cuello-Carrión, Francisco E. Gago, and Robin L. Anderson. 2009. "Stromal Cell Expression of Caveolin-1 Predicts Outcome in Breast Cancer." *American Journal of Pathology* 174 (6): 2035–43. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080924.

Smart, Eric J., Yun Shu Ying, Patricia A. Conrad, and Richard G W Anderson. 1994. "Caveolin Moves from Caveolae to the Golgi Apparatus in Response to Cholesterol Oxidation." *Journal of Cell Biology* 127 (5): 1185–97. https://doi.org/10.1083/jcb.127.5.1185.

Smith, Lachlan J., Nandan L. Nerurkar, Kyung Suk Choi, Brian D. Harfe, and Dawn M. Elliott. 2011. "Degeneration and Regeneration of the Intervertebral Disc: Lessons from Development." *DMM Disease Models and Mechanisms* 4 (1): 31–41. https://doi.org/10.1242/dmm.006403.

Smits, Patrick, and Véronique Lefebvre. 2003. "Sox5 and Sox6 Are Required for Notochord Extracellular Matrix Sheath Formation, Notochord Cell Survival and Development of the Nucleus Pulposus of Intervertebral Discs." *Development* 130 (6): 1135–48. https://doi.org/10.1242/dev.00331.

Smolders, Lucas A., Björn P. Meij, David Onis, Frank M. Riemers, Niklas Bergknut, Richard Wubbolts, Guy C.M. Grinwis, et al. 2013. "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 Research and Therapy* 15 (1): 1–19. https://doi.org/10.1186/ar4157.

Smolders, Lucas A., Björn P. Meij, Frank M. Riemers, Ruud Licht, Richard Wubbolts, Douwe Heuvel, Guy C.M. Grinwis, et al. 2012. "Canonical Wnt Signaling in the Notochordal Cell Is Upregulated in Early Intervertebral Disk Degeneration." *Journal of Orthopaedic Research* 30 (6): 950–57. https://doi.org/10.1002/jor.22000.

Snuggs, Joseph W., Rebecca E. Day, Frances C. Bach, Matthew T. Conner, Rowena A. D. Bunning, Marianna A. Tryfonidou, and Christine L. Le Maitre. 2019. "Aquaporin Expression in the Human and Canine Intervertebral Disc during Maturation and Degeneration." *Jor Spine* 2 (1): 1–12. https://doi.org/10.1002/jsp2.1049.

Song, K S, P E Scherer, Z Tang, T Okamoto, S Li, M Chafel, C Chu, D S Kohtz, and M P Lisanti. 1996. "Expression of Caveolin-3 in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (25): 15160–65. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663016.

St-Jacques, Benoit, Matthias Hammerschmidt, and Andrew P. McMahon. 1999. "Indian Hedgehog Signaling Regulates Proliferation and Differentiation of Chondrocytes and Is Essential for Bone Formation." *Genes and Development* 13 (16): 2072–86. https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2072.

Stafford, David A., Lisa J. Brunet, Mustafa K. Khokha, Aris N. Economides, and Richard M. Harland. 2011. "Cooperative Activity of Noggin and Gremlin 1 in Axial Skeleton Development." *Development* 138 (5): 1005–14. https://doi.org/10.1242/dev.051938.

Stafford, David A., Stefanie D. Monica, and Richard M. Harland. 2014. "Follistatin Interacts with Noggin in the Development of the Axial Skeleton." *Mechanisms of Development* 131 (1): 78–85.

https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.10.001.

Stang, E, J Kartenbeck, and R G Parton. 1997. “Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Mediate Association of SV40 with Caveolae.” *Molecular Biology of the Cell* 8 (1): 47–57.

Stemple, Derek L. 2005. “Structure and Function of the Notochord: An Essential Organ for Chordate Development.” *Development* 132 (11): 2503–12. https://doi.org/10.1242/dev.01812.

Stoeber, Miriam, Ina Karen Stoeck, Christine HéCurrency Signnni, Christopher Karl Ernst Bleck, Giuseppe Balistreri, and Ari Helenius. 2012. “Oligomers of the ATPase EHD2 Confine Caveolae to the Plasma Membrane through Association with Actin.” *EMBO Journal* 31 (10): 2350–64. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.98.

Stoyanov, J. V., B. Gantenbein-Ritter, A. Bertolo, N. Aebli, M. Baur, M. Alini, and S. Grad. 2011. “Role of Hypoxia and Growth and Differentiation Factor-5 on Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells towards Intervertebral Nucleus Pulposus-like Cells.” *European Cells and Materials* 21: 533–47. https://doi.org/10.22203/eCM.v021a40.

Strassburg, Sandra, Stephen M. Richardson, Anthony J. Freemont, and Judith A. Hoyland. 2010. “Co-Culture Induces Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Modulation of the Degenerate Human Nucleus Pulposus Cell Phenotype.” *Regenerative Medicine* 5 (5): 701–11. https://doi.org/10.2217/rme.10.59.

T Videman 1 , J Leppävuori, J Kaprio, M C Battié, L E Gibbons, L Peltonen, M Koskenvuo. 1998. “Intragenic Polymorphisms of the Vitamin D Receptor Gene Associated with Intervertebral Disc Degeneration.” *Spine*. https://doi.org/10.1097/00007632-199912010-00002.

Tachikawa, Masashi, Nobuhiro Morone, Yosuke Senju, Tadao Sugiura, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Atsushi Mochizuki, and Shiro Suetsugu. 2017. “Measurement of Caveolin-1 Densities in the Cell Membrane for Quantification of Caveolar Deformation after Exposure to Hypotonic Membrane Tension.” *Scientific Reports* 7 (1): 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08259-5.

Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.” *Cell* 131 (5): 861–72. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019.

Takatalo, Jani, Jaro Karppinen, Jaakko Niinimäki, Simo Taimela, Simo Näyhä, Pertti Mutanen, Roberto Blanco Sequeiros, Eero Kyllönen, and Osmo Tervonen. 2011. “Does Lumbar Disc Degeneration on Magnetic Resonance Imaging Associate with Low Back Symptom Severity in Young Finnish Adults?” *Spine* 36 (25): 2180–89. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182077122.

Takeoka, Yoshiki, Takashi Yurube, and Kotaro Nishida. 2020. “Gene Therapy Approach for Intervertebral Disc Degeneration: An Update.” *Neurospine* 17 (1): 3–14. https://doi.org/10.14245/ns.2040042.021.

Tang, Ruhang, Liufang Jing, Vincent P. Willard, Chia Lung Wu, Farshid Guilak, Jun Chen, and Lori A. Setton. 2018. “Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Nucleus Pulposus-like Cells.” *Stem Cell Research and Therapy* 9 (1): 1–12. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0797-1.

Tang, Zehan, Bo Hu, Fazhi Zang, Jianxi Wang, Xingda Zhang, and Huajiang Chen. 2019. “Nrf2 Drives Oxidative Stress-Induced Autophagy in Nucleus Pulposus Cells via a Keap1/Nrf2/P62 Feedback Loop to Protect Intervertebral Disc from Degeneration.” *Cell Death and Disease* 10 (7). https://doi.org/10.1038/s41419-019-1701-3.

Tavakoli, Javad, Dawn M. Elliott, and John J. Costi. 2016. “Structure and Mechanical Function of the Inter-Lamellar Matrix of the Annulus Fibrosus in the Disc.” *Journal of Orthopaedic Research* 34 (8): 1307–15. https://doi.org/10.1002/jor.23306.

Tessier, Steven, Victoria A. Tran, Olivia K. Ottone, Emanuel J. Novais, Alexandra Doolittle, Michael J. DiMuzio, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2020. "TonEBP-Deficiency Accelerates Intervertebral Disc Degeneration Underscored by Matrix Remodeling, Cytoskeletal Rearrangements, and Changes in Proinflammatory Gene Expression." *Matrix Biology* 87: 94–111. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.10.007.

Torrino, Stéphanie, Wei Shen, Cédric M. Blouin, Satish Kailasam Mani, Christine Viaris de Lesegno, Pierre Bost, Alexandre Grassart, et al. 2018. "EHD2 Is a Mechanotransducer Connecting Caveolae Dynamics with Gene Transcription." *Journal of Cell Biology* 217 (12): 4092–4105. https://doi.org/10.1083/jcb.201801122.

Totta, Pierangela, Fabio Gionfra, Claudia Busonero, and Filippo Acconcia. 2016. "Modulation of 17β-Estradiol Signaling on Cellular Proliferation by Caveolin-2." *Journal of Cellular Physiology* 231 (6): 1219–25. https://doi.org/10.1002/jcp.25218.

Tran, Cassie M., Zachary R. Schoepflin, Dessislava Z. Markova, Christopher K. Kepler, D. Greg Anderson, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2014. "CCN2 Suppresses Catabolic Effects of Interleukin-1?? Through ??5??1 and ??V??3 Integrins in Nucleus Pulposus Cells: Implications in Intervertebral Disc Degeneration." *Journal of Biological Chemistry* 289 (11): 7374–87. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.526111.

Tran, Cassie M., Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2013. "Molecular Regulation of CCN2 in the Intervertebral Disc: Lessons Learned from Other Connective Tissues." *Matrix Biology* 32 (6): 298–306. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.03.006.

Trayhurn, Paul. 2013. "Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity." *Physiological Reviews* 93 (1): 1–21. https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012.

Trigatti, Bernardo L., Richard G.W. Anderson, and Gerhard E. Gerber. 1999. "Identification of Caveolin-1 as a Fatty Acid Binding Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255 (1): 34–39. https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.0123.

Trushina, Eugenia, Jordan Du Charme, Joseph Parisi, and Cynthia T. McMurray. 2006. "Neurological Abnormalities in Caveolin-1 Knock out Mice." *Behavioural Brain Research* 172 (1): 24–32. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.04.024.

Uetzmann, Lena, Ingo Burtscher, and Heiko Lickert. 2008. "A Mouse Line Expressing Foxa2-Driven Cre Recombinase in Node, Notochord, Floorplate, and Endoderm." *Genesis* 46 (10): 515–22. https://doi.org/10.1002/dvg.20410.

URBAN, J. P. G., S. HOLM, A. MAROUDAS, and A. NACHEMSON. 1982. "Nutrition of the Intervertebral Disc." *Clinical Orthopaedics and Related Research* NA; (170): 296???302. https://doi.org/10.1097/00003086-198210000-00039.

Urban, Jill P.G., and Sally Roberts. 2003. "Degeneration of the Intervertebral Disc." *Arthritis Research and Therapy* 5 (3): 120–30. https://doi.org/10.1186/ar629.

Vallier, Ludovic, Thomas Touboul, Stephanie Brown, Candy Cho, Bilada Bilican, Morgan Alexander, Jessica Cedervall, et al. 2009. "Signaling Pathways Controlling Pluripotency and Early Cell Fate Decisions of Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells* 27 (11): 2655–66. https://doi.org/10.1002/stem.199.

Varela-Guruceaga, Maider, Elise Belaidi, Lucie Lebeau, Ella Aka, Ramaroson Andriantsitohaina, Sophie Giorgetti-Peraldi, Claire Arnaud, and Soazig Le Lay. 2020. "Intermittent Hypoxia Mediates Caveolae Disassembly That Parallels Insulin Resistance Development." *Frontiers in Physiology* 11 (November): 1–7. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.565486.

Vasile, E., M. Simionescu, and N. Simionescu. 1983. “Visualization of the Binding, Endocytosis, and Transcytosis of Low-Density Lipoprotein in the Arterial Endothelium in Situ.” *Journal of Cell Biology* 96 (6): 1677–89. https://doi.org/10.1083/jcb.96.6.1677.

Vergroesen, P. P.A., I. Kingma, K. S. Emanuel, R. J.W. Hoogendoorn, T. J. Welting, B. J. van Royen, J. H. van Dieën, and T. H. Smit. 2015. “Mechanics and Biology in Intervertebral Disc Degeneration: A Vicious Circle.” *Osteoarthritis and Cartilage* 23 (7): 1057–70. https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.028.

Vinten, J., A. H. Johnsen, P. Roepstorff, J. Harpøth, and J. Tranum-Jensen. 2005. “Identification of a Major Protein on the Cytosolic Face of Caveolae.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1717 (1): 34–40. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.013.

Vinten, J., M. Voldstedlund, H. Clausen, K. Christiansen, J. Carlsen, and J. Tranum-Jensen. 2001. “A 60-KDa Protein Abundant in Adipocyte Caveolae.” *Cell and Tissue Research* 305 (1): 99–106. https://doi.org/10.1007/s004410100389.

Voldstedlund, M., J. Vinten, and J. Tranum-Jensen. 2001. “Cav-P60 Expression in Rat Muscle Tissues: Distribution of Caveolar Proteins.” *Cell and Tissue Research* 306 (2): 265–76. https://doi.org/10.1007/s004410100439.

Wagner, J., C. Schmidt, W. Nikowits, and B. Christ. 2000. “Compartmentalization of the Somite and Myogenesis in Chick Embryos Are Influenced by Wnt Expression.” *Developmental Biology* 228 (1): 86–94. https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9921.

Wallach, Corey J., Satoshi Sobajima, Yasuhiko Watanabe, Joseph S. Kim, Helga I. Georgescu, Paul Robbins, Lars G. Gilbertson, and James D. Kang. 2003. “Gene Transfer of the Catabolic Inhibitor TIMP-1 Increases Mesured Proteoglycans in Cells from Degenerated Human Intervertebral Discs.” *Spine* 28 (20): 2331–37. https://doi.org/10.1097/01.BRS.0000085303.67942.94.

Wallin, Johan, Jörg Wilting, Haruhiko Koseki, Rüdiger Fritsch, Bodo Christ, and Rudi Balling. 1994. “The Role of Pax-1 in Axial Skeleton Development.” *Development* 120 (5): 1109–21.

Wang, Feng, Zeng Xin Gao, Feng Cai, Arjun Sinkemani, Zhi Yang Xie, Rui Shi, Ji Nan Wei, and Xiao Tao Wu. 2017. “Formation, Function, and Exhaustion of Notochordal Cytoplasmic Vacuoles within Intervertebral Disc: Current Understanding and Speculation.” *Oncotarget* 8 (34): 57800–812. https://doi.org/10.18632/oncotarget.18101.

Wang, Jean Y., Anthony E. Baer, Virginia B. Kraus, and Lori A. Setton. 2001. “Intervertebral Disc Cells Exhibit Differences in Gene Expression in Alginate and Monolayer Culture.” *Spine* 26 (16): 1747–52. https://doi.org/10.1097/00007632-200108150-00003.

Wang, Jianxi, Huajiang Chen, Peng Cao, Xiaodong Wu, Fazhi Zang, Liangyu Shi, Lei Liang, and Wen Yuan. 2016. “Inflammatory Cytokines Induce Caveolin-1/β-Catenin Signalling in Rat Nucleus Pulposus Cell Apoptosis through the P38 MAPK Pathway.” *Cell Proliferation* 49 (3): 362–72. https://doi.org/10.1111/cpr.12254.

Wang, Meina, Dezhi Tang, Bing Shu, Baoli Wang, Hongting Jin, Suyang Hao, Karen A. Dresser, et al. 2012. “Conditional Activation of β-Catenin Signaling in Mice Leads to Severe Defects in Intervertebral Disc Tissue.” *Arthritis and Rheumatism* 64 (8): 2611–23. https://doi.org/10.1002/art.34469.

Wang, Yi Xiang J. 2017. “Menopause as a Potential Cause for Higher Prevalence of Low Back Pain in Women than in Age-Matched Men.” *Journal of Orthopaedic Translation* 8: 1–4. https://doi.org/10.1016/j.jot.2016.05.012.

Weiler, Christoph, Andreas G. Nerlich, Beatrice E. Bachmeier, and Norbert Boos. 2005. “Expression and

Distribution of Tumor Necrosis Factor Alpha in Human Lumbar Intervertebral Discs: A Study in Surgical Specimen and Autopsy Controls." *Spine* 30 (1): 44–53. https://doi.org/10.1097/01.brs.0000149186.63457.20.

Whatley, Benjamin R., and Xuejun Wen. 2012. "Intervertebral Disc (IVD): Structure, Degeneration, Repair and Regeneration." *Materials Science and Engineering C* 32 (2): 61–77. https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.10.011.

Wijgerde, Mark, Marja Ooms, Jos W. Hoogerbrugge, and J. Anton Grootegoed. 2005. "Hedgehog Signaling in Mouse Ovary: Indian Hedgehog and Desert Hedgehog from Granulosa Cells Induce Target Gene Expression in Developing Theca Cells." *Endocrinology* 146 (8): 3558–66. https://doi.org/10.1210/en.2005-0311.

Wilke, H.J., P. Neef, M. Caimi, T. Hoogland, and L.E. Claes. 1999. "New In-Vivo Measurements of Pressures in Disc in Daily." *Spine*.

Wilkinson, David G, Sangita Bhatt, and Bernhard G Herrmann. 1990. "Expression Pattern of the Mouse T Gene and Its Role in Mesoderm Formation" 343 (February): 1988–90. https://doi.org/10.1038/343657a0.

Willaredt, Marc August, Evangelia Tasouri, and Kerry L. Tucker. 2013. "Primary Cilia and Forebrain Development." *Mechanisms of Development* 130 (6–8): 373–80. https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.10.003.

Williams, Maynard M., John A. Hawley, Robin A. McKenzie, and Paula M. Van Wijmen. 1991. "A Comparison of the Effects of Two Sitting Postures on Back and Referred Pain." *Spine*. https://doi.org/10.1097/00007632-199110000-00010.

Wilting, Jörg, Cecilia Ebensperger, Thomas S. Müller, Haruhiko Koseki, Johan Wallin, and Bodo Christ. 1995. "Pax-1 in the Development of the Cervico-Occipital Transitional Zone." *Anatomy and Embryology* 192 (3): 221–27. https://doi.org/10.1007/BF00184746.

Winkler, Tamara, Eric J. Mahoney, Debora Sinner, Christopher C. Wylie, and Chitra Lekha Dahia. 2014. "Wnt Signaling Activates Shh Signaling in Early Postnatal Intervertebral Discs, and Re-Activates Shh Signaling in Old Discs in the Mouse." *PLoS ONE* 9 (6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098444.

Wise, David R., Patrick S. Ward, Jessica E.S. Shay, Justin R. Cross, Joshua J. Gruber, Uma M. Sachdeva, Jesse M. Platt, Raymond G. DeMatteo, M. Celeste Simon, and Craig B. Thompson. 2011. "Hypoxia Promotes Isocitrate Dehydrogenasedependent Carboxylation of α-Ketoglutarate to Citrate to Support Cell Growth and Viability." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (49): 19611–16. https://doi.org/10.1073/pnas.1117773108.

Witkiewicz, Agnieszka K., Abhijit Dasgupta, Federica Sotgia, Isabelle Mercier, Richard G. Pestell, Michael Sabel, Celina G. Kleer, Jonathan R. Brody, and Michael P. Lisanti. 2009. "An Absence of Stromal Caveolin-1 Expression Predicts Early Tumor Recurrence and Poor Clinical Outcome in Human Breast Cancers." *American Journal of Pathology* 174 (6): 2023–34. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080873.

Wu, Karen N., Maria Queenan, Jonathan R. Brody, Magdalena Potoczek, Federica Sotgia, Michael P. Lisanti, and Agnieszka K. Witkiewicz. 2011. "Loss of Stromal Caveolin-1 Expression in Malignant Melanoma Metastases Predicts Poor Survival." *Cell Cycle* 10 (24): 4250–55. https://doi.org/10.4161/cc.10.24.18551.

Yamada, Toshiya, Samuel L. Pfaff, Thomas Edlund, and Thomas M. Jessell. 1993. "Control of Cell Pattern in the Neural Tube: Motor Neuron Induction by Diffusible Factors from Notochord and Floor Plate." *Cell* 73 (4): 673–86. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90248-O.

Yamamoto, Manabu, Yoshiyuki Toya, Michael P Lisanti, G Martin, Yoshihiro Ishikawa, Carsten Schwencke, and Martin G Myers. 1998. "CELL BIOLOGY AND METABOLISM : Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling *." *Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26962–68.

Yamamoto, Tatsuya, Satoshi Suzuki, Takeshi Fujii, Yuichiro Mima, Kota Watanabe, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, and Nobuyuki Fujita. 2020. "Efficacy of Hyaluronic Acid on Intervertebral Disc Inflammation: An in Vitro Study Using Notochordal Cell Lines and Human Disc Cells." *Journal of Orthopaedic Research*, no. May. https://doi.org/10.1002/jor.24933.

Yamanaka, Yojiro, Owen J. Tamplin, Anja Beckers, Achim Gossler, and Janet Rossant. 2007. "Live Imaging and Genetic Analysis of Mouse Notochord Formation Reveals Regional Morphogenetic Mechanisms." *Developmental Cell* 13 (6): 884–96. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.016.

Yang, Shu Hua, Chang Chin Wu, Tiffany Ting Fang Shih, Yuan Hui Sun, and Feng Huei Lin. 2008. "In Vitro Study on Interaction between Human Nucleus Pulposus Cells and Mesenchymal Stem Cells through Paracrine Stimulation." *Spine* 33 (18): 1951–57. https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31817e6974.

Ye, Wei, Kang Xu, Dongsheng Huang, Anjing Liang, Yan Peng, Weirong Zhu, and Chunhai Li. 2011. "Age-Related Increases of Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy in Rat Nucleus Pulposus." *Connective Tissue Research* 52 (6): 472–78. https://doi.org/10.3109/03008207.2011.564336.

Yeow, Ivana, Gillian Howard, Jessica Chadwick, Carolina Mendoza-Topaz, Carsten G. Hansen, Benjamin J. Nichols, and Elena Shvets. 2017. "EHD Proteins Cooperate to Generate Caveolar Clusters and to Maintain Caveolae during Repeated Mechanical Stress." *Current Biology* 27 (19): 2951-2962.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.047.

Zhang, Yuelin, Zhao Zhang, Peikai Chen, Chui Yan Ma, Cheng Li, Tiffany Y.K. Au, Vivian Tam, et al. 2020. "Directed Differentiation of Notochord-like and Nucleus Pulposus-like Cells Using Human Pluripotent Stem Cells." *Cell Reports* 30 (8): 2791-2806.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.100.

Zhao, Bin, Li Li, Qunying Lei, and Kun Liang Guan. 2010. "The Hippo-YAP Pathway in Organ Size Control and Tumorigenesis: An Updated Version." *Genes and Development* 24 (9): 862–74. https://doi.org/10.1101/gad.1909210.

Zhao, Bin, Xiaomu Wei, Weiquan Li, Ryan S. Udan, Qian Yang, Joungmok Kim, Joe Xie, et al. 2007. "Inactivation of YAP Oncoprotein by the Hippo Pathway Is Involved in Cell Contact Inhibition and Tissue Growth Control." *Genes and Development* 21 (21): 2747–61. https://doi.org/10.1101/gad.1602907.

Zhao, Xianda, Yuyu He, Jun Gao, Lifang Fan, Zonghuan Li, Guifang Yang, and Honglei Chen. 2013. "Caveolin-1 Expression Level in Cancer Associated Fibroblasts Predicts Outcome in Gastric Cancer." *PLoS ONE* 8 (3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059102.

Zhao, You Yang, Yang Liu, Radu Virgil Stan, Lian Fan, Yusu Gu, Nancy Dalton, Po Hsien Chu, Kirk Peterson, John Ross, and Kenneth R. Chien. 2002. "Defects in Caveolin-1 Cause Dilated Cardiomyopathy and Pulmonary Hypertension in Knockout Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (17): 11375–80. https://doi.org/10.1073/pnas.172360799.

Zheng, Liwei, Yong Cao, Shuangfei Ni, Huabin Qi, Zemin Ling, Xin Xu, Xuenong Zou, et al. 2018. "Ciliary Parathyroid Hormone Signaling Activates Transforming Growth Factor-β to Maintain Intervertebral Disc Homeostasis during Aging." *Bone Research* 6 (1). https://doi.org/10.1038/s41413-018-0022-y.

Zhongyi, Sun, Zhao Sai, Liu Chao, and Tian Jiwei. 2015. “Effects of Nuclear Factor Kappa B Signaling Pathway in Human Intervertebral Disc Degeneration.” *Spine* 40 (4): 224–32. https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000000733.

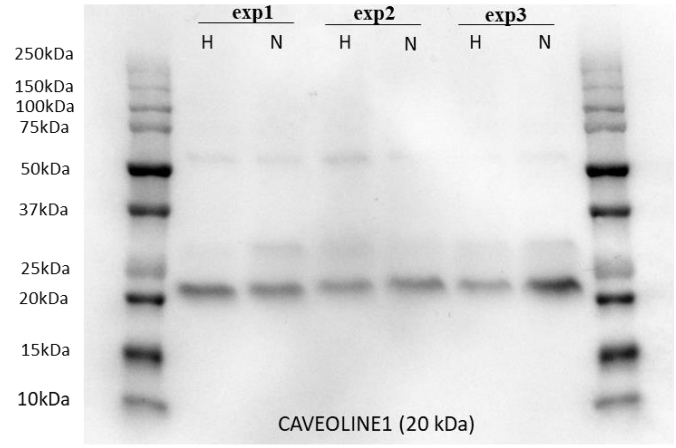
Zhou, Xiaoya, Lili Chen, Sibylle Grad, Mauro Alini, Haobo Pan, Dazhi Yang, Wanxin Zhen, Zhizhong Li, Shishu Huang, and Songlin Peng. 2017. “The Roles and Perspectives of MicroRNAs as Biomarkers for Intervertebral Disc Degeneration.” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11 (12): 3481–87. https://doi.org/10.1002/term.2261.

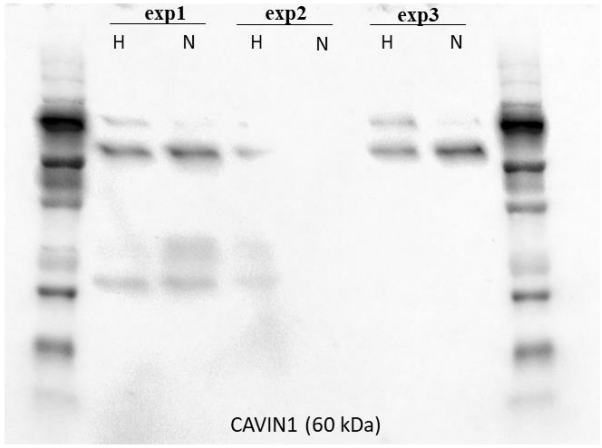
Zhu, Jianjian, Kin Ming Kwan, and Susan Mackem. 2016. “Putative Oncogene Brachyury (T) Is Essential to Specify Cell Fate but Dispensable for Notochord Progenitor Proliferation and EMT.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (14): 3820–25. https://doi.org/10.1073/pnas.1601252113.

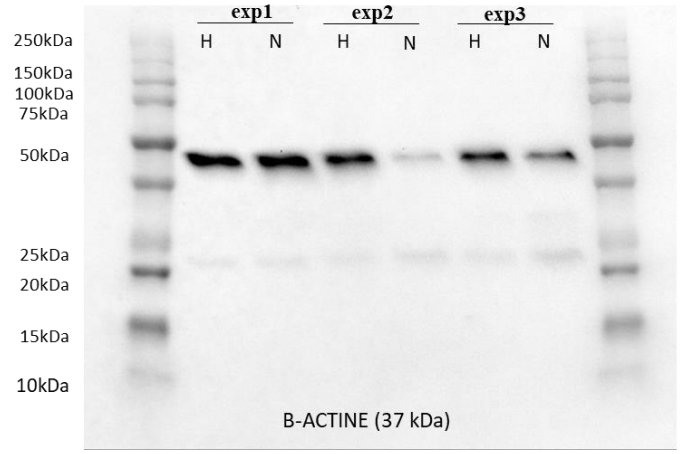
ANNEXES

Annexe 1 : Membranes de western blot réalisés à partir des explants de cellules de NP (P4)

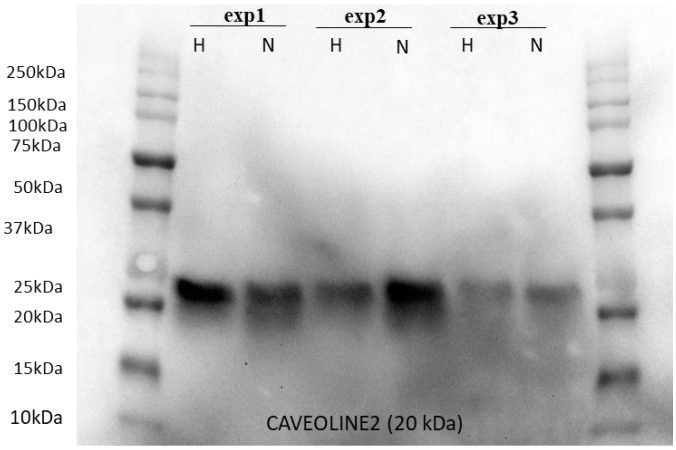
Membrane 1

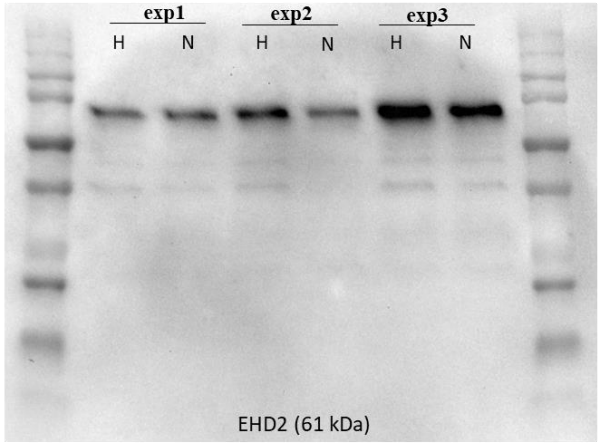






Membrane 2





Annexe 2 : Liste des formations suivies auprès de l'école doctorale Biologie-Santé

samedi 24 avril 2021

UNIVERSITÉ DE NANTES

Attestation de Formation

PAILLAT LILY
6 rue jussieu
fief des plantes
85700 POUZAUGES

N° étudiant : 140337Q
Ecole Doctorale : Biologie-Santé UBL
Etablissement : Université de Nantes

Formation Professionnelle

Libellé court	Intitulé	Année d'acquisition	Nombre d'heures	Ects
LAN-PDNA-10	Anglais pour la recherche	2017	20:00	0.0
EE-EDD-05	Journée 1 : INNOVER - Découvrir les enjeux, les acteurs et les stratégies d'innovation	2017	06:00	2.0
GDP-PDNA-01	Gestion de projets	2018	21:00	0.0
IST-PDNA-10	Utiliser Mendeley pour gérer ses références et produire sa bibliographie	2020	03:00	0.0
			50:00	2.0

Formation Scientifique

Libellé court	Intitulé	Année d'acquisition	Nombre d'heures	Ects
DIS-BS-200	FORMATION A L EXPERIMENTATION ANIMALE	2018	25:00	0.0
DIS-BS-NO-430	Médecine de précision et thérapie ciblée	2019	15:00	0.0
DIS-BS-X-500	Journées Scientifiques 2020	2020	05:00	0.0
	formation avancée théorique et pratique à la microscopie confocale	2020	20:00	0.0
			65:00	0.0

Total général des formations

Nombre	Ects
115:00	2.0

Annexe 3 : Attestation de formation à l'expérimentation animale

Oniris
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION

Attestation de suivi et d'évaluation des acquis de la formation à l'Expérimentation Animale

* Vu le décret et les arrêtés du 01 Février 2013 (JO du 07/02/2013), relatif à la réglementation
* Vu l'approbation de la formation par le Ministère chargé de l'Agriculture sous le ***n° R44-ENV-F1-11 -Rongeurs, lapins (validité jusqu'au 14/09/2021)***
* Vu le suivi de la Formation spécifique destinée aux « personnes concevant ou réalisant les procédures expérimentales » et la réussite aux contrôles de connaissances du Module de base dispensée en Janvier 2019 à Oniris, et du Module complémentaire « Rongeurs-lapins » dispensé en Janvier 2019 à Oniris,

L'ATTESTATION DE SUIVI ET D'EVALUATION DES ACQUIS DE LA FORMATION

NIVEAU CONCEPTEUR – « RONGEURS – LAPINS »

est conférée à **Madame PAILLAT Lily**

pour en jouir avec les droits et prérogatives qui y sont attachés.

Fait à Nantes,
Le 22 Février 2019

Responsables pédagogiques de la formation
Unité 2017.B146 - NP3 de Nutrition, Physiopathologie et Pharmacologie (Tél : 02 40 68 76 33)
La Directrice Générale
Mme Dominique BUZONI-GATEL

Pr Jean-Claude DESFONTIS
Pr Yassine MALLEM

La personne compétente ne peut exercer les missions qui lui sont confiées, que dans le(s) secteur(s) précisé(s) sur l'attestation de suivi et d'évaluation des acquis de la formation. Elle doit, en outre, réaliser 3 jours de formation continue sur une période de six ans afin de maintenir ses compétences (Article 5 de l'arrêté du 01/02/2013).

Site de la Chantrerie • CS 40706 • 44307 NANTES CEDEX 3
Tél. 02 40 68 77 77
(Direction Générale)

www.oniris-nantes.fr

Site de la Géraudière • CS 82225 • 44322 NANTES CEDEX 3
Tél. 02 51 78 54 54

Etablissement du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation

SANTÉ ET ALIMENTATION AU CŒUR DE LA VIE

DOCTORAT BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Titre : Rôle de la Cavéoline1 dans le disque intervertébral : du développement embryonnaire à la croissance post-natale..... ....

Mots clés : Cavéoline1, disque intervertébral, développement embryonnaire, croissance post-natale, signalisation Sonic Hedgehog, microenvironnement hypoxique

Résumé : Le disque intervertébral (DIV) assure le maintien de la posture et de la mobilité du rachis, tout en permettant l'amortissement des contraintes mécaniques appliquées quotidiennement sur la colonne vertébrale. Ces sollicitations font du DIV une structure fragile et peuvent conduire à sa dégénérescence. En effet, il a été démontré que 40% des lombalgies chroniques trouvent leur origine dans la dégénérescence discale, résultant dans un dérèglement de l'homéostasie tissulaire accompagné de modifications structurelles, cellulaires et moléculaires. Les stratégies thérapeutiques actuelles ne permettent pas de soigner la cause de la dégénérescence, de par le manque de connaissance sur le développement embryonnaire et la croissance du DIV. Dans ce contexte, ce projet vise à décrypter les fonctions des cavéoles/Cavéoline1 (Cav1) du développement embryonnaire à la croissance post-natale du disque. Une étude *in vivo* du phénotype discal des souris invalidées pour le gène *Cav1* montre une augmentation de la capacité prolifératives des cellules du NP (Nucleus Pulposus, centre du DIV) qui perdure dans le temps, ainsi qu'une modulation de l'activité de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh). L'étude *in vitro* de la densité des cavéoles membranaires au sein d'explants de cellules de NP embryonnaires ou post-natal révèle que ces structures sont sensibles à l'hypoxie et à l'osmolarité du milieu environnant. L'ensemble de ces résultats augmente notre compréhension des mécanismes de régulation de la prolifération des cellules du disque en croissance et met en avant *Cav1* comme un potentiel régulateur de l'homéostasie discale.

Title: Caveolin1 function in the intervertebral disc: from its embryonic development to post-natal growth..... .....

Keywords: Caveolin1, intervertebral disc, embryonic development, post-natal growth, Sonic Hedgehog signaling pathway, hypoxic micro-environment

Abstract: The intervertebral disc (IVD) maintains posture and spine mobility and permits absorption of mechanical loads daily applied in the spine. IVD exposure to mechanical forces make it fragile and lead to its degeneration. Indeed, it has been shown that 40% of chronic low back pain cases are due to discal degeneration, resulting in tissue homeostasis disruption, structural, cellular and molecular alterations. Current therapies can't target the cause of the pathology, due to the lack of knowledge about IVD embryonic development and post-natal growth. In this contexte, this project aims understand caveolae/Caveolin1 (Cav1) funtion from IVD embryonic developement to post-natal growth. An *in vivo* study of IVD phenotype in *Cav1*$^{-/-}$ mice showed an increase of NP cells proliferative capacity (Nucleus Pulposus, centre of the IVD), which persist with maturation, and a modulation of Sonic Hedgehog (Shh) pathway activity. The *in vitro* study of the caveolae density in embryonic and post-natal NP explanted cells revealed that caveolae are sensitive to hypoxia and osmolarity of the micro-environment. Altogether, our results improve our understanding of the mecanisms of disc cells proliferation modulation and highlight *Cav1* as a potential regulator in IVD homeostasis.