

Thèse de Doctorat

Nina HENRY

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique

Spécialité : Biomatériaux

Unités de recherche : INSERM, U1229, RMeS "Regenerative Medicine and Skeleton",
CNRS, UMR 6502, Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN)

Soutenue le 20 Juillet 2017

Médecine régénératrice du disque intervertébral :

Développement de biomatériaux pour la libération prolongée de
facteurs de croissance

JURY

Président du Jury :	Amélie BOCHOT, Professeur, Université de Paris Sud, France
Rapporteur :	Anne GALARNEAU, Directeur de Recherche CNRS, Université de Montpellier, France
Examineur :	Esther POTIER, Chargée de Recherche CNRS, Université de Paris Diderot, France
Invités :	Catherine LE VISAGE, Directeur de recherche INSERM, Université de Nantes, France Denis RENARD, Directeur de Recherche INRA, Université de Nantes, France
Directeur de Thèse :	Jérôme GUICHEUX, Directeur de recherche INSERM, Université de Nantes, France
Co-directeur de Thèse :	Jean LE BIDEAU, Professeur, Université de Nantes, France
Encadrant de Thèse :	Johann CLOUET, Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, Université de Nantes, France

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Pierre Weiss pour m'avoir accueillie au sein du LIOAD UMR INSERM 791, nouvellement RMeS UMR INSERM 1229.

Je remercie également M. Jérôme Guicheux pour son encadrement tout au long de ces 4 années, malgré des fonctions de plus en plus prenantes. Merci de m'avoir donné ma chance, de m'avoir fait confiance pour ce projet et d'avoir su écouter mes envies.

Merci également à M. Jean Le Bideau pour la co-direction de ce travail. Merci pour ta rigueur, ta patience face à mon entêtement parfois, ton écoute et tes conseils toujours avisés. Une thèse à l'interface est toujours difficile et tu as su me donner goût aux richesses de la physico-chimie des matériaux.

Je remercie M. Johann Clouet, co-encadrant de cette thèse, pour les nombreuses discussions que nous avons eues au cours de ces années de travail en commun. Merci aussi d'avoir pris le temps de regarder par-dessus mon épaule pour mes premiers pas au laboratoire.

Mes remerciements vont également à Mme Catherine Le Visage. Merci d'avoir accepté de prendre part à ce projet, merci pour tes conseils tant scientifiques que personnels. Merci de m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même, et donné l'envie d'aller toujours plus loin.

Merci également à M. Denis Renard. Merci pour ton implication et tes remarques avisées tout au long de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du laboratoire RMeS et notamment de l'équipe STEP, ainsi qu'aux membres de l'équipe PMN à l'IMN, qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Merci enfin à Mme Amélie Bochot et Mme Anne Galarneau pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier Mme Esther Potier pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

Publications

Articles de revue

- **Médecine régénératrice du disque intervertébral : De la physiopathologie à l'application clinique.** N. Henry, P. Colombier, L. Lescaudron, O. Hamel, J. Le Bideau, J. Guicheux, J. Clouet - *Médecine/Sciences*, 2014 ; 30 : 1091-1100
- **Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: from cell therapies to multi-scaled delivery systems.** N. Henry, J. Clouet, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux. (Soumis - Biotechnology Advances)

Articles expérimentaux

- **Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of the protein-silica interactions.** N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, P. Weiss, E. Gautron, D. Renard, B. Humbert, H. Terrisse, J. Guicheux, J. Le Bideau - *Journal of Materials and Chemistry B*, 2017 ; 5 : 2908-2920
- **Pullulan based microbeads for the sustained delivery of growth factors: new insight for intervertebral disc regenerative medicine.** N. Henry, A. Fragale, L. Griveau, P. Weiss, J. Le Bideau, J. Clouet, J. Guicheux, C. Le Visage. *Drug Delivery*, 2017 ; 24 (1) : 999–1010

Articles non indexés ISI

- **Un jour, on n'en aura plus plein le dos !** N. Henry - *BIologique, e-journal des doctorants et docteurs de l'école doctorale Biologie-Santé, n°1*

Communications

Communications orales

➤ Congrès internationaux

- N. Henry, J. Clouet, P. Colombier, E. Gautron, B. Humbert, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux. Silica nano-carrier as a sustained delivery system of GDF-5 for intervertebral disc regenerative medicine. **European Chapter meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS)**, Uppsala, Suède, 2016
- N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, E. Gautron, B. Humbert, J. Guicheux, J. Le Bideau. Silica nanocarrier as a sustained delivery system of GDF-5 for intervertebral disc regenerative medicine. **10th World Biomaterials Congress**, Montréal, QC Canada, 2016
- N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, E. Gautron, B. Humbert, J. Guicheux, J. Le Bideau. Mesoporous Silica Nanofibers as drug delivery systems for intervertebral disc regenerative medicine: analysis of protein-silica interactions. **27th European Conference on Biomaterials**, Cracovie, Pologne, 2015

➤ Congrès nationaux

- N. Henry, J. Clouet, T. Cordonnier, F. Boury, E. Gautron, B. Humbert, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux. Silica Nanofibers: New drug-delivery system for IVD regenerative medicine. **2nd Workshop of Regenerative Medicine**, Bordeaux, France, 2016 - *Prix de la meilleure communication orale*
- N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, E. Gautron, B. Humbert, J. Guicheux, J. Le Bideau. Mesoporous Silica Nanofibers as drug delivery systems for intervertebral disc regenerative medicine: analysis of protein-silica interactions. **Biomat workshop**, Sainte Marie de Ré, France, 2015 - *Prix de la meilleure communication orale*

Communications affichées

➤ Congrès internationaux

- N. Henry, J. Clouet, T. Cordonnier, F. Boury, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux. Silica nano-carrier as a sustained delivery system of GDF5 and TGF- β 1 for intervertebral disc regenerative medicine. **European Chapter meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS)**, Davos, Suisse, 2017
- N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, E. Gautron, B. Humbert, J. Guicheux, J. Le Bideau. Silica nanofibers as drug delivery systems for intervertebral disc regenerative medicine: analysis of protein-silica interactions. **5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials**, Lisbonne, Portugal, 2017
- N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, E. Gautron, B. Humbert, J. Le Bideau, J. Guicheux. Silica nanocarrier as a sustained delivery system of GDF-5 for intervertebral disc regenerative medicine. **Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress**, Amsterdam, Pays-Bas, 2016.

- N. Henry, C. Le Visage, P. Weiss, J. Guicheux, J. Clouet, N. Buchtova, F. Lari, J. Le Bideau. Nano-reinforced hydrogel and protein release for regenerative medicine of the intervertebral disc. **IVth International Conference on Multifunctional Hybrid and Nanomaterials**, Barcelone, **Espagne, 2015**

➤ **Congrès nationaux**

- N. Henry, J. Clouet, T. Cordonnier, F. Boury, E. Gautron, B. Humbert, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux. Mesoporous Silica Nanofibers: New drug-delivery system for IVD regenerative medicine. **Bioregate European Regenerative Medicine Forum**, Nantes, **France, 2016**
- N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, F. Lari, P. Weiss, J. Le Bideau, J. Guicheux. Vieillesse et dégénérescence du disque intervertébral : nouvelle approche thérapeutique via la libération de protéines par des biomatériaux. **Journée d'études « Longévité, Mobilité, Autonomie »**, Nantes, **France, 2015**.
- N. Henry, C. Le Visage, J. Le Bideau, F. Lari, P. Weiss, J. Guicheux, J. Clouet. Hydrogel nanorenforcé et libération de protéines pour la médecine régénératrice du disque intervertébral. **27^{ème} Congrès Français de Rhumatologie**, Paris, **France, 2014**

Activités d'encadrement

- **Audrey Fragale (Novembre – Avril 2015 - Stage Master 2 Ingénierie pour la Santé et le Médicament, spécialité Biotechnologie, Ingénierie Diagnostiques et Thérapeutiques, parcours Biothérapies, Technologies, Réglementation et sécurité - Grenoble)**

Formulation et caractérisation d'un matériau biologiquement actif : application à la médecine régénératrice du disque intervertébral.

- **Louise Griveau (Septembre 2015 – Février 2016 - Stage Assistant Ingénieur, Université de Technologie de Compiègne - Compiègne)**

Caractérisation des propriétés mécaniques, de la résorption et de l'imprégnation de microbilles de polysaccharides obtenues par émulsion/réticulation chimique.

Abréviations

ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats

AF : Anneau fibreux ou *Annulus fibrosus*

AINS : Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien

ALIF : Anterior Lumbar Interbody Fusion

HAS : Haute Autorité de Santé

ARN : Acide Ribonucléique

ARNT : Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

ASD : Adjacent Segment Disease

ATG-MS : Analyse Thermogravimétrique couplée Spectrométrie de masse

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BMP : Bone Morphogenic Protein

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

DDS : Système à libération prolongée

DIV : Disque intervertébral

ELIF : Extra Foraminal Interbody Fusion

FasL : Fas Ligand

FGF : Fibroblast Growth Factor

GAG : Glycosaminoglycane

GDF-5 : Growth and Differentiation Factor-5

hASC : Cellules souches issues du tissu adipeux humain

HIF : Hypoxic Inducible Factor

HPMC-Si : Hydroxypropyl methylcellulose silanisée

HRE : Hypoxia Response Element

IGF : Insulin-like Growth Factor

IL : Interleukine

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MEC : Matrice Extracellulaire

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MI-TLIF : Minimally Invasive - Transforaminal Lumbar Interbody Fusion

LLIF : Lateral Lumbar Interbody Fusion

MMP : Matrix Metalloproteinase

NGF : Neural Growth Factor

NK : Natural Killer

NP : Noyau pulpeux ou *Nucleus pulposus*

OLIF/ATP : Oblique Lumbar Interbody Fusion/Anterior To Psoas

PEEK : Poly-Ether-EtherKeton

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PG : Protéoglycanes

PGE₂ : Prostaglandine E₂

PI : Point isolélectrique

PLIF : Posterior Lumbar Interbody Fusion

PMB : Microbilles de pullulane

PV : Plateaux Vertébraux

Shh : Sonic Hedgehog

SNFs : Nanofibres de silice

STMP : Triméthaphosphate de Sodium

TENS : Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TIMP : Tissue Inhibitors of Metalloproteinase

TLIF : Transforaminal Lumbar Interbody Fusion

TNF- α : Tumor Necrosis Factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Figures et Tableaux

Figure 1 : Répartition des disque intervertébraux et système articulaire vertébral	6
Figure 2 : Anatomie structurelle de la colonne vertébrale et des ligaments rachidiens.....	6
Figure 3 : Structure du disque intervertébral	7
Figure 4 : Développement embryonnaire d'un disque intervertébral	9
Figure 5 : Transition notochorde-Nucleus pulposus chez l'embryon de souris.	10
Figure 6 : Organisation lamellaire de l'Annulus fibrosus	15
Figure 7 : Vascularisation des disques intervertébraux	20
Figure 8 : Représentation schématique de la régulation de HIF-1 α	22
Figure 9 : Pression intradiscale et état d'hydratation du disque intervertébral en fonction de la position du corps	24
Figure 10 : Comparaison d'images de colonnes vertébrales obtenues en IRM par des pondérations en T1 (a) et T2 (b).....	29
Figure 11 : Classifications de la dégénérescence discale basées sur l'IRM.	31
Figure 12 : Classification de Thompson.....	33
Figure 13 : Voies de signalisation de l'apoptose	40
Figure 14 : Exemples de cages de fusion pour arthrodèse et illustration d'une cage de fusion implantée par voie d'abord latérale (LLIF).....	48
Figure 15 : Prothèses lombaires totales	52
Figure 16 : Comparaison de la taille d'aiguilles de 18 et 23G vis-à-vis de la hauteur d'un DIV sain.	73
Table 1 : Classification de Pfirrmann selon l'étude de plusieurs paramètres à partir d'IRM en T2.....	32
Table 2 : Classification de Thompson à partir de vues macroscopiques	34

Table des matières

Introduction et objectifs de la thèse	1
Partie I - Etat de l'art : Formation du disque intervertébral, dégénérescence discale et traitements de la lombalgie	5
I. Le disque intervertébral.....	7
1. Généralités.....	7
2. Développement du disque intervertébral.....	8
a. Formation des corps vertébraux et des <i>Annulus Fibrosus</i>	11
b. Formation des <i>Nucleus pulposus</i>	11
c. Modification des disques intervertébraux après la naissance	12
3. Anatomie	16
a. Les plateaux vertébraux.....	16
b. L' <i>Annulus fibrosus</i>	16
c. Le <i>Nucleus pulposus</i>	17
4. Vascularisation	21
5. Privilège immunitaire	23
6. Fonctions	25
II. La dégénérescence du disque intervertébral.....	27
1. Epidémiologie	27
2. Dégénérescence discale et imagerie	30
3. Physiopathologie	34
a. Rupture du dialogue cellulaire.....	36
i. CTGF/CCN2	36
ii. TGF- β	37
iii. Shh.....	37
iv. GDF-5.....	38
b. Dégénérescence des plateaux vertébraux et de l' <i>Annulus Fibrosus</i>	38
c. Apoptose, sénescence et autophagie.....	41

i.	Apoptose.....	41
ii.	Sénescence et autophagie	41
d.	Effets de la dégénérescence sur les propriétés biomécaniques du DIV.....	42
e.	Dégénérescence discale induite	43
III.	Prévention et traitements conventionnels de la lombalgie	45
1.	Prévention et traitements hygiéno-diététiques.....	45
2.	Traitements pharmacologiques.....	47
3.	Traitements chirurgicaux.....	49
a.	L'arthrodèse.....	49
b.	L'arthroplastie	53
i.	Prothèses totales	53
ii.	Prothèses partielles	54
IV.	Traitements innovants de la dégénérescence discale et des douleurs lombaires	56
Partie II - Développement de systèmes à libération prolongée de morphogènes.....		60
I.	Nanofibres de silice	61
1.	Rationnel de l'étude.....	61
2.	Discussion	64
II.	Microbilles de pullulane	69
1.	Rationnel de l'étude.....	69
2.	Discussion	72
Partie III - Conclusions générales et perspectives		77
Partie IV - Références bibliographiques		84

INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE LA THESE

La lombalgie est un problème de santé publique et est considérée comme le mal du XXI^{ème} siècle par l'OMS. Parmi ces lombalgies, il est estimé que 40% sont dues à une dégénérescence d'un ou plusieurs disques intervertébraux¹(DIV), éléments mobiles de la colonne vertébrale, qui permettent l'amortissement des contraintes subies. La prise en charge de cette maladie est essentiellement symptomatique et se traduit par des traitements antalgiques ou chirurgicaux. Grâce à de récentes et nombreuses études, les processus de dégénérescence discale sont aujourd'hui mieux compris. Ces études ont notamment mis en évidence une diminution de la densité cellulaire du DIV au cours de l'évolution de sa dégénérescence. Cette perte de densité cellulaire est notamment à l'origine de la rupture de l'homéostasie de la matrice extracellulaire. Ces nouvelles connaissances permettent d'envisager de nouvelles thérapies, dont la médecine régénératrice. La médecine régénératrice a pour objectif de recréer des tissus vivants fonctionnels pour remplacer des tissus ou organes endommagés et fait appel à l'utilisation de cellules, de biofacteurs et de biomatériaux.

Ainsi, l'injection intradiscale d'un biomatériau permettant de restaurer l'hydratation et la hauteur discale, associé à des cellules régénératrices ou des biofacteurs permettrait de relancer la machinerie biologique et ainsi à long terme, de restaurer les fonctions de la partie centrale du disque intervertébral, le noyau pulpeux (NP). Des cellules souches issues de tissu adipeux humain (hASC) différenciées en cellules présentant un phénotype proche des cellules matures résidentes du noyau pulpeux, les nucléopulpecytes, sont actuellement envisagées en tant que cellules régénératrices. Dans ce contexte, de précédents travaux du laboratoire RMeS ont démontré le rôle synergique et indispensable de deux facteurs de croissance, le GDF-5 et le TGF- β , dans ces processus d'engagement et de différenciation nucléopulpegénique des hASC.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité de cet axe de recherche, et a pour objectif le développement d'un système à libération prolongée de ces deux facteurs de croissance. L'injection concomitante de cellules souches non différenciées avec ce système permettant la libération progressive des facteurs pourrait permettre leur différenciation *in situ*. Pour ce faire, deux biomatériaux ont été étudiés : les nanofibres de silice et les microbilles de pullulane.

La silice colloïdale est un matériau très intéressant pour la délivrance prolongée de molécules *in vivo* au regard de son caractère peu cytotoxique et de la possibilité de contrôler sa porosité et sa forme. Cette silice colloïdale a récemment été synthétisée sous forme de nanofibres et leur capacité à renforcer mécaniquement un hydrogel a démontré leur utilité potentielle, notamment en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Dans ce projet de thèse, la possibilité d'utilisation de ces nanofibres de silice en tant que réservoir de facteurs de croissance a ainsi été analysée. Ces résultats ainsi que l'étude des interactions protéine/silice seront présentés dans l'article III : «Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of the protein-silica interactions ».

En parallèle, des microbilles de pullulane chargées en facteurs de croissances ont également été étudiées vis-à-vis de leur utilisation en médecine régénératrice du disque intervertébral et les résultats seront présentés dans l'article IV «Pullulan based microbeads for the sustained delivery of growth factors: new insight for intervertebral disc regenerative medicine ». Le pullulane est un polysaccharide hydrophile, neutre, non-immunogène et dégradable. Ses similarités biochimiques avec la matrice extracellulaire du noyau pulpeux en font un matériau de choix pour la médecine régénératrice du disque intervertébral. Le pullulane est déjà largement utilisé pour des applications dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Son intérêt a par ailleurs été montré pour des applications en ingénierie tissulaire vasculaire *in vitro*.

Pour ces deux matériaux, leurs synthèses et caractérisations physico-chimiques ont été réalisées avant de s'intéresser à leurs propriétés d'adsorption et de libération des facteurs de croissance (GDF-5 et TGF- β 1). Le maintien de l'activité biologique de ces facteurs après libération a également été analysé.

Dans ce manuscrit, nous avons souhaité commencer par une présentation du développement embryonnaire du disque intervertébral, ainsi que ses spécificités et fonctions afin de bien définir le contexte de cette thèse (Partie I - I. Le disque intervertébral). Différents aspects de la dégénérescence discale seront ensuite abordés (Partie I - II. La dégénérescence du disque intervertébral) avant de clore cette première partie par la présentation des traitements actuels et en devenir de la lombalgie (Partie I - III. Prévention et traitements

conventionnels et Partie I - IV. Traitement innovants). Deux revues de la littérature ont été réalisées sur ces premières thématiques. Une première, publiée dans le journal Médecine/Sciences, porte principalement sur la physiopathologie du disque intervertébral. La seconde revue s'intéresse aux thérapies innovantes de la médecine régénératrice du disque intervertébral, de la thérapie cellulaire aux systèmes à libération prolongée. Elle est actuellement soumise au journal Biotechnology Advances.

Les résultats expérimentaux de nos deux études des biomatériaux en tant que systèmes à libération prolongée de facteurs de croissance seront présentés dans la Partie II - Développement de systèmes à libération prolongée de morphogènes pour l'ingénierie tissulaire du DIV. Ces études seront illustrées par deux articles, d'ores déjà publiées dans les journaux Journal of Materials Chemistry B et Drug Delivery.

La partie III - Conclusions générales et perspectives permettra de synthétiser l'ensemble des travaux et d'ouvrir quelques perspectives soulevées par ce travail. Ce manuscrit s'achèvera par la partie IV reprenant l'ensemble des références citées dans le corps du texte.

PARTIE I - ETAT DE L'ART : FORMATION DU DISQUE
INTERVERTEBRAL, DEGENERESCENCE DISCALE ET
TRAITEMENTS DE LA LOMBALGIE

Partie I - Etat de l'art : Formation du disque intervertébral, dégénérescence discale et traitements de la lombalgie

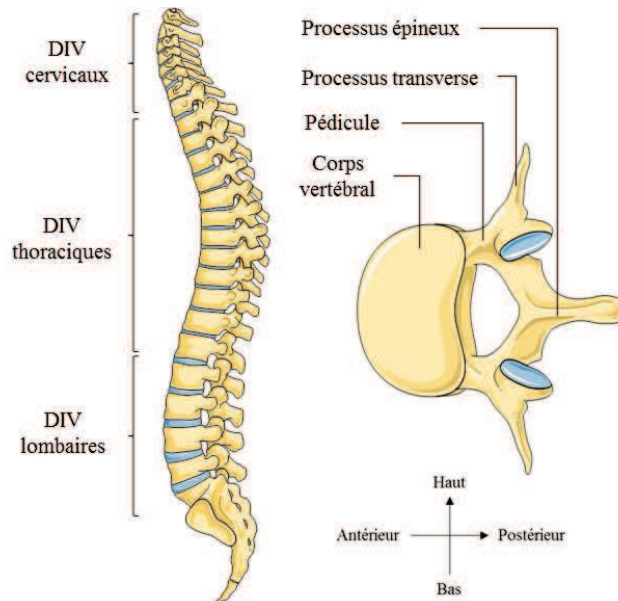


Figure 1 : Répartition des disques intervertébraux et système articulaire vertébral
(Source iconographique : Servier Medical Art)

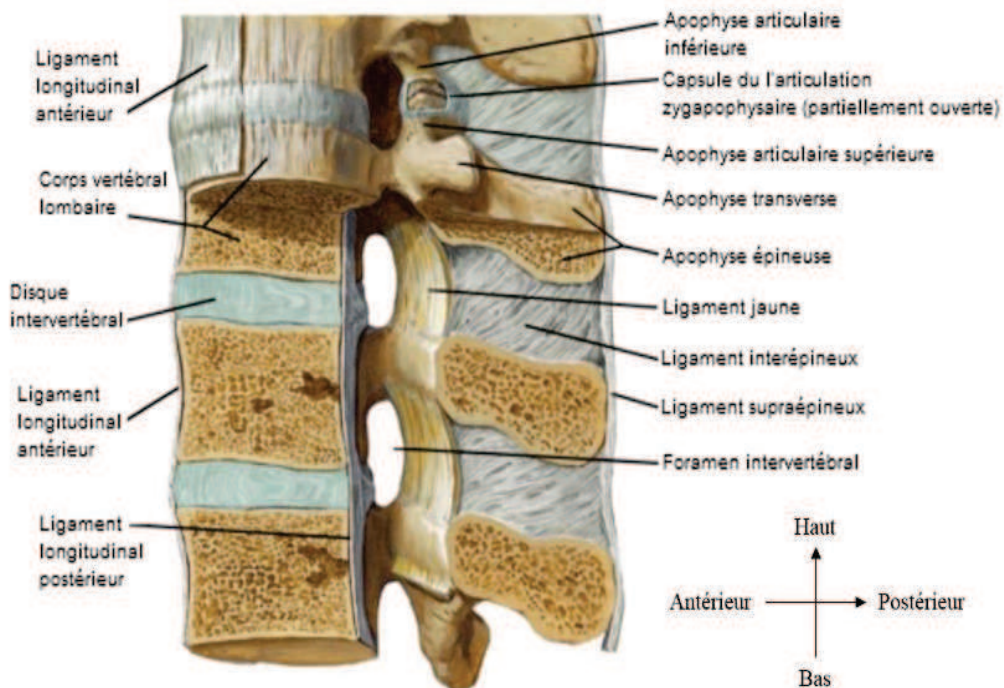


Figure 2 : Anatomie structurale de la colonne vertébrale et des ligaments rachidiens
(Source : Atlas d'anatomie humaine, Frank H. Netter, 2006, 4^e Ed. Saunders Elsevier)

I. LE DISQUE INTERVERTEBRAL

1. Généralités

La colonne vertébrale, ou rachis, est composée de 33 vertèbres, dont 24 mobiles, reliées entre elles par les systèmes articulaires et ligamentaires et les disques intervertébraux (DIV)².

Le système articulaire est constitué des processus épineux et transverses, liés par les pédicules au corps vertébraux, eux-mêmes recouverts des plateaux cartilagineux³ (Figure 1). Le système ligamentaire se compose de sept ligaments : longitudinal antérieur, longitudinal postérieur et intertransverse (non représenté), jaune, capsulaire, interépineux et supraépineux (Figure 2).

Les 23 DIV de la colonne sont répartis en 6 DIV cervicaux, 12 DIV thoraciques et 5 DIV lombaires⁴, représentant 25% de la hauteur totale du rachis mobile^{2,3}. Il est à noter que seules les vertèbres "atlas" et "axis", au niveau cervical supérieur, ne sont pas liées par un DIV. Les DIV humains mesurent environ 4 cm de diamètre⁴ avec une hauteur variable selon la localisation, atteignant 12 mm dans la région lombaire⁵, et sont composés de trois parties principales⁵ : les plateaux vertébraux, l'*Annulus fibrosus* ou anneau fibreux (AF) et le *Nucleus pulposus* ou noyau pulpeux (NP)⁶ (Figure 3). Ce sont des articulations semi-mobiles (amphiarthrose) qui participent à la cinématique rachidienne par des mouvements de flexions, extensions, inclinaisons latérales et rotation. Les rôles des DIV seront développés plus précisément ci-après.

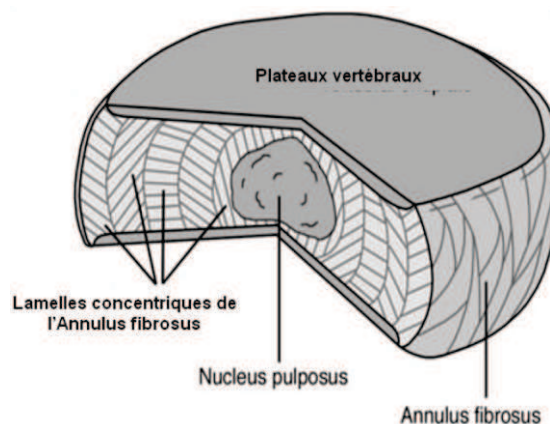


Figure 3 : Structure du disque intervertébral
(d'après Marchand et al., Spine, 1990)

2. Développement du disque intervertébral

Les réglementations actuellement en vigueur concernant l'utilisation de tissus embryonnaires et fœtaux humains à des fins de recherche (article L.1241-5 du code de santé publique - 2004) rendent leur étude difficile. Ainsi, les événements décrits dans ce paragraphe sont principalement issus des résultats de recherches réalisées dans le modèle de la souris. De plus, les phénomènes présentés sont soumis à des régulations impliquant de nombreux facteurs de transcription et gènes de régulation. La moindre altération de ces régulations peut entraîner une malformation des disques intervertébraux, voir la létalité embryonnaire du sujet⁷, et dont le détail ne sera pas discuté ici.

Chez l'homme, dans les 15 premiers jours qui suivent la fécondation, le développement de l'embryon progresse peu. Après la nidation au contraire, son développement s'accélère de façon significative⁸. Pendant la gastrulation, soit au cours de la troisième semaine de gestation, la formation de la ligne primitive permet la mise en place des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme). Ces tissus seront à l'origine du développement de tous les tissus fœtaux.

Sous l'action du gène nodal, des cellules de la périphérie du discoïde migrent vers son centre, créant ainsi une zone plus dense : la ligne primitive. A la fin de leur migration au centre du discoïde, les cellules forment à l'extrémité de la ligne primitive le nœud primitif, ou nœud de Hensen⁸. Ce nœud est constitué d'une partie dorsale, qui conduira à la formation du plancher du tube neural, et d'une partie ventrale, qui formera la notochorde.

La partie postérieure de la ligne primitive génère le mésoderme extra-embryonnaire tandis que sa partie médiane est à l'origine, notamment, du mésoderme paraxial et latéral. La partie antérieure de la ligne primitive correspond au futur mésoderme axial, à l'origine de la notochorde.

Le mésoderme paraxial subit une segmentation qui est à l'origine de la formation des somites, structures intermédiaires dont la partie ventrale se différenciera pour former le sclérotome au cours du développement⁹.

Partie I - Etat de l'art : Formation du disque intervertébral, dégénérescence discale et traitements de la lombalgie

La différenciation et la migration des cellules du sclérotome autour de la notochorde donneront naissance aux vertèbres et à l'AF des DIV (Figure 4).

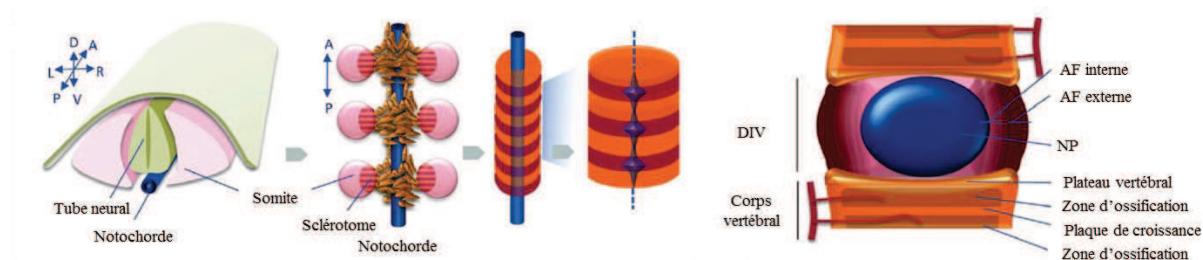


Figure 4 : Développement embryonnaire d'un disque intervertébral
(D'après Chan et al. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2014)

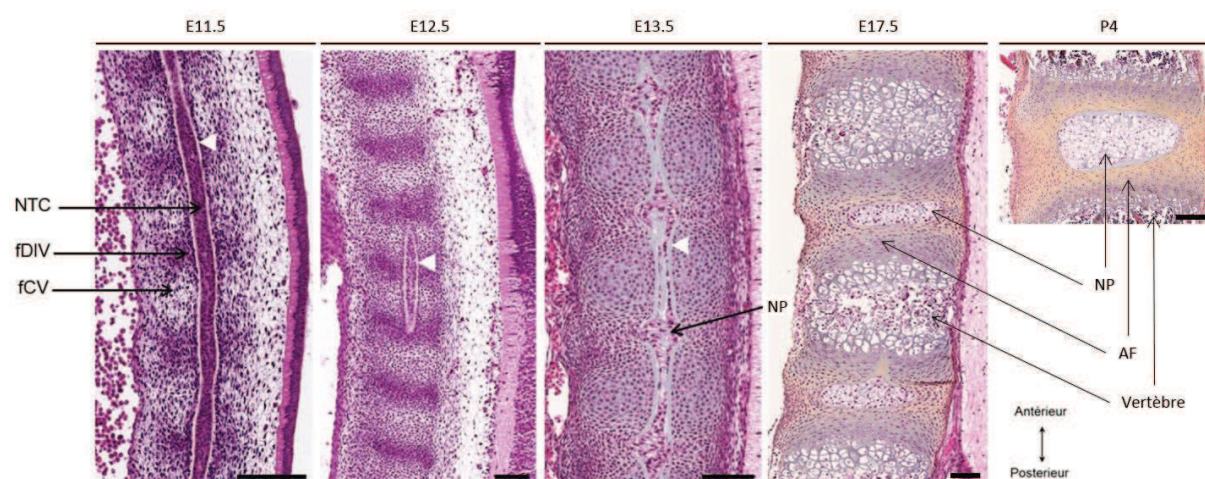


Figure 5 : Transition notochorde-Nucleus pulposus chez l'embryon de souris.

Coupes histologiques d'embryons à E11.5, 12.5, 13.5, 17.5 et P4 réalisées au niveau thoracique et colorées à l'hématoxyline-éosine-safran. AF : Annulus fibrosus, CV : Corps vertébral, fCV : futur corps vertébral, fDIV : futur disque intervertébral, NP : Nucleus pulposus, NTC : Notochorde. Les pointes de flèches blanches montrent la gaine péri-notochordale. Barre d'échelle = 100 μ m (Travaux non publiés Maëva Dutilleul, Anne Camus)

a. Formation des corps vertébraux et des *Annulus Fibrosus*

La formation du sclérotome à partir des somites est soumise au contrôle de l'expression de plusieurs facteurs, tels que Sonic hedgehog (Shh) et Noggin. Les cellules du sclérotome se répartissent ensuite autour de la notochorde et du tube neural avec différents niveaux de condensation⁷. Les zones peu condensées formeront les corps vertébraux tandis que les zones fortement condensées donneront naissance aux AF.

Dans les zones faiblement condensées, les cellules mésenchymateuses vont se différencier pour devenir des chondrocytes hypertrophiques, responsables de la synthèse d'une matrice extracellulaire (MEC) calcifiée et du recrutement de vaisseaux sanguins¹⁰. En plus des corps vertébraux, ce processus d'ossification induit la mise en place des plateaux vertébraux (PV).

Dans les zones les plus condensées, la naissance des AF est sous le contrôle de certains marqueurs tels que Pax1 et Pax9, induits par les voies de signalisation de Shh¹¹. Par ailleurs, l'inactivation du gène codant pour un des récepteurs du Transforming Growth Factor- β (TGF- β) entraîne une ossification du sclérotome formant normalement l'AF. Ces observations suggèrent ainsi le rôle majeur du TGF- β , et de sa voie de signalisation, dans la formation des AF. A la fin du développement embryonnaire, deux composantes se distinguent dans l'AF mature : une partie interne « chondrogénique » (AF interne), et une partie externe « fibreuse » (AF externe) qui possèdent des types cellulaires et une matrice extracellulaire différente. Les processus menant à la création de ces deux composantes ne sont à ce jour pas élucidés.

b. Formation des *Nucleus pulposus*

La formation des NP repose sur la transformation de la notochorde^{12,13}. Une fois l'élongation de l'axe embryonnaire terminée, la gaine périnotochordale, constituée principalement de fibres de collagène, de protéoglycanes (PG), et de laminine apparaît autour de la notochorde¹⁴. Il a été observé que la notochorde régresse dans les régions des futurs corps vertébraux⁷ alors que les cellules de notochorde s'accumulent au niveau des futurs DIV (Figure 5)¹³. Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la

transformation de la notochorde en NP restent encore peu connus aujourd'hui, et font l'objet de recherches intensives.

Deux hypothèses principales ont été avancées dans la littérature. La première repose sur l'apoptose et la prolifération différentielle des cellules notochordales, induisant respectivement leur disparition au niveau des corps vertébraux et leur augmentation au niveau des DIV⁷. La seconde et la plus défendue, envisage la création de contraintes mécaniques telles de la part des corps vertébraux en formation, qu'elles repousseraient la notochorde vers les zones des futurs DIV^{9,15,16}. Le rôle de l'expression de certains marqueurs tels que FoxA2 ou Noto est également étudié¹⁷⁻¹⁹.

c. Modification des disques intervertébraux après la naissance

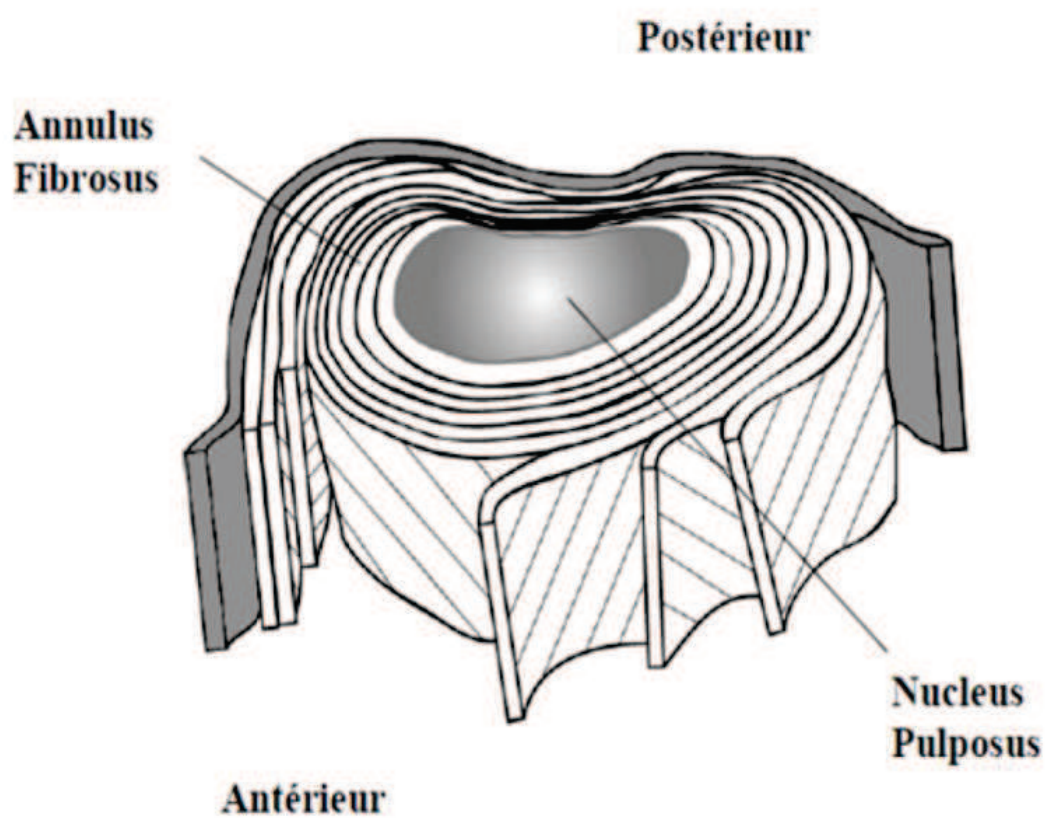
Chez l'homme, de la naissance jusqu'à la puberté, âge de la maturité squelettique, les diamètres et volumes des DIV augmentent². Au cours de cette phase, le cartilage des plateaux vertébraux (PV) subit une minéralisation massive qui finira par se résorber et laisser la place à de l'os. La présence de pores et de protéoglycanes chargés négativement dans la plaque cartilagineuse, permet de favoriser la diffusion des nutriments et métabolites présentant une charge de surface nulle (oxygène, glucose) ou positive (sodium, calcium)²⁰⁻²², notamment au centre des PV²³. Une modification de la composition de la matrice extracellulaire des plateaux cartilagineux peut perturber cette diffusion. Or dès l'enfance, une diminution du taux de protéoglycanes et de collagène de type II a été observée²⁴, entraînant une perte d'hydratation au sein des PV et une réduction de la diffusion des métabolites vers le NP et l'AF.

Tout comme les PV, l'AF possède son organisation finale dès la naissance. Néanmoins, du fait de la croissance et de la modification de la forme du DIV⁶ dans les premières années de vie, les lamelles fibreuses vont adopter une orientation légèrement plus inclinée que lors de leur formation embryonnaire (65° contre au minimum 54,7° par rapport à l'axe de la colonne)²⁵.

Chez l'homme, la maturation du NP est celle qui entraîne le plus de modifications. A la naissance, le NP est composé majoritairement de cellules notochordales qui sont de grandes cellules (25-85 μm)²⁶ avec de larges vacuoles représentant jusqu'à 25% du volume de la cellule. Ces cellules notochordales tendent à disparaître au cours de la croissance. Il est intéressant de noter que cette disparition n'est pas commune à toutes les espèces²⁷. En effet, alors que chez l'homme, le chien chondrodystrophique et le lapin, la réduction du nombre de ces cellules notochordales intervient autour de la maturité squelettique, chez le chien non chondrodystrophique, le chat, le rat, la souris et le cochon, ces cellules persistent bien plus longtemps.

Parallèlement à cette réduction, un autre type de cellule, apparaît au cours de la croissance. Ce sont les nucléopulpocytes, longtemps appelés chondrocytes-like, de plus petite taille, qui présentent un phénotype proche de celui des chondrocytes. Deux hypothèses existent actuellement quant à l'origine de ces cellules. Les cellules du NP pourraient soit provenir d'une migration de chondrocytes depuis les plateaux vertébraux, soit dériver de la notochorde embryonnaire, c'est-à-dire, de la différenciation terminale des cellules notochordales²⁸. Au regard de résultats expérimentaux récents^{13,29}, cette seconde hypothèse est aujourd'hui plus largement défendue. Ainsi, Minogue *et al.* ont étudié le phénotype des cellules notochordales et des nucléopulpocytes. Ils ont conclu qu'au vu de l'expression des marqueurs géniques de ces deux populations, elles dérivent probablement d'une lignée commune³⁰. Chez l'homme, aucune étude n'a formellement démontré le processus de différenciation des cellules notochordales en nucléopulpocytes. Néanmoins, il a été démontré que des cellules issues du NP présentent des propriétés progénitrices et sont capables de se différencier dans les voies ostéo-, adipo- et chondrogéniques. Ces cellules ont également montré leur capacité à survivre et produire des protéoglycanes et du collagène de type II dans un environnement proche de celui du DIV humain³¹. L'ensemble de ces observations, associé à des études portant sur la capacité de différenciation des cellules notochordales^{32,33}, permet de soutenir l'hypothèse que les cellules notochordales seraient les progénitrices des nucléopulpocytes.

La maturation du NP consiste en la mise en place d'une MEC spécialisée capable d'absorber les contraintes mécaniques générées par les mouvements du corps humain adulte. Celle-ci passe par l'instauration d'un dialogue cellulaire complexe entre les nucléopulpocytes et les cellules notochordales. En effet, plusieurs études ont permis de mettre en lumière l'existence de boucles de régulation qui contrôlent l'expression et l'activité des facteurs sécrétés par les deux types cellulaires. Ainsi, la production par les cellules notochordales de facteurs tels que le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF/CCN2) peut induire la prolifération et l'inhibition de l'apoptose des nucléopulpocytes, mais également la production de composants de la MEC par ces mêmes cellules³⁴⁻³⁶. En retour, les nucléopulpocytes produisent du TGF- β qui agit sur les cellules notochordales pour la régulation du CTGF/CCN2. La relation entre les cellules notochordales et le CTGF/CCN2 semble majeure au regard de la sécrétion de celui-ci au sein des DIV de chiens non-chondrodystrophiques, qui présentent la particularité de conserver des cellules notochordales tout au long de leur vie³⁷. La dérégulation de ce dialogue cellulaire conduit à la rupture de l'homéostasie au sein du NP. La disparition complète des cellules notochordales après la maturité squelettique est ainsi considérée comme l'élément déclencheur de la cascade d'événements qui mèneront à la dégénérescence du NP, puis de l'ensemble du DIV.



*Figure 6 : Organisation lamellaire de l'Annulus fibrosus
(D'après Marchand et al. 1990)*

3. Anatomie

A la naissance, les DIV sont composés de deux plateaux vertébraux, d'un anneau fibreux (interne et externe) et d'un noyau pulpeux.

a. Les plateaux vertébraux

Les plateaux vertébraux (PV) possèdent une épaisseur inférieure à 1 mm et sont légèrement plus fins au centre³⁸. Les plateaux vertébraux sont composés d'une plaque d'os sous-chondral et d'une plaque cartilagineuse composée de chondrocytes synthétisant majoritairement du collagène de type IX, XI et de type X. Les fibres de collagène sont orientées horizontalement par rapport au corps vertébral, apportant ainsi souplesse et déformabilité à ce tissu. La plaque cartilagineuse est également riche en protéoglycanes, ce qui permet de maintenir le taux d'hydratation et facilite ainsi la diffusion de molécules. Cette diffusion est par ailleurs permise par la présence d'un réseau de fins vaisseaux sanguins dans les PV qui joueront un rôle essentiel pour la nutrition du DIV²⁰. Les PV sont en contact direct avec les lamelles de l'AF^{38,39}.

b. L'Annulus fibrosus

L'AF est composé de lamelles fibro-cartilagineuses concentriques constituées de fibres de collagène parallèles entre elles et obliques, s'étendant d'une vertèbre à l'autre et enserrant le NP. L'orientation des fibres alterne d'une lamelle à l'autre selon des angles précis de 65° (Figure 6)^{40,41}. Cependant, les fibres sont principalement orientées verticalement dans la partie postérieure du DIV ce qui explique en partie la prédisposition de cette zone pour les hernies discales². Le nombre de lamelles distinctes varie selon la localisation latérale (25 lamelles) ou postérieure (20 lamelles) du DIV⁶. Le réseau de collagène de l'AF est principalement composé de collagène de type I pour l'AF externe et de collagène de type II pour l'AF interne⁴². La présence de collagènes de type III, V, VI, IX et XI a également été décrite, mais en moindre proportion⁴³. La quantité de protéoglycane et d'acide hyaluronique augmente graduellement de l'AF externe

vers l'AF interne⁴⁰ de même que le taux d'hydratation⁴⁴. La partie externe de l'AF est donc plus fibreuse et ordonnée et possède une résistance en tension supérieure à l'AF interne.

L'AF présente une densité cellulaire d'environ 9000 cellules/mm³ et le type cellulaire présent est généralement assimilé à des fibroblastes⁴⁵⁻⁴⁷. Ces cellules synthétisent de la MEC dans l'espace intralamellaire contenant notamment la lubricine, une glycoprotéine qui aurait un rôle de lubrifiant vis-à-vis des frottements que le DIV subit^{48,49}.

c. Le Nucleus pulposus

Le NP est un tissu hautement hydraté ($\geq 80\%$ (w/w)⁵⁰). Ce taux d'hydratation important est expliqué par la présence importante de protéoglycanes (principalement l'agrécan)⁵¹ dont la charge négative permet la rétention hydrique. La MEC du NP est également riche en fibres de collagène, majoritairement de type II. La présence d'autres type de collagènes (I, III, VI et IX) a été documentée mais leur proportion reste minoritaire⁵².

Dans un DIV jeune et sain, deux populations cellulaires ont été décrites au sein du NP, pour une densité totale d'environ 3000 cellules/mm³. L'origine de ces deux populations, les cellules notochordales et les nucléopulpocytes, a été exposée précédemment et ne sera pas rediscuté dans ce paragraphe. Brièvement, les cellules notochordales sont de grosses cellules présentant de larges vacuoles disparaissent progressivement chez l'homme. Cette disparition coïnciderait avec les premiers signes de dégénérescence discale et leur rôle dans l'initiation de la maladie discale a été envisagé⁵³. Leur implication dans le maintien de l'homéostasie de la MEC *via* un "dialogue cellulaire" avec les nucléopulpocytes est aujourd'hui une hypothèse largement admise³⁴⁻³⁶. Les nucléopulpocytes, sont des cellules plus petites, généralement comparées à des chondrocytes articulaires. Ces cellules présentent en effet des phénotypes proches mais depuis 2007, plusieurs publications ont démontré l'existence d'un phénotype singulier des nucléopulpocytes vis-à-vis des chondrocytes articulaires. Les nucléopulpocytes et les chondrocytes articulaires partagent l'expression de

gènes tels que ACAN (agrécan) et COL2A1 (collagène de type II). Cependant, le ratio ACAN/COL2A1 est de 2:1 pour le cartilage articulaire et de 27:1 pour le NP, ce qui démontre une activité de synthèse spécifique des nucléopulpecytes^{45,54-56}. De plus, ces mêmes études ont montré que les nucléopulpecytes expriment spécifiquement d'autres marqueurs (OVOS2, PAX1, CD24, CA12).

L'ensemble des données exposées ci-dessus a fait l'objet d'un article de revue. Article I : **Médecine régénératrice du disque intervertébral : De la physiopathologie à l'application clinique**. N. Henry, P. Colombier, L. Lescaudron, O. Hamel, J. Le Bideau, J. Guicheux, J. Clouet - *Médecine/Sciences*, 2014 ; **30** : 1091-1100

ARTICLE I

Médecine régénératrice du disque intervertébral : De la physiopathologie à l'application clinique.

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

Médecine/Sciences, 2014 ; **30** : 1091-1100

Résumé

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

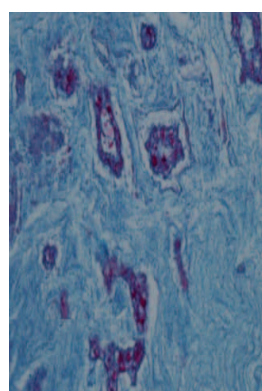
► Une large proportion des lombalgies sont expliquées par la dégénérescence du disque intervertébral (DIV). Cette dégénérescence est notamment caractérisée par la disparition progressive des cellules du noyau pulpeux (*nucleus pulposus*, NP), partie centrale du DIV. Compte tenu de l'absence de réparation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

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

Médecine régénératrice du disque intervertébral

De la physiopathologie à l'application clinique

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



¹Inserm UMR5791-LIOAD (laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire), groupe STEP (skeletal tissue engineering and physiopathology), 1, place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France ;

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

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

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

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

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

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

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

⁹Université de Nantes, UFR sciences biologiques et pharmaceutiques, 44042 Nantes, France. jerome.guicheux@inserm.fr

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

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

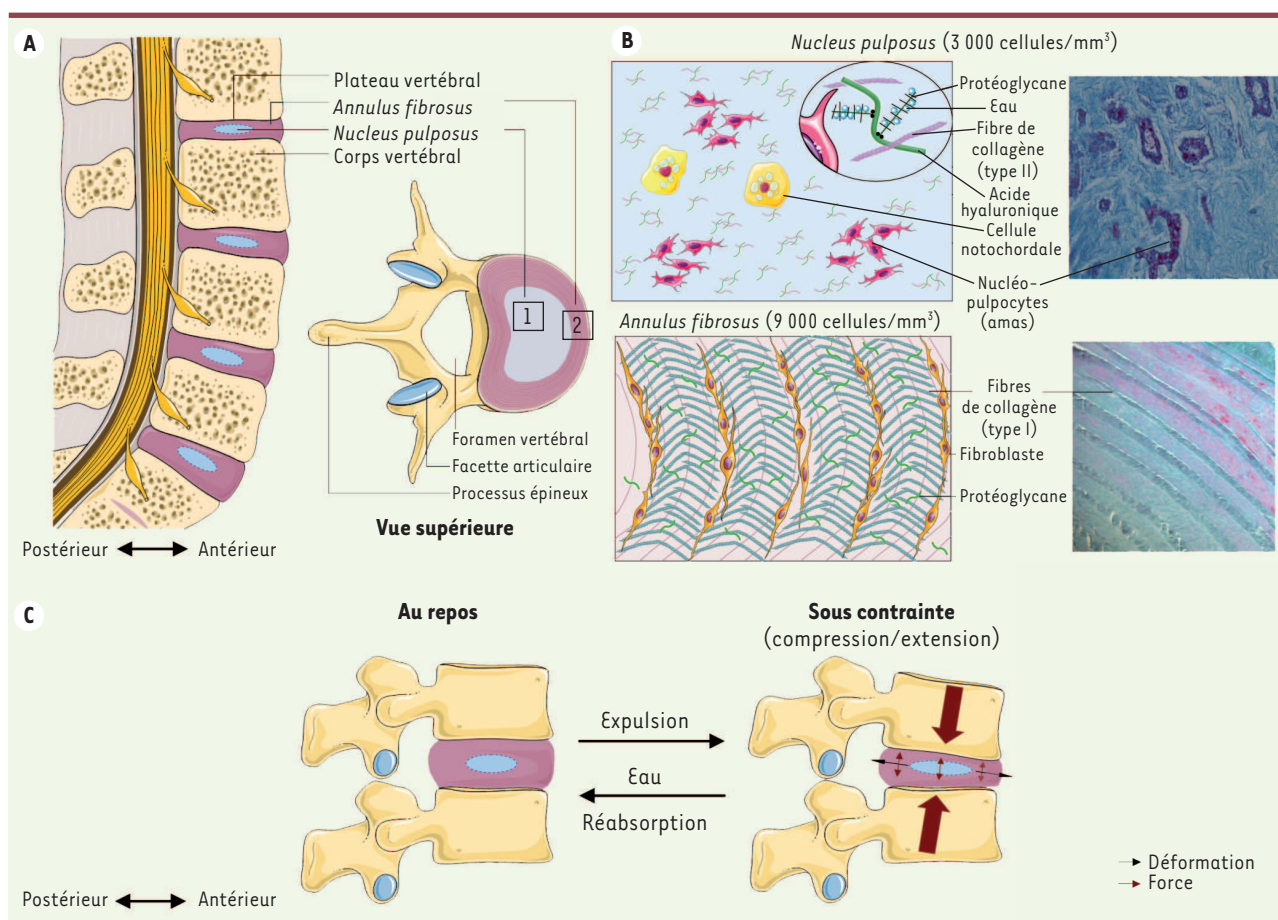


Figure 1. Le disque intervertébral sain. A. Organisation du rachis lombaire et aspect général d'un DIV lombaire : *nucleus pulposus* (1) et *annulus fibrosus* (2). B. Organisation matricielle du DIV. C. Biomécanique du DIV au repos et sous contrainte.

Disque intervertébral sain, disque intervertébral dégénéré

Le disque intervertébral sain

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

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

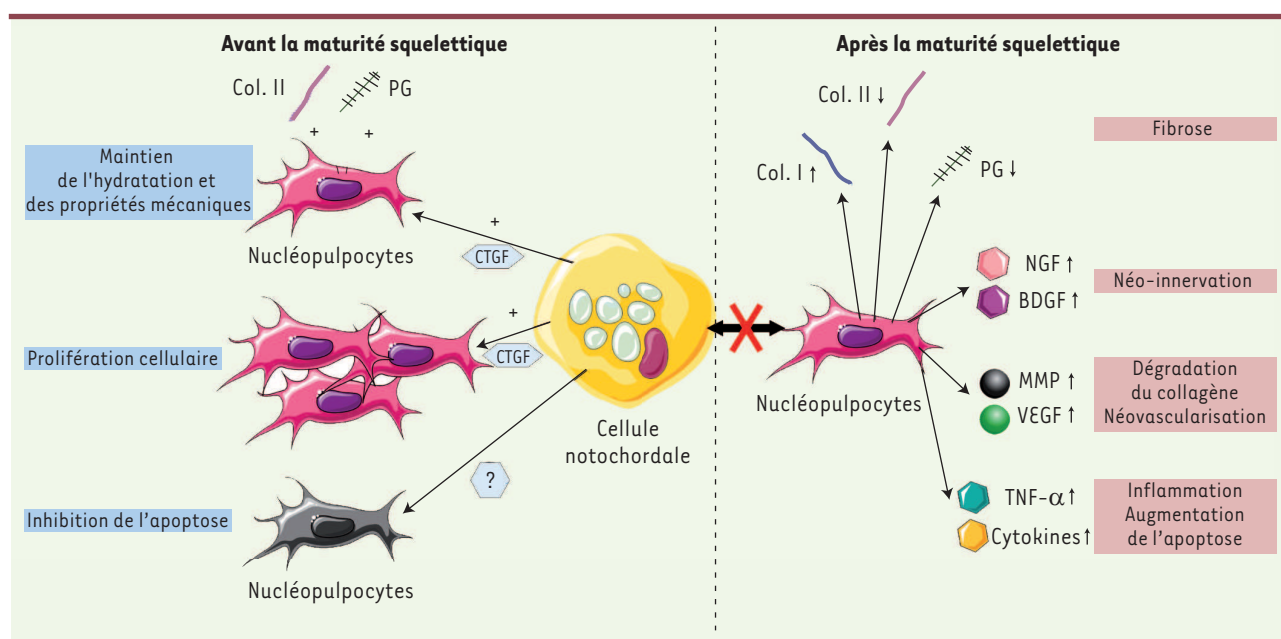


Figure 2. Dialogue moléculaire entre les cellules notochordales et les nucléopulpecytes. Les cellules notochordales, présentes dès la formation du DIV, favorisent la prolifération des nucléopulpecytes et la synthèse d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en eau, en collagène de type II et en protéoglycanes.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

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

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

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

Le disque intervertébral dégénéré

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

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

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

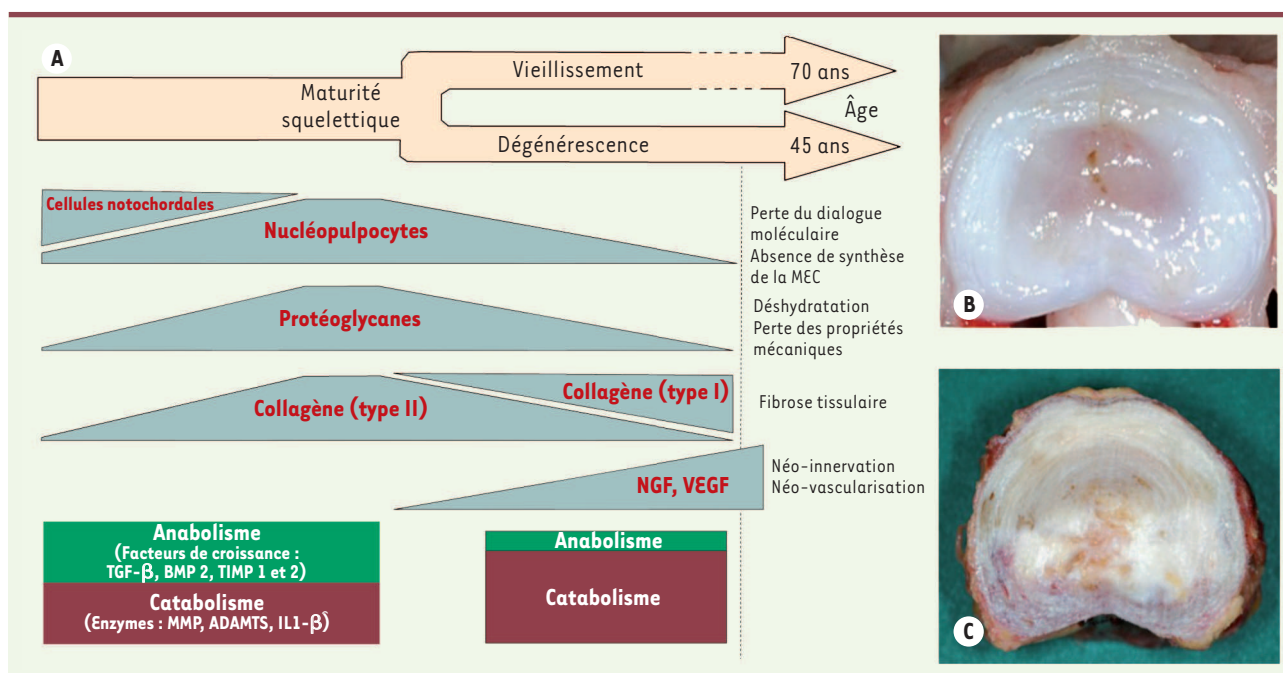


Figure 3. La dégénérescence discale. **A.** Représentation schématisée de l'évolution des composants du DIV au cours de la dégénérescence discale. **B.** Vue macroscopique d'un DIV sain (hautement hydraté). **C.** Vue macroscopique d'un DIV dégénéré (déshydraté et fibrotique). MEC : matrice extracellulaire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

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

La médecine régénératrice du disque intervertébral : contexte et résultats actuels

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

La thérapie cellulaire

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

Les différentes sources cellulaires

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

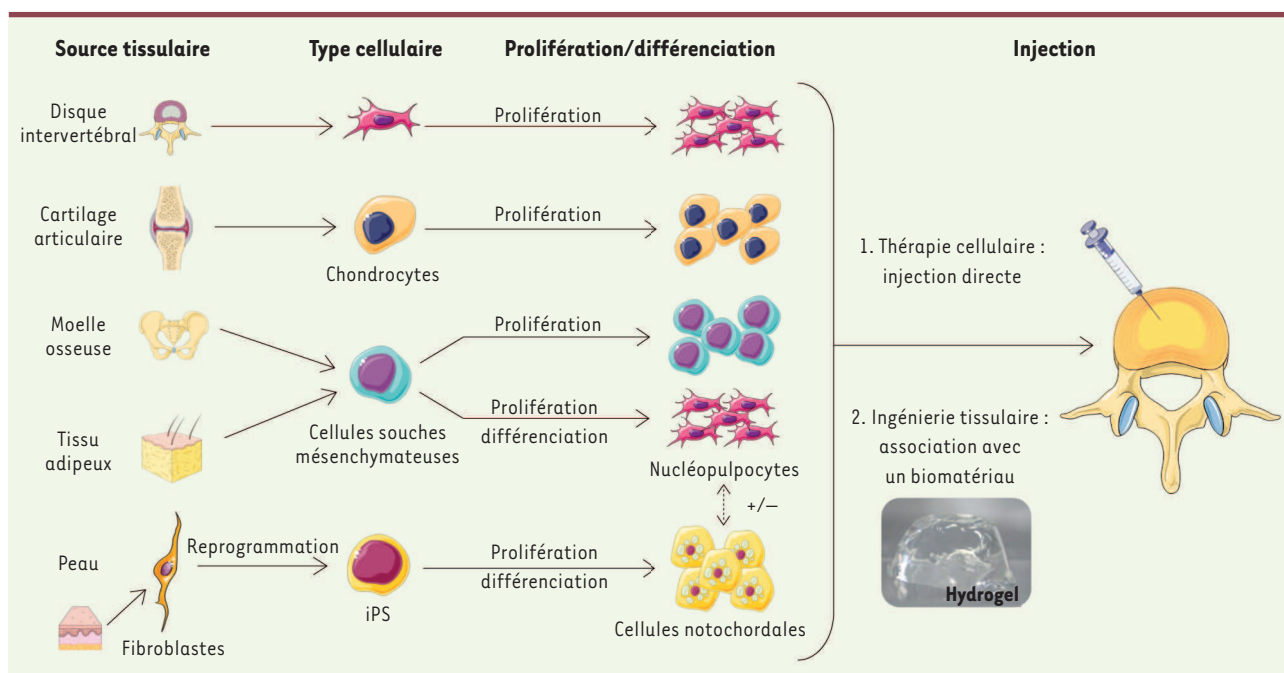


Figure 4. Médecine régénératrice : de la thérapie cellulaire à l'ingénierie tissulaire. Le principe de la thérapie cellulaire repose sur l'injection *in situ* d'un ou plusieurs types de cellules, différenciées ou non. L'ingénierie tissulaire fait appel à un biomatériau qui permet de protéger les cellules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

En effet, il a été démontré que les CSM présentent des propriétés immunogéniques faibles [16, 25]. De plus, l'environnement discal constitue un site immunoprivilégié qui pourrait limiter ce risque [26].

L'utilisation de cellules autologues peut également être envisagée mais pourrait conduire à une augmentation des coûts de production par rapport à la production des cellules régénératrices d'origine allogénique. L'harmonisation des procédés entre les établissements sera également un élément à surveiller. Dans les deux cas, et conformément au statut des MTI, l'obtention d'une autorisation des établissements pharmaceutiques sera nécessaire et ils devront se doter de procédures et de lieux adaptés à la manipulation des cellules.

Thérapie cellulaire : résultats cliniques actuels

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

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

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

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

L'ingénierie tissulaire

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

Rôles du biomatériau

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

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

multiples biomatériaux avec des propriétés biomécaniques variées [34].

Propriétés des biomatériaux

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ingénierie tissulaire : résultats actuels

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

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

Conclusion

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

SUMMARY

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

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

LIENS D'INTÉRÊT

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

REMERCIEMENTS

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

RÉFÉRENCES

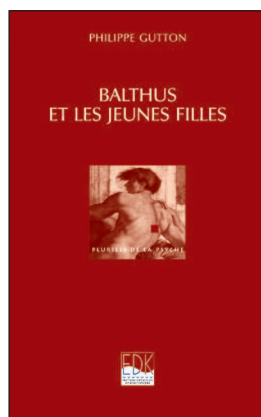
- Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain : socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am* 2006 ; 88 : 21-4.
- Clouet J, Vinatier C, Merceron C, et al. The intervertebral disc : from pathophysiology to tissue engineering. *Joint Bone Spine* 2009 ; 76 : 614-8.
- Lee CR, Sakai D, Nakai T, et al. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J* 2007 ; 16 : 2174-85.
- Clouet J, Grimandi G, Pot-Vaucel M, et al. Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes. *Rheumatology* 2009 ; 48 : 1447-50.
- Sakai D, Nakai T, Mochida J, et al. Differential phenotype of intervertebral disc cells : microarray and immunohistochemical analysis of canine nucleus pulposus and anulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009 ; 34 : 1448-56.
- Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, et al. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum* 2010 ; 62 : 3695-705.
- McCann MR, Tamplin OJ, Rossant J, Seguin CA. Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse : implications for intervertebral disc development. *Dis Model Mech* 2012 ; 5 : 73-82.
- Choi KS, Cohn MJ, Harfe BD. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse : implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev Dyn* 2008 ; 237 : 3953-8.
- Peacock A. Observations on the postnatal structure of the intervertebral disc in man. *J Anat* 1952 ; 86 : 162-79.
- Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am* 2006 ; 88 Suppl 2 : 10-4.
- Erwin WM, Ashman K, O'Donnel P, Inman RD. Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2006 ; 54 : 3859-67.
- Hohaus C, Ganey TM, Minkus Y, Meisel HJ. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. *Eur Spine J* 2008 ; 17 Suppl 4 : 492-503.
- Acosta FL, Jr, Metz L, Adkisson HD, et al. Porcine intervertebral disc repair using allogeneic juvenile articular chondrocytes or mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2011 ; 17 : 3045-55.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; 284 : 143-7.
- Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells : sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013 ; 13 : 392-402.
- Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells : immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 2014 ; 32 : 252-60.
- Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, et al. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *Eur Cell Mater* 2011 ; 21 : 533-47.
- Korecki CL, Taboas JM, Tuan RS, Iatridis JC. Notochordal cell conditioned medium stimulates mesenchymal stem cell differentiation toward a young nucleus pulposus phenotype. *Stem Cell Res Ther* 2010 ; 1 : 18.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861-72.
- Coulombel L. Cellules iPS humaines : déjà ! *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 102-4.
- Song P, Inagaki Y, Sugawara Y, Kokudo N. Perspectives on human clinical trials of therapies using iPS cells in Japan : reaching the forefront of stem-cell therapies. *Biosci Trends* 2013 ; 7 : 157-8.
- Tang X, Jing L, Chen J. Changes in the molecular phenotype of nucleus pulposus cells with intervertebral disc aging. *PLoS One* 2012 ; 7 : e52020.
- Chen J, Lee EJ, Jing L, et al. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) into nucleus pulposus-like cells in vitro. *PLoS One* 2013 ; 8 : e75548.
- Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, et al. Reply : The C-CURE randomized clinical trial (cardioprotective stem cell therapy in heart failure). *J Am Coll Cardiol* 2013 ; 62 : 2454-6.
- Goldschlager T, Jenkin G, Ghosh P, et al. Potential applications for using stem cells in spine surgery. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010 ; 5 : 345-55.
- Sun Z, Zhang M, Zhao XH, et al. Immune cascades in human intervertebral disc : the pros and cons. *Int J Clin Exp Pathol* 2013 ; 6 : 1009-14.
- Li X, Lee JP, Balian G, Greg Anderson D. Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in co-cultures with nucleus pulposus. *Connect Tissue Res* 2005 ; 46 : 75-82.
- Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease. *Eur Spine J* 2008 ; 17 Suppl 4 : 452-8.
- Coric D, Pettine K, Sumich A, Boltes MO. Prospective study of disc repair with allogeneic chondrocytes presented at the 2012 Joint Spine Section Meeting. *J Neurosurg Spine* 2013 ; 18 : 85-95.
- Haufe SM, Mork AR. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs. *Stem Cells Dev* 2006 ; 15 : 136-7.
- Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, et al. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation : a report of two case studies. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010 ; 35 : E475-80.
- Orozco L, Soler R, Morera C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells : a pilot study. *Transplantation* 2011 ; 92 : 822-8.

RÉFÉRENCES

33. Liang Y, Walczak P, Bulte JW. The survival of engrafted neural stem cells within hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials* 2013 ; 34 : 5521-9.
34. Iatridis JC, Nicoll SB, Michalek AJ, et al. Role of biomechanics in intervertebral disc degeneration and regenerative therapies : what needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair? *Spine J* 2013 ; 13 : 243-62.
35. Silva-Correia J, Correia SI, Oliveira JM, Reis RL. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotechnol Adv* 2013 ; 31 : 1514-31.
36. Leung VY, Tam V, Chan D, et al. Tissue engineering for intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am* 2011 ; 42 : 575-83.
37. Vinatier C, Magne D, Weiss P, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005 ; 26 : 6643-51.
38. Collin EC, Grad S, Zeugolis DI, et al. An injectable vehicle for nucleus pulposus cell-based therapy. *Biomaterials* 2011 ; 32 : 2862-70.
39. Cheng YH, Yang SH, Su WY, et al. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration : an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 2010 ; 16 : 695-703.
40. Huang B, Li CQ, Zhou Y, et al. Collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer scaffold for nucleus pulposus tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010 ; 92 : 322-31.
41. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 2006 ; 27 : 335-45.
42. Ruan DK, Xin H, Zhang C, et al. Experimental intervertebral disc regeneration with tissue-engineered composite in a canine model. *Tissue Eng Part A* 2010 ; 16 : 2381-9.
43. Huang B, Zhuang Y, Li CQ, et al. Regeneration of the intervertebral disc with nucleus pulposus cell-seeded collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer constructs in a rabbit disc degeneration model. *Spine (Phila Pa 1976)* 2011 ; 36 : 2252-9.
44. Mehrkens A, Muller AM, Valderrabano V, et al. Tissue engineering approaches to degenerative disc disease-a meta-analysis of controlled animal trials. *Osteoarthritis Cartilage* 2012 ; 20 : 1316-25.
45. Chabannon C, Sabatier F, Rial-Sebbag E, et al. Les unités de thérapie cellulaire à l'épreuve de la réglementation sur les médicaments de thérapie innovante. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 576-83.

TIRÉS À PART

J. Guicheux



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

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

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

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



BON DE COMMANDE

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

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

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

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDK**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n°

Signature :

Date d'expiration :

N° de contrôle au dos de la carte :

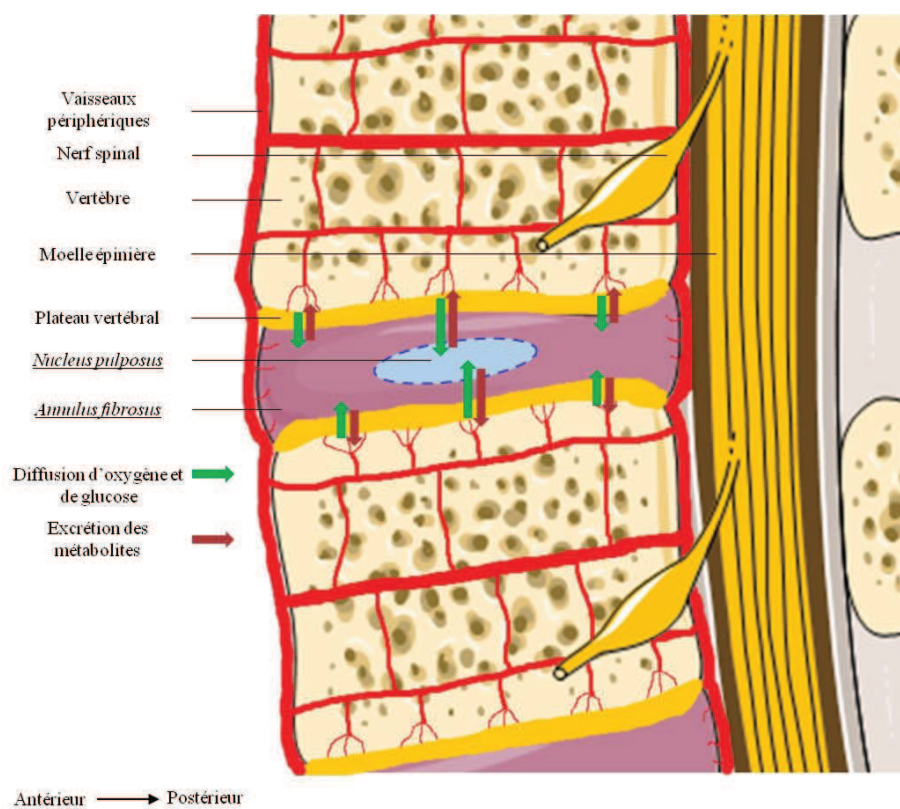


Figure 7 : Vascularisation des disques intervertébraux

4. Vascularisation

Le disque intervertébral est le tissu avascularisé le plus volumineux de l'organisme. Les vaisseaux sanguins les plus proches sont localisés à proximité des ligaments longitudinaux à la périphérie de l'AF (Figure 7), dans les vertèbres et plateaux vertébraux. Les plus petits vaisseaux possèdent une orientation horizontale faisant le tour du DIV^{23,57}. Avec l'âge, cette vascularisation est néanmoins perdue dans les plateaux vertébraux, limitant la possibilité de diffusion des molécules⁵⁸.

Cette absence de vascularisation au sein du DIV conduit à des conditions environnementales particulières telles qu'une quantité limitée de nutriments et une faible tension en oxygène. Cette tension en oxygène est en effet évaluée à 1% dans le DIV (hypoxie), contre 2 à 7% dans le cartilage⁵⁹ et jusqu'à 16% dans d'autres tissus (normoxie) tels que les alvéoles pulmonaires⁶⁰. Les cellules au centre du DIV peuvent ainsi se trouver à une distance de 6 à 8 mm du vaisseau sanguin le plus proche et donc de la source d'oxygène la plus proche⁶¹. Cette hypoxie conduit à un stress cellulaire important⁶² qui est retrouvé dans de nombreuses pathologies telles que l'ischémie cérébrale, le cancer ou des maladies dégénératives chroniques⁶³. Dans ces conditions environnementales, les cellules du NP ont développé des adaptations métaboliques en utilisant notamment la glycolyse anaérobie pour la production d'énergie. Cette glycolyse anaérobie mène à la formation d'adénosine triphosphate (ATP) sans utilisation d'O₂ et s'accompagne d'une acidification du milieu extracellulaire par la formation d'acide lactique⁶⁴. Par ailleurs, et en réponse à ces conditions hypoxiques, les voies de signalisation dépendantes des facteurs induits par l'hypoxie (HIF)⁶⁵ sont activées. Cette famille compte plusieurs protéines telles que HIF-1, HIF-2, et HIF-3. Ces protéines sont des hétérodimères (basic helix-loop-helix-PAS) composées d'une sous-unité α , et d'une sous-unité β connue comme étant un récepteur transnucléaire ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator)⁶⁰. En condition hypoxique, les sous-unités α s'accumulent et sont transférées au noyau où elles dimérisent avec les sous-unités β pour se lier ensuite à un élément amplificateur HRE (Hypoxia Response Element) de l'ADN et ainsi activer les gènes de réponse à l'hypoxie (Figure 8)^{66,67}.

La dégradation de HIF-1 α dans des conditions normoxiques au sein du cartilage a été décrite et n'est pas retrouvée au sein des cellules du NP, soulignant ainsi l'adaptation des cellules du DIV à leur environnement⁶⁸.

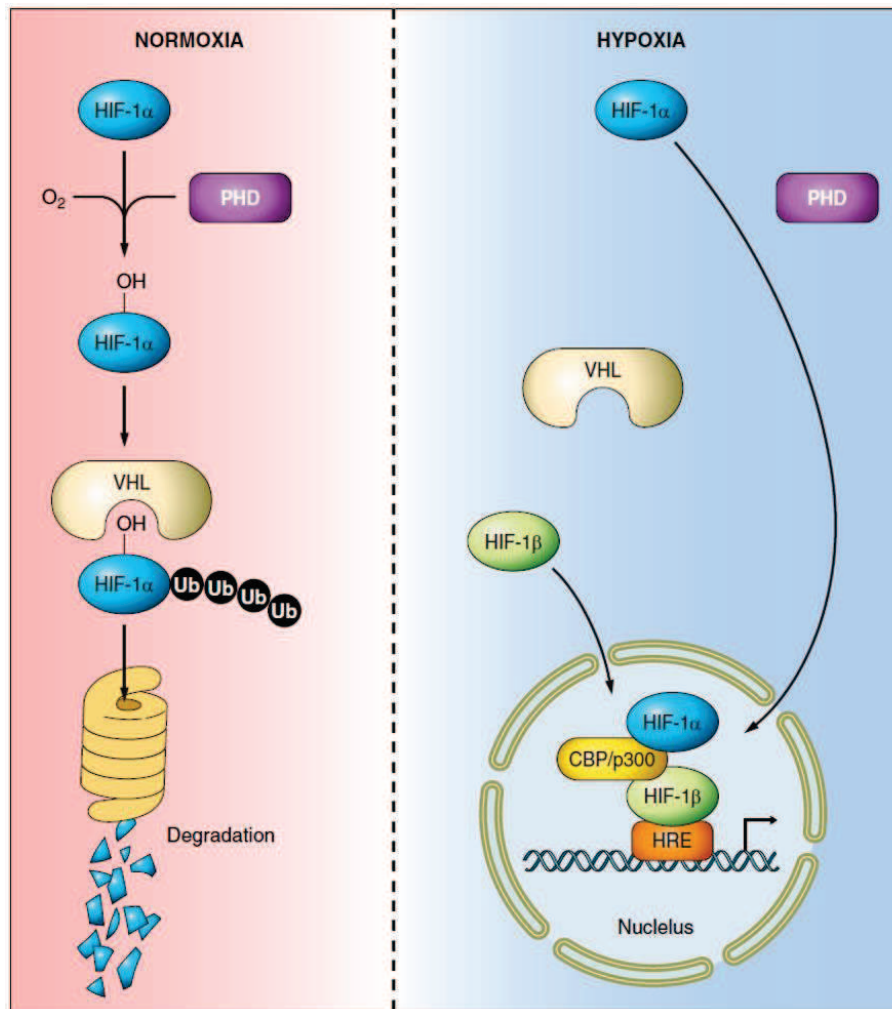


Figure 8 : Représentation schématique de la régulation de HIF-1 α
(d'après Shimoda et al., J Appl Physiol, 2012)

En condition normoxique, la protéine PHD (prolyl hydroxylase domain) utilise l'oxygène moléculaire comme substrat pour l'hydroxylation de HIF-1 α . HIF-1 α hydroxylé se lie à la protéine VHL (von Hippel-Lindau), devient polyubiquitylé (Ub) et est ensuite dégradé par le protéasome. En condition hypoxique, l'activité de PHD est limitée, HIF-1 α échappe à l'hydroxylation, s'accumule et est transféré au noyau où il se lie avec HIF-1 β et CBP/p300 sur l'élément amplificateur HRE (hypoxia response element)³⁸².

5. Privilège immunitaire

Comme un faible nombre d'autres tissus et organes (testicules, cerveau, ...) ⁶⁹⁻⁷², le NP est un site dit "immuno-privilégié". Ce terme désigne l'incapacité d'un tissu ou organe à provoquer une réaction immunitaire ou un rejet lors de l'implantation d'un greffon ⁶⁹. Ce privilège immunitaire permettrait de protéger des structures vitales qui pourraient être lésées lors d'une réaction inflammatoire. Il se traduit notamment par une réaction auto-immune de l'organisme lorsque le tissu est exposé au système immunitaire. En effet, cette réaction a été bien documentée lors de hernies discales ⁷³⁻⁷⁵. Le traumatisme peut entraîner une exposition des composants du DIV dans la circulation sanguine induisant la production d'anticorps auto-immun ⁷⁶ et une inflammation chronique. L'étude de cellules issues de tissus immuno-privilégiés a mis en évidence, de façon constitutive et localement, la présence de FasL (Apolipoprotéine 1 - Ligand), protéine transmembranaire de type II appartenant à la famille du TNF ⁷⁷⁻⁷⁹. FasL est exprimé par les cellules T activées, les cellules NK, les cellules tumorales et les cellules des sites immuno-privilégiés ^{80,81}. Il est capable de se fixer à Fas, une protéine transmembranaire de type I qui est exprimée par de très nombreux types cellulaires. La liaison de Fas avec FasL induit l'apoptose *via* des voies de signalisations qui ne seront pas développées ici mais qui sont présentées Figure 13. Différents niveaux de FasL ont été détectés dans des NP de DIV, dégénérés ou non. Le complexe Fas-FasL jouerait ainsi un rôle dans le maintien du privilège immunitaire du NP ⁷⁷.

Par ailleurs, le privilège immunitaire du DIV a été illustré par des études de thérapie génique utilisant des adénovirus. Ces études ont montré une expression de prolongée du transgène, contrairement à ce qui est observé lors de la transfection dans d'autres organes ou tissus "immunocompétents" ^{82,83}.

Le privilège immunitaire est donc une propriété majeure du DIV et est considéré avec intérêt pour son implication potentielle dans le processus dégénératif du DIV. En effet, l'absence de réaction antigénique constitue un avantage pour la mise en œuvre de certains traitements innovants, impliquant notamment l'utilisation de cellules allogéniques, et qui seront développés plus bas.

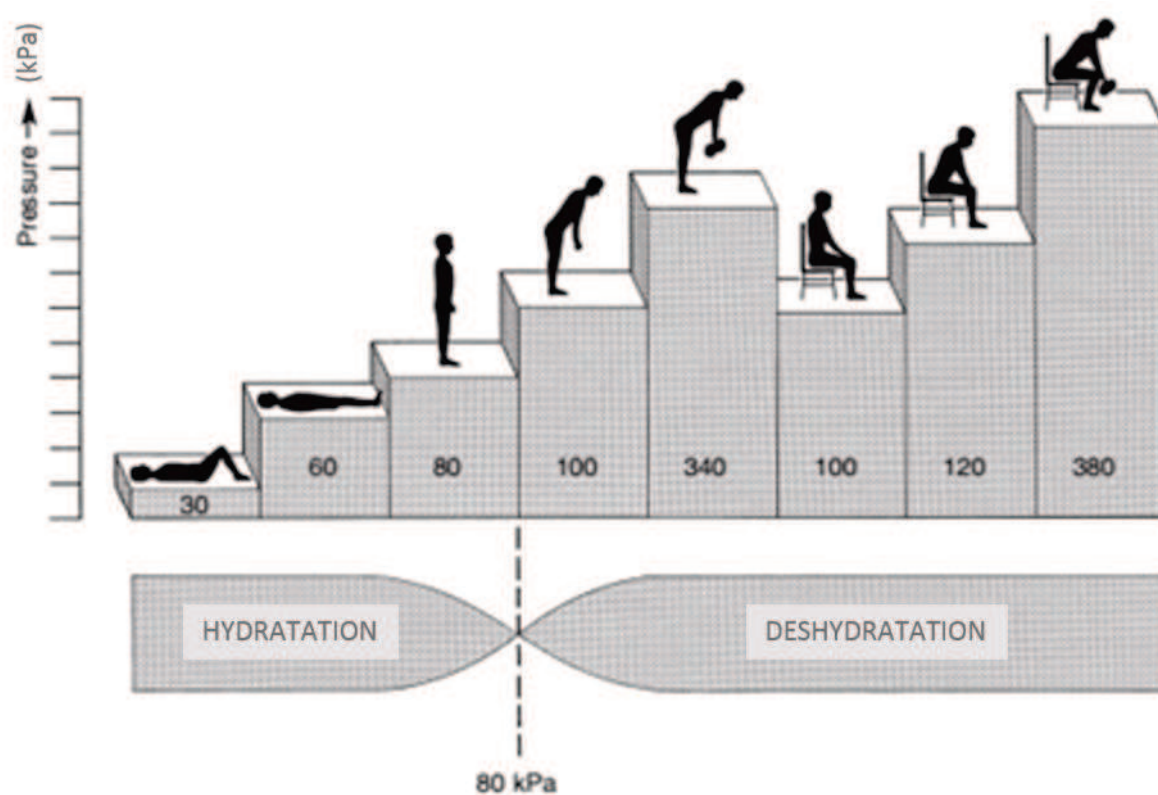


Figure 9 : Pression intradiscale et état d'hydratation du disque intervertébral en fonction de la position du corps (D'après Nachemson et al. 1981³⁸³)

6. *Fonctions*

Le DIV est un amortisseur et un répartiteur des chocs et contraintes en compression et en tension transmises par les vertèbres. La présence de courbures alternées tout au long de la colonne permettrait de multiplier par 10 sa résistance à la compression².

Les corps vertébraux peuvent supporter d'importantes charges (jusqu'à 600 kg) et s'adaptent localement aux contraintes en augmentant en volume et en surface, des cervicales vers les lombaires. L'organisation architecturale de l'os permet la dispersion des contraintes vers les processus articulaires mais également vers les DIV⁵. Le NP transmet les charges à l'AF sous forme de contraintes radiales et tangentielles. Par ce mécanisme, le NP et l'AF interne subissent une compression, tandis que les fibres de l'AF externe se trouvent en tension. L'AF, de par sa structuration, apporte naturellement une résistance aux contraintes de flexion, torsion et cisaillement.

Le NP, grâce à sa nature très hydratée, est un tissu déformable mais incompressible et supporte 75% des contraintes en compression. Il peut légèrement se déplacer d'avant en arrière et latéralement au cours des mouvements. Sous l'effet du poids, il s'écrase et son taux d'hydratation diminue, entraînant alors une perte de hauteur allant jusqu'à 2 cm sur l'ensemble de la colonne vertébrale. Le degré d'hydratation au sein du DIV n'est donc pas constant mais dépend de la pression externe appliquée (Figure 9). En position couchée, les contraintes sont plus faibles, le DIV s'hydrate et s'enrichit en substances nutritives. En position debout, l'eau est chassée dans les tissus environnants jusqu'à obtention d'un équilibre osmotique. Sous compression prolongée (position debout avec une charge en mains), le NP peut perdre jusqu'à 20% d'eau qui s'accompagne d'une diminution de sa hauteur. Lorsque la charge est diminuée, le DIV réabsorbe le liquide pour atteindre un nouvel équilibre osmotique. Au regard de ces échanges d'eau, le DIV présente des propriétés viscoélastiques importantes⁸⁴.

L'intégrité structurelle de la MEC conditionne la bonne résistance du DIV aux contraintes qu'il subit puisque c'est elle, au sein du NP, qui absorbe les forces de compression et qui garantit la bonne hydratation du DIV.

Le renouvellement de ses constituants représente donc un élément critique dans le maintien des propriétés biomécaniques du DIV. Dans le cas d'un DIV jeune non pathologique, il est estimé que l'agrécan et le collagène ont des temps de demi-vie ($T_{1/2}$) respectifs de 12 ans et 80 ans^{43,85}. Ce $T_{1/2}$ s'allonge avec l'âge impliquant une dégradation et un renouvellement plus lent des éléments de la MEC. A l'inverse dans un DIV dégénéré, ce $T_{1/2}$ est plus court, indiquant une dégradation accélérée des éléments de la MEC. Ces modifications s'accompagnent d'une altération des propriétés viscoélastiques du DIV, qui devient plus rigide et absorbe moins bien les contraintes. Ces observations expliquent la place importante que prennent actuellement les études de mécano-biologie dans l'étude de la physiopathologie discale. Elles ont notamment permis de mieux comprendre les interactions entre les stimuli mécaniques et les processus biologiques qui en découlent⁸⁶ et ont mis en évidence que les réponses du tissu dépendent des contraintes appliquées (magnitude, durée, fréquence, point d'impact au niveau du NP...) ⁸⁷⁻⁸⁹.

Les DIV ont également un rôle dans la mobilité de la colonne, dans les 6 degrés de liberté (compression, cisaillement antéropostérieur et latéral, flexion, extension et torsion). L'amplitude totale de mouvement en flexion est en moyenne de 110°, de 35° en extension, de 75° en inclinaison de chaque côté et 90° en rotation⁵.

L'ensemble des données présentées ci-dessus permettent de décrire le DIV comme un tissu complexe dont l'intégrité répond au maintien de l'homéostasie de la MEC. En effet, la disparition des cellules notochordales, qui entraîne une rupture du dialogue cellulaire au sein du NP, constitue un stimulus essentiel qui conduira à la dégénérescence du DIV. Cette dégénérescence fera l'objet de développement dans la prochaine partie de ce manuscrit.

II. LA DEGENERESCENCE DU DISQUE INTERVERTEBRAL

1. *Epidémiologie*

Les douleurs liées à la colonne vertébrale sont des symptômes très communs et possèdent une prévalence de 54% à 80% au cours de la vie. La lombalgie se définit comme une douleur ou une gêne fonctionnelle, située entre la douzième côte et le pli fessier, associée ou non à des irradiations dans les membres inférieurs. La douleur est classée en fonction de sa durée comme aiguë (< 6 semaines), subaiguë (entre 6 et 12 semaines) ou chronique (>12 semaines). Parmi les patients souffrant de douleurs liées à la colonne vertébrale, il est estimé que 40% des situations de douleurs chroniques sont dues à des lombalgies^{1,90}. Par ailleurs, une étude plus globale sur la douleur réalisée aux Etats-Unis a montré que les zones douloureuses sont localisées pour 26,4% des cas au niveau de la région lombaire, pour seulement 13,8% des cas au niveau cervical⁹¹. Plus précisément, l'origine des douleurs se trouve la plupart du temps au niveau des étages des vertèbres L4-L5 et L5-S1⁹². Une autre étude publiée en 2005 a montré que les troubles liés à l'appareil musculo-squelettique avaient tendance à augmenter avec le temps⁹³, confortant ainsi des données plus anciennes qui avaient montré une augmentation des douleurs lombaires de 3,9% à 10,2% entre 1992 et 2006, aux Etats-Unis⁹⁴. De manière intéressante, il est actuellement estimé que 80% des DIV de la région lombaire présentent des anomalies après 70 ans⁹⁵.

La prévalence importante de la lombalgie dans la population des pays industrialisés fait de cette pathologie la seconde cause de consultation médicale⁹⁶. Les études épidémiologiques montrent que les douleurs lombaires sont plus fréquentes chez les personnes blanches et principalement chez les femmes⁹⁷⁻⁹⁹. Même si les symptômes sont souvent moins sévères, les enfants et adolescents peuvent également souffrir de douleurs lombaires¹⁰⁰. En 2002, en Allemagne, tous problèmes de dos confondus, ce sont près de 1,4 millions d'enfants (0 à 14 ans) et jeunes adultes (15 à 24 ans) qui étaient concernés¹⁰¹.

La lombalgie est une maladie d'origine multifactorielle, avec des facteurs de risques psychosociaux, professionnels, environnementaux^{90,97,102-104}, ou encore génétiques^{95,105}. En effet, des études chez la souris

et chez l'homme ont montré que le polymorphisme des gènes associés aux protéines structurales de la MEC telles que l'agrécan^{106,107}, le collagène de type II¹⁰⁸, le collagène de type IX ou XI^{109,110} peut amener à une dégénérescence discale. Les mêmes conclusions ont été obtenues lors de l'étude d'autres constituants de la MEC du NP¹¹¹. Par ailleurs, l'étude des mutations géniques associés à des interleukines (IL-1, IL-6)¹¹²⁻¹¹⁴, à des enzymes de dégradation de la matrice (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9¹¹⁵⁻¹¹⁸) ou de la vitamine D^{109,115} a montré leur implication dans la dégénérescence du DIV¹¹⁹. L'ensemble de ces données confirme l'origine multigénique de la dégénérescence discale, puisqu'il semble hautement improbable que le polymorphisme d'un seul de ces gènes soit à l'origine de tous les effets observés.

La lombalgie est associée à un impact économique, social et sanitaire important avec un coût estimé de plus de 100 milliards par an de dollars aux Etats-Unis^{90,120-122}. Grâce à de récentes études, la compréhension de la physiopathologie discale s'est largement améliorée et il existe de plus en plus de preuves que la lombalgie serait liée à une dégénérescence du disque intervertébral^{96,123}. Cette dégénérescence serait ainsi à l'origine de 40% des lombalgies^{103,124}.

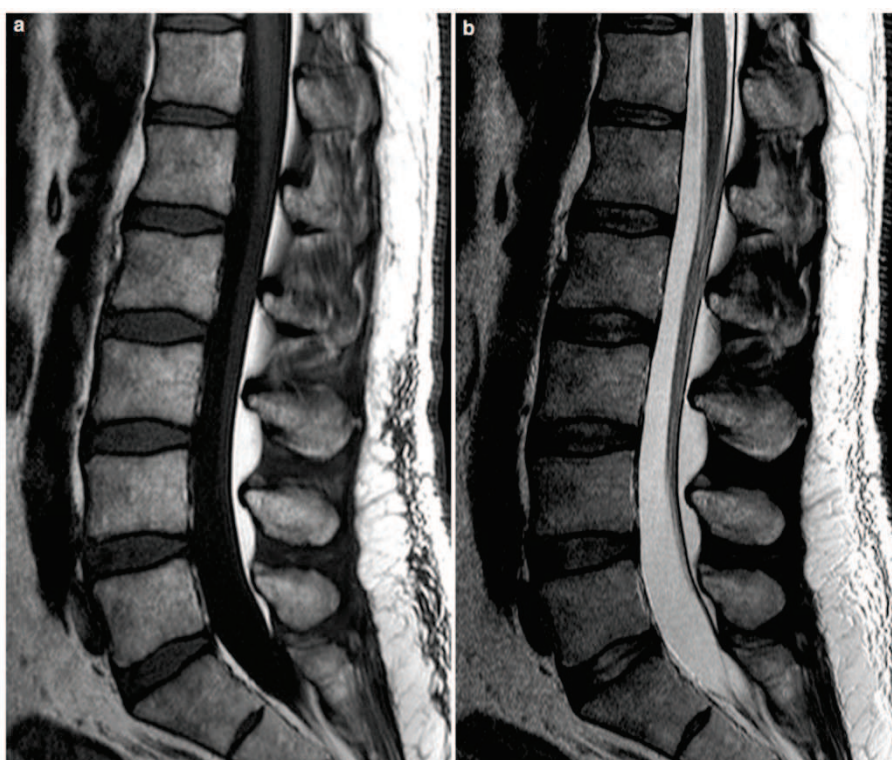


Figure 10 : Comparaison d'images de colonnes vertébrales obtenues en IRM par des pondérations en T1 (a) et T2 (b) (d'après Wilmink, *Lumbar Spinal Imaging in Radicular Pain and Related Conditions*, 2010³⁸⁴)

2. Dégénérescence discale et imagerie

La dégénérescence discale à un stade avancé peut se manifester cliniquement par des radiculopathies, sténoses spinales ou hernies¹²⁵. Bien que selon certaines études, il est très difficile de relier des modifications structurales imagées avec le tableau clinique décrit par le patient¹²⁶, les techniques d'imageries ont permis de faire progresser le diagnostic des lombalgies symptomatiques. En effet, la dégénérescence discale peut être évaluée par radiographie, scanner et imagerie par résonance magnétique (IRM). La radiographie permet une analyse de critères indirects de cette dégénérescence, notamment la hauteur discale. Le scanner permet d'évaluer la morphologie du DIV, d'apprécier sa densité et d'éliminer une origine non dégénérative des douleurs lombaires. Néanmoins, au contraire de l'IRM, ces deux techniques d'imagerie ne permettent pas la discrimination véritable des DIV sains et dégénérés. En IRM, deux pondérations du signal (T1 et T2) sont utilisables et complémentaires puisqu'elles mettent en évidence des éléments différents d'un même tissu. Une pondération en T1 permet de mettre les vertèbres en évidence tandis que la pondération en T2 est très utilisée pour étudier l'état d'hydratation des DIV (Figure 10). En cas de dégénérescence du DIV la perte d'hydratation se traduit par une perte du signal en T2.

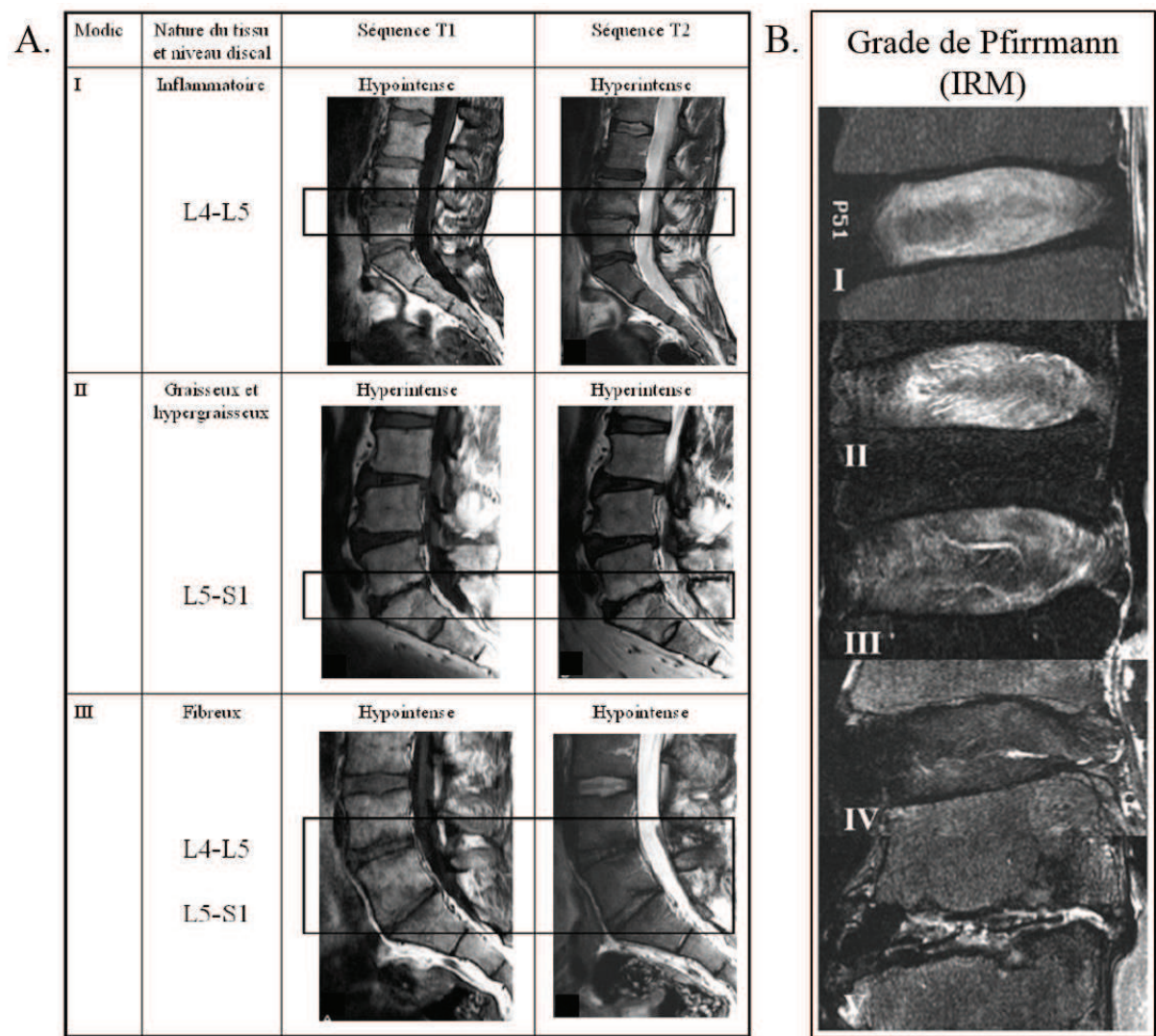
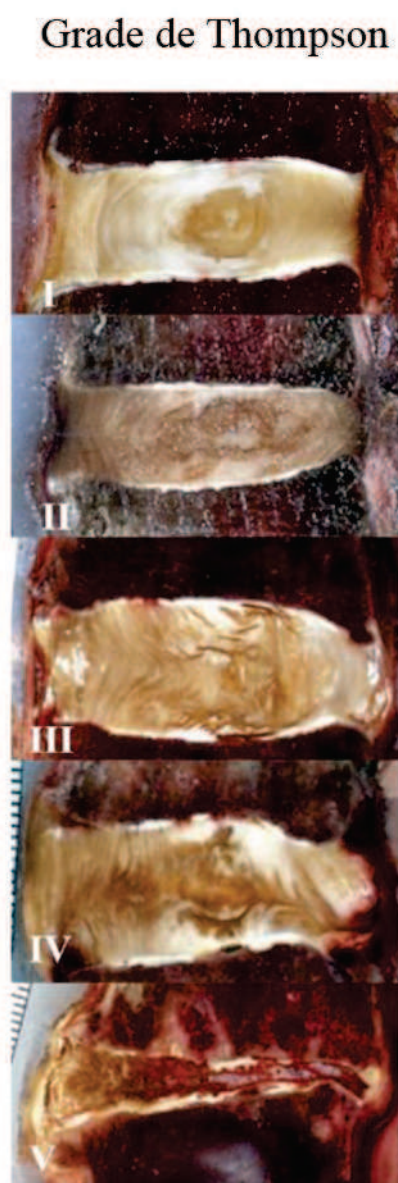


Figure 11 : Classifications de la dégénérescence discale basées sur l'IRM.
A. Classification de Modic (Source iconographique : Dr Joëlle Glemarec, Service de rhumatologie, CHU de Nantes) et B. Classification de Pfirrmann (d'après Zhang et al., PM&R, 2011)⁵¹

Plusieurs classifications de la dégénérescence discale ont été proposées. Notamment, l'analyse conjointe des images IRM en T1 et T2 permet d'obtenir le classement du Modic¹²⁷, qui comporte trois niveaux (Figure 11A). Parmi les patients qui présentent des signes de dégénérescence à l'IRM, cette classification est utilisée par les cliniciens pour distinguer les patients symptomatiques des patients asymptomatiques. Si des études ont montré que beaucoup de patient présentant une dégénérescence discale à l'IRM étaient asymptomatiques, le groupe Modic I semble rassembler les patients présentant des lombalgies d'origine dégénérative. Il est donc nécessaire d'associer le tableau clinique global à l'imagerie avant d'envisager tout traitement¹²⁸⁻¹³¹. Une autre classification, la classification de Pfirrmann, a été proposée en 2001 et repose sur l'étude de plusieurs signes sur les IRM en T2¹³² (Figure 11B). Cette classification, comportant cinq grades, permet d'étudier la structure du DIV, l'état de séparation entre le NP et l'AF, l'intensité du signal et la réduction de la hauteur discale de manière standardisée (Table 1) et de limiter ainsi les biais lors de l'attribution des grades^{133,134}.

Table 1 : Classification de Pfirrmann selon l'étude de plusieurs paramètres à partir d'IRM en T2 (d'après Pfirrmann et al., 2001¹³²)

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



*Figure 12 : Classification de Thompson
(d'après Zhang et al., PM&R, 2011)⁵¹*

3. Physiopathologie

La dégénérescence discale correspond au vieillissement accéléré des DIV. En effet, bien que l'âge soit un facteur de risque important dans le développement de cette dégénérescence, la distinction entre dégénérescence et vieillissement a été clairement établie¹²⁵.

Des points de vue macroscopiques et histologiques, la classification de Thompson permet la hiérarchisation de la dégénérescence discale (Figure 12) selon l'observation de chacun des éléments du DIV ainsi que des corps vertébraux (VB) (Table 2). Au cours de ce processus, les NP sont affectés en premiers suivi des AF¹³⁵. Les modifications engendrées impliquent un changement dans le ratio collagène I/collagène II. L'augmentation de la quantité de collagène de type I non organisé, au détriment du collagène de type II, est à l'origine de l'aspect fibreux qui apparaît dans le DIV dégénéré et induit une perte des propriétés mécaniques du DIV¹²¹. Le DIV est alors moins souple et perd sa capacité à dissiper les forces et les contraintes qui lui sont appliquées⁴⁰.

*Table 2 : Classification de Thompson à partir de vues macroscopiques
(d'après Thompson et al., 1990¹³⁵)*

Grade	NP	AF	EP	VB
I	Homogène hydraté	Lamelles fibreuses bien définies	Epaisseur régulière	Extrémités arrondies
II	Tissu périphérique fibreux blanc	Matière muqueuse entre les lamelles	Epaisseur irrégulière	Extrémités pointues
III	Tissu fibreux	Matière muqueuse entre les lamelles Perte de la frontière NP/AF	Défauts focaux dans le cartilage	Présence d'ostéophytes
IV	Présence de crevasses parallèles aux EP	Ruptures focales	Sclérose focalisé de l'os sous-chondral	Ostéophytes < 2 mm
V	Présence de crevasses parallèles aux EP		Sclérose diffuse de l'os sous-chondral	Ostéophytes > 2 mm

En parallèle, la quantité de PG et autres protéines de la MEC diminue, ce qui contribue à la déshydratation et perte de hauteur discale. Ces glycoprotéines sont dégradées par des protéinases et des matrix metalloproteinases (MMPs). Les MMPs sont des enzymes de dégradation de la MEC et il a été démontré que les DIV dégénérés sont riches en MMPs (1,2,3,7,8)^{96,136,137}. Les MMP-1 et MMP-3 (collagénases), la MMP-2 (gélatinase) ainsi que les ADAMTs sont directement impliquées dans la dégradation des protéines de la MEC, notamment de l'agrécan et des collagènes de type I, II, IV et V¹³⁸. De plus, certaines cytokines telles que l'interleukine-1 (IL-1) et le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) affectent le métabolisme du DIV. Ces cytokines augmentent le catabolisme de la MEC *via* la stimulation de l'expression de MMPs et d'autres médiateurs inflammatoires (IL-6, IL-8 et prostaglandine E₂ (PGE₂)), ainsi que de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et de Neural Growth Factor (NGF). En réaction aux MMPs, les cellules du DIV produisent des tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)¹³⁹. Les TIMPs se fixent de manière covalente aux MMPs inhibant ainsi leur action. Il a été montré que TIMP-1 stimule la production de PG¹⁴⁰.

A mesure que la dégénérescence progresse, la délimitation entre l'AF et le NP devient moins précise. Des craquelures ou déchirures peuvent apparaître au sein de la MEC du NP. De même, dans l'AF, le réseau de collagène perd en régularité ce qui peut conduire à des déchirures, se traduisant parfois par une hernie discale (protusion du NP)³⁹. Par ailleurs, la néo-vascularisation et néo-innervation du tissu discal sont deux éléments caractéristiques de la dégénérescence qui peuvent être une source de douleur chez le patient^{141–144}. Cette douleur peut également provenir du pincement de nerfs proches suite à la perte de hauteur discale.

Enfin, l'acidification du milieu discal au cours de la dégénérescence est également un élément clé. Cette chute du pH au sein du DIV contribue à l'établissement d'un environnement qui impacte la survie et la capacité sécrétoire des cellules, accélérant ainsi le processus dégénératif avec une altération qualitative et quantitative de la MEC¹⁴⁵. De plus, la dégénérescence discale s'accompagne d'une diminution de la pression osmotique, ainsi que de la densité cellulaire.

a. Rupture du dialogue cellulaire

L'intégrité du DIV dépend de l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme cellulaire. La rupture de cet équilibre est un processus bien décrit et particulièrement lié aux cellules présentes au sein du DIV. Ainsi, les premières manifestations de la dégénérescence discale coïncideraient avec la perte de l'homéostasie métabolique. L'implication de la disparition des cellules notochordales dans la rupture de l'homéostasie du NP, des PV et de l'AF a été montrée. En effet, certains facteurs sécrétés par les cellules notochordales protégeraient les nucléopulpecytes de l'apoptose¹⁴⁶. L'identification et la caractérisation de ces facteurs restent encore parcellaire. Ils inhiberaient l'expression d'enzymes de dégradation de la MEC dont le rôle dans la dégénérescence a été largement décrit^{147,148} (telles que MMP-3 vis-à-vis de la destruction des fibres de collagène) et assureraient le maintien de l'expression de facteurs restreignant l'activité des MMPs, tels que les TIMPs¹⁴⁹. De plus, il a été montré que l'expression de molécules connues pour leur rôle dans la néo-vascularisation et la néo-innervation du DIV, telles que le VEGF et les IL-6 et IL-8 est inhibé par ces facteurs synthétisés par les cellules notochordales¹⁵⁰. Ainsi, ces facteurs ont démontré leur effet inhibiteur vis-à-vis de la croissance de neurites à partir de cellules humaines¹⁵¹. Des analyses protéomiques sont actuellement en cours afin d'identifier l'ensemble de ces facteurs sécrétés par les cellules notochordales. Certains facteurs ont d'ores et déjà été caractérisés et sont présentés ci-dessous : le Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2), le Sonic hedgehog (Shh), le Transforming Growth Factor (TGF- β) et le Growth and Differentiation Factor 5 (GDF-5).

i. CTGF/CCN2

Les protéines de la famille CCN sont impliqués dans le processus de fibrose de nombreux organes (peau, cerveau, rein, vaisseaux sanguins, etc.)¹⁵². Particulièrement, le rôle de CTGF/CCN2 a été montré dans les processus de fibrose de plusieurs tissus^{153,154}. Le facteur CTGF/CCN2 joue un rôle majeur dans la maturation du NP et son accumulation a été démontrée pour les stades les plus avancés de dégénérescence discale chez l'homme, lorsque les cellules notochordales ont quasiment disparu¹⁵⁵. Une des hypothèses quant à

l'accumulation de CTGF/CCN2 repose sur son rôle dans l'arthrose et l'activation d'un mécanisme de réparation spontanée par les cellules du NP. Ce rôle serait modulé par la présence de cytokines pro-inflammatoires et d'enzymes de dégradation de la MEC¹⁵⁶⁻¹⁵⁸, en fonction du niveau de dégénérescence du DIV¹⁵⁹. Une étude *in vitro* a été réalisée sur des cellules isolées de NP humain présentant une dégénérescence modérée à sévère. De manière intéressante, pour les cellules issues des stades modérés de dégénérescence, la stimulation par du CTGF/CCN2 a montré une augmentation de l'expression de l'agrécan, du collagène de type II, et une diminution de l'expression du collagène de type I. Pour les stades les plus sévères, la stimulation par le CTGF/CCN2 entraîne au contraire une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Cette molécule pourrait donc être impliquée dans l'apparition de la fibrose au sein du NP pour des stades avancés de dégénérescence. L'expression de CTGF/CCN2 est notamment régulée par le TGF- β *via* la voie de signalisation Smad (Figure 13).

ii. TGF- β

Tout comme le CTGF/CCN2, le TGF- β est un facteur impliqué dans le dialogue cellulaire entre les cellules notochordales et les nucléopulpocytes. Son caractère anabolique a été mis en évidence par l'augmentation significative de la quantité de protéoglycanes et de collagène produits par les cellules du DIV en sa présence¹⁶⁰. TGF- β permet également de réduire la néo-vascularisation du DIV par l'inhibition de l'expression de CTGF/CCN2¹⁶¹. Enfin, TGF- β est un puissant inhibiteur de l'expression de Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) qui induit lui-même la surexpression de facteurs pro-inflammatoires tels que les MMPs¹⁶¹⁻¹⁶³. Ces données suggèrent le rôle clé du TGF- β dans le processus de dégénérescence discale.

iii. Shh

Le facteur Shh, sécrété par les cellules notochordales, possède un rôle clé au cours de la formation du DIV^{7,13} et son implication vis-à-vis de la différenciation et de la prolifération cellulaire a été montré. La voie de signalisation de Shh décline avec l'âge, parallèlement aux modifications morphologiques du DIV précédemment évoquées, et la perte de Shh entraîne une désorganisation du NP¹⁶⁴. Récemment, la

diminution de l'expression de Shh au cours du temps a été montrée chez la souris avec néanmoins un phénomène d'activation tardif, induisant une augmentation de la synthèse de collagène de type I, suggérant ainsi le rôle de Shh dans la fibrose du NP¹⁶⁵.

iv. GDF-5

Le Growth and Differentiation Factor-5 (GDF-5 ou BMP 14), membre de la famille des BMP, possède un rôle important dans plusieurs processus physiologiques des tissus musculo-squelettiques, tels que l'ossification endochondrale ou la formation des ligaments et tendons¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. En ce qui concerne les DIV, le GDF-5 joue un rôle majeur dans leur développement et une mutation du gène codant pour ce facteur entraîne des malformations chez la souris¹⁶⁹. Par ailleurs, son expression est stable, tant dans les DIV sains que dans les DIV en cours de dégénérescence¹⁷⁰, suggérant ainsi que la régulation de l'expression et de l'action du GDF-5 au sein du NP, échapperait au rétrocontrôle du dialogue cellulaire. Le GDF-5 participe au maintien post-natal de l'intégrité structurelle des DIV. En effet, il permet la stimulation de la prolifération et de l'activité anabolique des cellules du NP et de l'AF¹⁷¹ ainsi que la réduction de l'expression de MMPs, IL-1 β et TNF- α ^{172,173}. L'ensemble de ces données suggère le rôle pivot de ce facteur dans les processus de réparation activés par les cellules du DIV au cours de la dégénérescence. Le potentiel thérapeutique du GDF-5 sur la dégénérescence discale fait actuellement l'objet d'études préclinique et cliniques dont les résultats sont pour le moment mitigés^{171,174}. Enfin, l'implication majeure du GDF-5, associé au TGF- β 1, dans la différenciation de cellules souches/stromales issues du tissu adipeux humain, vers des cellules présentant un phénotype proche de celui des nucléopulpocytes natifs a récemment été démontrée^{175,176} suggérant son potentiel pour la médecine régénératrice du DIV.

b. Dégénérescence des plateaux vertébraux et de l'Annulus Fibrosus

Si le NP est le siège des premiers événements liés à la dégénérescence, le rôle des plateaux vertébraux et de l'AF dans la dégénérescence du DIV ne peut être négligé.

Le dépôt de cristaux de phosphate de calcium et la calcification de ces tissus sont notamment des éléments à prendre en compte¹⁷⁷. Ainsi, la différenciation des chondrocytes de la plaque cartilagineuse des PV en chondrocytes hypertrophiques entraîne la production d'une MEC calcifiée et riche en collagène de type X¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Cette modification des plateaux vertébraux entraîne une réduction de leurs capacités de nutrition et de diffusion des métabolites, pouvant conduire à une atteinte du tissu discal. L'augmentation de la porosité des plateaux vertébraux¹⁸¹ et la néo-vascularisation de ces tissus compensent en partie ces phénomènes, mais ne permettent pas de rétablir totalement la diffusion des nutriments. Il a par ailleurs été montré qu'en plus des modifications structurelles, les PV sont le siège de la synthèse de molécules inflammatoires lors de la dégénérescence^{182,183} qui induisent la dégradation de la MEC. Enfin, l'atteinte structurelle des plateaux vertébraux pourrait entraîner une fuite de molécules du NP dans l'organisme induisant alors une réaction auto-immune de l'organisme⁷³⁻⁷⁵.

La MEC de l'AF est également affectée lors de la dégénérescence discale conduisant à un tissu fibreux et calcifié¹⁸⁴. Ces modifications structurelles induiraient une perte des propriétés mécaniques et l'apoptose des cellules de l'AF. La production de facteurs inflammatoires tels que le TNF- α par ces cellules, suite à une exposition à de fortes contraintes mécaniques a été décrite¹⁸⁵, provoquant l'expression d'IL-6 et d'IL-8¹⁸⁶ ainsi qu'une néo-innervation¹⁸⁷.

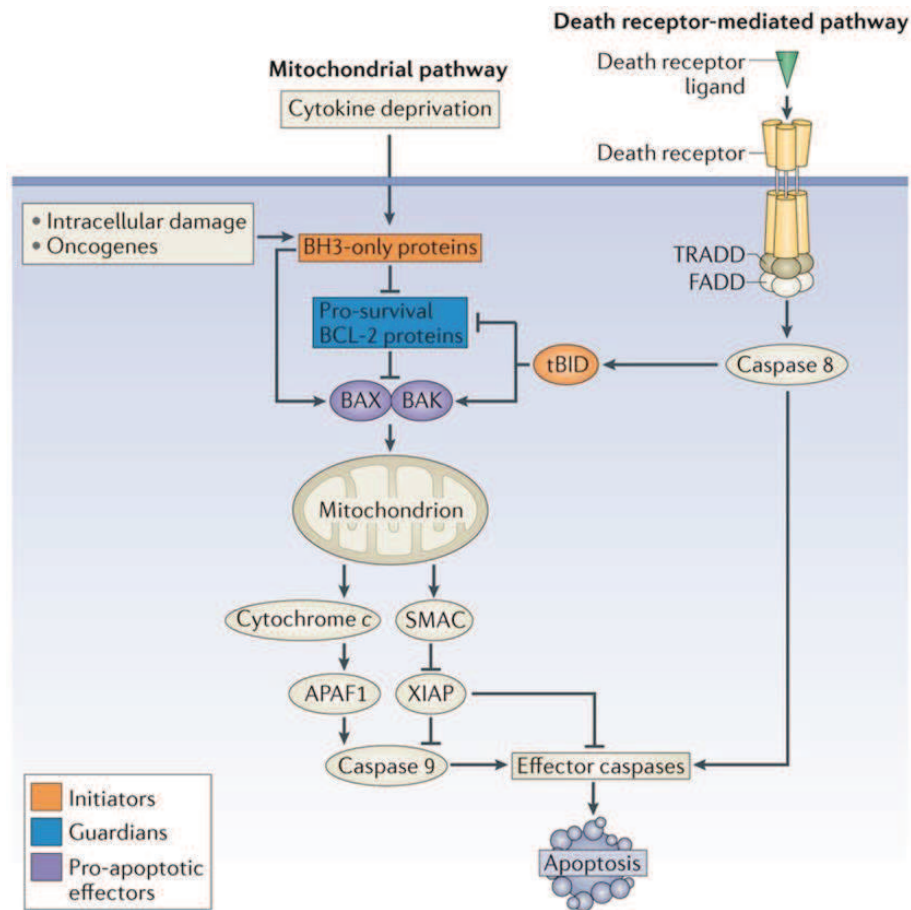


Figure 13 : Voies de signalisation de l'apoptose
(d'après Czabota et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2014³⁸⁵)

Les stimuli externes ou liés à la liaison Fas-FasL inhibent la protéine de survie BCL-2 permettant ainsi l'activation des effecteurs pro-apoptotiques BAX and BAK, qui détruisent ensuite la membrane mitochondriale externe. Le cytochrome c libéré promeut l'activation de la caspase 9 via APAF1 (apoptotic protease activating factor 1) tandis que SMAC (second mitochondria derived activator of caspases) bloque l'inhibiteur de caspase XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein). La voie de signalisation impliquant FasL engage l'activation de la caspase 8 via FADD (FAS-associated death domain protein) et TRADD (TNFR-associated death domain protein). La caspase 8 génère également tBID (truncated form of BID). Dans les deux cas, ces voies mènent à l'activation des caspases effectrices (caspases 3, 7 et 6) et à l'apoptose.

c. Apoptose, sénescence et autophagie

Au cours de la dégénérescence discale, le stress cellulaire augmente et modifie le comportement des cellules. En effet, la diminution des apports nutritifs, parallèlement à une accumulation des métabolites et une augmentation de l'inflammation induit des réponses cellulaires telles que l'apoptose, la sénescence ou l'autophagie.

i. Apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire déclenché par les cellules elles-mêmes en réponse à un signal, tel que la réduction de la nutrition dans les plateaux vertébraux¹⁹¹. Ce processus cellulaire hautement régulé est un phénomène de mieux en mieux documenté dans la dégénérescence discale¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ et qui possède deux voies : la voie dépendante des mitochondries dite « intrinsèque » et la voie dépendante de Fas (Figure 13) dite « extrinsèque »¹⁴⁶. Les cellules du DIV sont caractérisées par un dialogue entre les voies intrinsèque et extrinsèque qui permet de réguler l'apoptose¹⁴⁶. En cas de dérégulation, l'apoptose dépend des mitochondries, est médiée par caspase-9 qui active à son tour les caspases -3, -7 et -6 et conduit à la mort cellulaire^{192,193}.

ii. Sénescence et autophagie

La sénescence est un processus naturel vieillissement des tissus et organes. Il existe deux types de sénescence : la sénescence répllicative qui est un phénomène physiologique et le résultat du raccourcissement des télomères au niveau des chromosomes lors des divisions cellulaires¹⁹⁴ ; la sénescence prématurée qui, au contraire, est induite par un stress et conduit à un vieillissement prématuré du DIV¹⁹⁵. Les cellules sénescents perdent leur capacité à se diviser mais sont toujours viables et maintiennent une certaine capacité de synthèse bien que leur expression génique soit différentes de cellules normales. Ainsi, l'activité sécrétoire des cellules sénescents dans le DIV est caractérisée par la production de cytokines inflammatoires et d'enzymes de dégradations de la MEC¹⁹⁶. Dans des pathologies telles que l'arthrose,

une accumulation de cellules sénescents au sein des tissu a été montrée. L'environnement au sein du DIV dégénéré (présence de cytokines inflammatoires, de radicaux libres, application de contraintes inhabituelles sur les tissus), ainsi que la détection de l'expression de marqueurs de sénescence prématurée^{197,198} tend à indiquer le rôle probable de la sénescence dans la dégénérescence discale. De manière intéressante, il a récemment été démontré que l'élimination des cellules sénescents au sein de cartilage articulaire permettait de réduire le développement d'arthrose et des douleurs associés¹⁹⁹.

L'autophagie est un mécanisme cellulaire qui consiste en la dégradation partielle du cytoplasme de la cellule en utilisant ses propres lysosomes pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Elle intervient dans la réparation d'éléments cellulaires, la nutrition de la cellule en cas de jeûne, la réponse immunitaire ou la mort cellulaire. L'étude du mécanisme d'autophagie cellulaire dans les processus dégénératifs fait aujourd'hui l'objet de nombreuses investigations. Ce mécanisme repose sur la production par les cellules de leur propre énergie en conditions de stress, comme un faible accès aux nutriments, par le recyclage de leurs propres protéines¹¹. L'autophagie est considérée comme protectrice de la mort cellulaire et l'augmentation du nombre d'autophagosomes avec l'âge a été montrée. Ainsi, ces données suggèrent la capacité des cellules du NP à résister, pour un temps, en s'adaptant aux conditions drastiques existant dans un DIV dégénéré.

d. Effets de la dégénérescence sur les propriétés biomécaniques du DIV

La dégénérescence discale et la perte d'intégrité des plateaux vertébraux entraînent des modifications importantes des propriétés mécaniques du DIV, comme la perte de la pressurisation du NP ou le déplacement des zones de charge qui se concentrent particulièrement vers l'AF postérieur^{200,201}. Il a été démontré que lors des stades précoces de dégénérescence, le DIV gagne en flexibilité et devient hyper-mobile, jusqu'au grade IV de la classification de Thompson²⁰²⁻²⁰⁴. A partir du grade V, la dégénérescence conduit à une rigidification des tissus et une restriction dans les mouvements due à la douleur, induisant une hypomobilité, notamment au niveau L5-S1²⁰⁵.

Dans l'AF, la dégénérescence induit une augmentation du module de compression²⁰⁶ et une réduction de la perméabilité radiale^{207,208}. Ces altérations sont généralement expliquées par la diminution du degré d'hydratation du DIV, la compaction du tissu et le remodelage structural.

e. Dégénérescence discale induite

La dégénérescence du DIV est un phénomène qui apparaît naturellement chez l'homme et quelques animaux tels que le rat des sables ou le chien chondrodystrophique^{209,210}. Elle peut également être induite *via* plusieurs méthodes, développées sur des modèles animaux, et classées en trois groupes : les méthodes mécaniques, les méthodes chimiques et les méthodes physiques. Ces modèles ont notamment permis d'étudier les mécanismes à l'origine de la dégénérescence, en dépit des différences qui existent avec l'homme des points de vue anatomique, biomécanique et constitution de la MEC²¹¹⁻²¹⁴.

Parmi les méthodes mécaniques, l'application d'une charge importante sur les disques est la plus répandue^{215,216}. Cette méthode est néanmoins controversée car douloureuse. Les méthodes chimiques impliquent l'injection d'enzymes protéolytiques (hyaluronidase, papaïne, chondroïtinase ABC) dans le NP²¹⁷⁻²¹⁹. La limitation majeure opposée à ces méthodes est que, bien que les quantités d'enzymes injectées soient contrôlables, elles induisent une dégénérescence aiguë et non progressive. De plus, les effets à long terme de la présence des enzymes sur le site discal ne sont à ce jour pas connus. Enfin, les méthodes physiques telles que l'aspiration du NP, la ponction de l'AF, ou encore l'utilisation d'un laser^{211,220,221} semblent particulièrement intéressantes malgré le manque de progressivité et de reproductibilité²²².

Ces modèles de dégénérescence discale induits présentent tous des inconvénients mais, bien que moins pertinents que les modèles spontanés, ils sont couramment utilisés dans les études précliniques au regard du temps nécessaire pour la progression naturelle de la maladie²²³⁻²²⁶.

Partie I - Etat de l'art : Formation du disque intervertébral, dégénérescence discale et traitements de la lombalgie

Les connaissances apportées par les études de la physiopathologie discale sont assez récentes et permettent d'envisager une prise en charge étiologique de la dégénérescence du disque intervertébral. Néanmoins ces traitements sont actuellement encore en développement et des approches plus conventionnelles et symptomatiques peuvent d'ores déjà être proposées aux patients. Ces approches basées tant sur l'éducation du patient que sur des traitements pharmacologiques ou chirurgicaux sont présentées dans le chapitre suivant.

III. PREVENTION ET TRAITEMENTS CONVENTIONNELS DE LA LOMBALGIE

1. Prévention et traitements hygiéno-diététiques

Par définition, il existe trois niveaux de prévention. Les activités de prévention primaire, peu décrites dans la littérature, ont pour objectif d'empêcher ou de retarder l'apparition des lombalgies (évaluation des risques, éducation, modifications du mode de vie et de l'environnement). En Belgique, elles passent notamment par des programmes d'éducation, menés dans les écoles, et ont pu montrer une augmentation significative des connaissances, une amélioration des attitudes posturales et une réduction de la prévalence des lombalgies chez les enfants²²⁷⁻²²⁹. La plupart de ces études souligne néanmoins le manque de suivi chez ces enfants devenus adultes et ne permet pas d'évaluer les bénéfices à long terme. D'après une étude réalisée en 2011, ces bénéfices semblent limités puisque si les conseils posturaux enseignés étaient toujours appliqués après 1 an, ce n'était que très rarement le cas après 8 ans de suivi²³⁰.

Les activités de prévention secondaire (limitation du développement de la maladie ou limitation de son impact sur le patient) et tertiaire (récupération d'un niveau de vie optimal et limitation des complications) sont plus largement répandues. Ainsi, des règles hygiéno-diététiques ont été publiées par l'HAS (Haute Autorité de Santé) pour la prise en charge des stades précoces de la lombalgie²³¹. Il a notamment été montré que la posture, la musculature dorsale^{232,233} et la pratique régulière et modérée d'exercices physiques^{234,235} ont un rôle clé dans la santé des DIV et l'apparition de douleurs dorsales. Il n'existe aujourd'hui pas de consensus clair sur les sports les plus adaptés à une prévention/réduction des douleurs mais plusieurs points ont été mis en évidence. En effet, plusieurs études ont montré que si la marche et la course réduisent momentanément la hauteur discale par une diminution du degré d'hydratation²³⁶⁻²³⁸, lors de la phase de réhydratation, l'apport de nutriments serait favorisé dans les DIV²³⁵. Par ailleurs, et bien que leur efficacité à long terme n'ai pas été démontrée, la réalisation de massages, la balnéothérapie, la stimulation électrique transcutanée (TENS), l'acupuncture, les écoles du dos (programme d'éducation des patients) et les manipulations vertébrales semblent montrer une efficacité antalgique à court terme²³⁹⁻²⁴¹.

Partie I - Etat de l'art : Formation du disque intervertébral, dégénérescence discale et traitements de la lombalgie

Une prise en charge multidisciplinaire est fortement recommandée, associant notamment des séances d'éducation et de conseils, des exercices physiques et une prise en charge psychologique. Les traitements pharmacologiques et non-pharmacologiques apportent cependant une arme supplémentaire à cet arsenal thérapeutique.

2. Traitements pharmacologiques

En plus du respect des règles hygiéno-diététiques énoncées ci-dessus, l'utilisation d'un traitement pharmacologique se doit de respecter une démarche précise basée sur la prescription de molécules aux effets antalgiques croissants. Selon les recommandations émises par l'HAS en 2000, le principal objectif de ces traitements est de permettre au patient de contrôler et gérer sa douleur, d'améliorer sa fonction et de favoriser sa réinsertion sociale et professionnelle le plus rapidement possible²³¹.

Dans un premier temps les antalgiques de palier I et II, tels que le paracétamol, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), l'acide acétylsalicylique (bien que sa toxicité digestive réduise son utilisation) et les opiacés faibles sont utilisés. En cas d'échec, l'utilisation d'antalgiques de palier III (opioïdes forts, morphiniques) peut être envisagée. Il est à noter que peu d'études ont été réalisées pour des indications de lombalgies chroniques concernant les antalgiques existants.

Les myorelaxants peuvent également être proposés mais le recul manque pour apprécier l'intérêt de cette classe médicamenteuse à long terme dans cette indication, et leur utilisation doit être limitée à de courtes durées de traitement^{242,243}. Aujourd'hui la place des myorelaxants dans l'arsenal thérapeutique est très limitée.

Les infiltrations épidurales de corticoïdes peuvent également être utilisées afin de soulager à court terme les patients lombalgiques chroniques^{244,245}.

Lorsque les prises en charge non médicamenteuses et les traitements pharmacologiques ne sont pas suffisants vis-à-vis du maintien de la fonction discale ou de la gestion de la douleur, une prise en charge chirurgicale est envisagée.

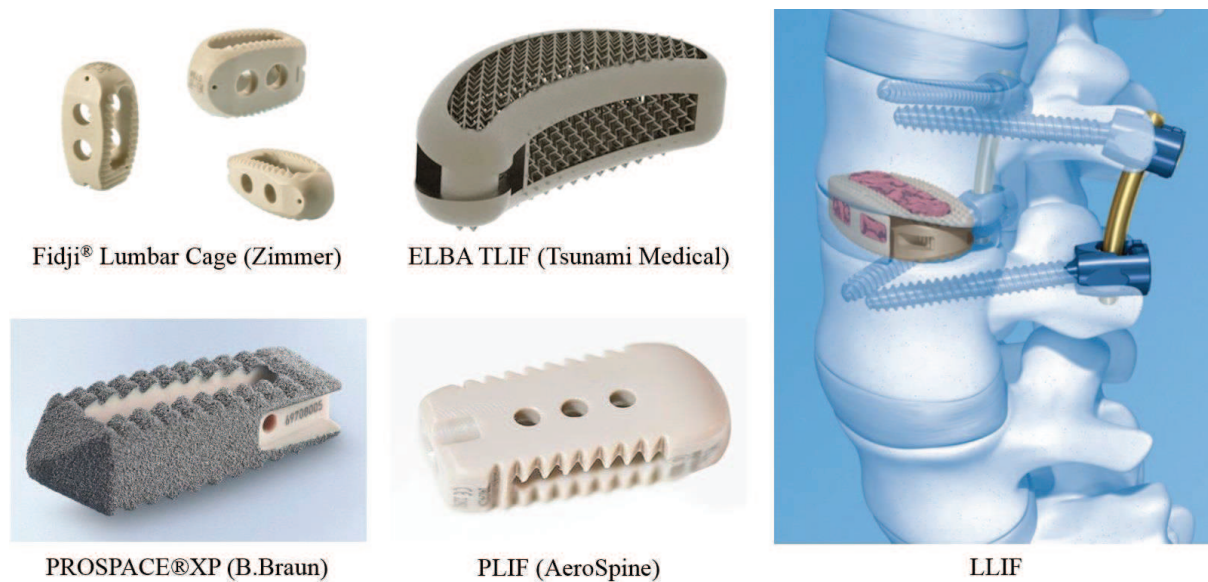


Figure 14 : Exemples de cages de fusion pour arthrodèse et illustration d'une cage de fusion implantée par voie d'abord latérale (LLIF)
(source iconographique : fabricants - Liste non exhaustive)

3. Traitements chirurgicaux

Les traitements chirurgicaux présentés ci-dessous ne traiteront que des approches relatives aux dégénérescences discales symptomatiques réfractaires aux traitements présentées précédemment, l'arthrodèse et l'arthroplastie.

a. **L'arthrodèse**

L'arthrodèse lombaire est une procédure chirurgicale qui consiste en la fusion de plusieurs vertèbres adjacentes après prélèvement du DIV associé. Elle a donc pour objectif d'immobiliser les articulations intervertébrales postérieures. La première procédure d'arthrodèse lombaire remonte à 1889²⁴⁶ et le nombre d'intervention de ce type a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie^{247,248}. Historiquement, l'arthrodèse était réalisée à l'aide d'un greffon osseux (os iliaque autologue le plus souvent) afin de fusionner deux vertèbres et ainsi bloquer l'articulation ou le DIV à l'origine des douleurs lombaires²⁴⁹. Aujourd'hui, des implants polymères (cage de fusion), contenant un greffon osseux préalablement prélevé généralement sur la crête iliaque, associés à un système de maintien permettant la stabilisation de l'implant pendant la fusion osseuse, sont utilisés (Figure 14). Les cages de fusion composées de titane ont été largement remplacées par les cages de fusion en fibres de carbone ou en polyetheretherketon (PEEK). Ces dernières présentent des designs dits « anatomiques », visant à diminuer les risques de migration du dispositif. Bien que l'apport du design en lui-même n'ait pas été évalué, ces cages possèdent une meilleure biocompatibilité, permettent la réalisation d'IRM et respectent vraisemblablement les contraintes mécaniques au niveau des vertèbres adjacentes, ce qui n'était pas le cas avec les cages de première génération²⁵⁰.

Les voies d'abord pour la réalisation d'arthrodèse ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années et de nouvelles approches dites "mini-invasives" ont été développées. Ces différentes voies d'abord regroupent : les voies postérieures (posterior lumbar interbody fusion - PLIF), antérieures (anterior lumbar interbody fusion - ALIF), latérales (lateral lumbar interbody fusion - LLIF) ou obliques (oblique lumbar

interbody fusion/anterior to psoas - OLIF/ATP or extra foraminal interbody fusion (ELIF)) et les voies transforaminales (transforaminal lumbar interbody fusion - TLIF et minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion - MI-TLIF)²⁴⁷. Des études ont été réalisées afin d'établir des recommandations d'utilisation de ces techniques en fonction de l'étage discal impliqué. Par exemple, la voie d'abord ALIF permet d'intervenir sur les DIV L4-L5 et L5-S1 mais pas les disques lombaires hauts (L1-L2, L2-L3, L3-L4). Sans pouvoir apporter de consensus clair, les études montrent que les voies TLIF et PLIF semblent globalement préférentielles²⁵¹⁻²⁵⁴.

Enfin, une autre méthode d'arthrodèse a été développée, ce sont les arthrodèses postéro-latérales sans cage. Cette méthode implique une approche par voie postérieure et repose sur la procédure de Cotrel-Dubousset. Cette procédure consiste à fusionner la partie postérieure de l'articulation discale par immobilisation des pédicules, immobilisant le DIV sans fusion des plateaux vertébraux. Elle est très utilisée dans le traitement chirurgical de scolioses et peut être associée à une cage de fusion pour une arthrodèse « circonférentielle »²⁵⁵⁻²⁵⁷.

Si les résultats cliniques montrent que l'arthrodèse est efficace sur les douleurs dans 70 à 80% des cas²⁵⁸, il est important de souligner qu'aucune étude n'a véritablement démontré une corrélation entre la fusion vertébrale et la diminution de la douleur. Lors de l'analyse des résultats cliniques après opération, les critères tels que les douleurs lombaires, le taux d'invalidité, l'apparition de complications²⁵⁹, le taux de ré-opération ou encore les clichés radiographiques, montrent de manière générale une amélioration du statut du patient^{260,261}.

Néanmoins, une des problématiques bien décrites par les praticiens est la perte de mobilité de l'étage traité qui conduit à des modifications biomécaniques de l'ensemble du rachis. Ces modifications biomécaniques peuvent contribuer à la dégénérescence des étages adjacents (supérieurs et inférieurs) entraînant un phénomène appelé « effet domino »²⁶² ou syndrome adjacent (ASD) dans près de 30% des cas, après un suivi de 5 ans²⁶³. De manière intéressante, il a été montré que le l'arthroplastie, par implantation de prothèses

discales totales, permettait de réduire notablement ce syndrome²⁶⁴, amenant récemment certaines complémentaires santé à proposer leur remboursement aux Etats-Unis.

Par ailleurs, la morbidité sur le site de prélèvement du greffon osseux (en général au niveau de l'os iliaque) est également à prendre en compte et les études à ce sujet présentent des données contradictoires. Certains auteurs ne rapportent qu'une morbidité minimale avec une douleur au site donneur nulle après plus de 4 ans de suivi²⁶⁵. D'autres études au contraire, rapportent des hématomes²⁶⁶ et de 6 à 34% de patients souffrant à long terme de douleurs persistantes au niveau du site donneur^{267,268}. Il a néanmoins été montré que ces effets peuvent être limités par l'utilisation d'une technique opératoire moins invasive²⁶⁹.

Une alternative à ces interventions impliquant un prélèvement osseux, est l'utilisation de composites hémi-synthétiques ou de matrices collagéniques « chargés » de facteurs de croissance (facteur de croissance dérivé de plaquettes (PDGF), insuline-like growth factor (IGF), bone morphogenic protein-2 (BMP-2))^{249,270-272}. Les résultats des premières études menées semblent prometteurs mais l'existence d'effets indésirables (réaction inflammatoire, formations osseuses ectopiques entraînant des atteintes nerveuses, pseudo-arthrose) incitent à la prudence²⁷³⁻²⁷⁶. De plus, il est à noter que la sécurité de ces procédures doit être approfondie, notamment vis-à-vis de l'origine des produits utilisés.

Si certaines études n'ont pas permis de montrer la supériorité de ces interventions à long terme vis-à-vis d'une prise en charge conventionnelle²⁷⁷ il n'en reste pas moins qu'elles sont un succès pour la majorité des patients opérés²⁷⁸⁻²⁸⁰. De plus, en dépit du poids économique que représentent ces interventions chirurgicales^{247,281} et de leur approche réparatrice et non régénératrice, l'arthrodèse reste aujourd'hui une technique chirurgicale importante dans la prise en charge des patients.

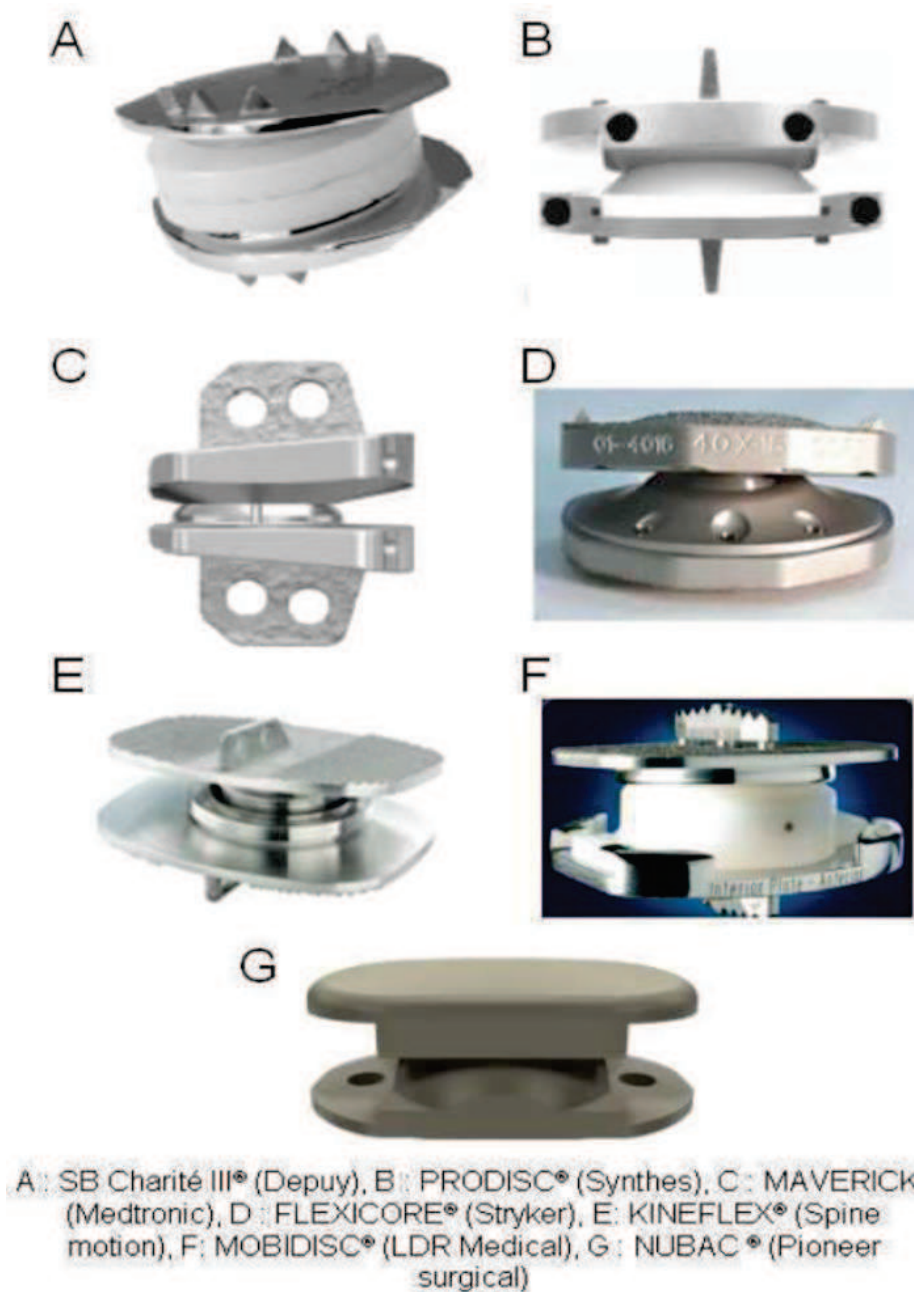


Figure 15 : Prothèses lombaires totales
(Source iconographique : fabricants - Liste non exhaustive)

b. L'arthroplastie

L'arthroplastie est une intervention chirurgicale qui vise à remplacer un disque intervertébral lésé, par une prothèse totale ou partielle. A l'opposé du principe de l'arthrodèse, l'arthroplastie a donc pour objectif de maintenir la mobilité rachidienne et ses caractéristiques mécaniques, et présente ainsi des atouts théoriques^{121,282,283}.

L'arthroplastie est née dans les années cinquante, bénéficiant notamment des recherches dans le domaine des prothèses totales de hanche et de genoux^{284,285}. De nombreux "designs" ont été développés²⁸⁶ et testés ce qui a notamment permis de définir les caractéristiques d'une prothèse discale idéale : surface de contact implant/os maximale afin de diminuer le risque d'affaissement de la prothèse, module élastique du matériel proche des caractéristiques de l'os. Deux catégories de prothèses sont actuellement recensées : les prothèses totales permettant le remplacement de l'ensemble du DIV (AF et NP), et les prothèses partielles pour le remplacement du NP uniquement.

i. Prothèses totales

De nombreuses prothèses totales sont aujourd'hui utilisées en clinique humaine ou sont en cours d'évaluation (Figure 15). Elles présentent des designs proches issus d'études biomécaniques qui visent à reproduire le plus finement possible la cinématique rachidienne²⁸⁷⁻²⁸⁹. Le matériau de la surface de contact permet de distinguer les prothèses métal-métal (MAVERICK®, FLEXICORE®, KINEFLEX®) et les prothèses métal-polymère (SB Charité III®, PRODISC-L®, MOBIDISC®, NUBAC®). Ces prothèses possèdent une ou deux articulations, bien que des analyses biomécaniques aient montré un risque plus important d'usure avec les prothèses à deux articulations. Quelques études font état d'un risque de relargage systémique d'ions cobalt et chrome issus de la structure des prothèses²⁹⁰ mais l'impact clinique semble cependant limité^{291,292}. Une des complications pouvant entraîner un impact majeur et la ré-opération du patient est la migration de la prothèse discale^{264,293,294} et certaines études rapportent que cette migration représente jusqu'à 26% des cas²⁹⁵⁻²⁹⁷.

Aujourd'hui, les prothèses SB Charité III® et PRODISC® sont les plus utilisées et bénéficient d'un recul clinique qui doit néanmoins être modulé car la plupart des études publiées sont des rapports de cas cliniques^{295,298-300}. Concernant d'autres prothèses, telles que la MAVERICK® ou la FLEXICORE®, des études ont été récemment publiées, montrant leur intérêt dans la prise en charge chirurgicale de la dégénérescence discale³⁰¹⁻³⁰³. A l'opposé, concernant notamment la prothèse ACROFLEX®, il n'existe qu'une publication récente et celle-ci n'a pas pu démontrer son intérêt au regard de l'indication visée³⁰⁴.

Enfin, en dépit de l'efficacité antalgique de ces prothèses et du prompt retour aux activités, les complications associées à leur implantation sont à prendre en compte car certaines études montrent un taux de ré-intervention supérieur à 60%²⁹⁵. Ces résultats doivent néanmoins être modérés par d'autres études qui ont montré des taux de ré-intervention plus bas, de 11% à 18%^{291,304}.

ii. Prothèses partielles

La première prothèse partielle de disque, constituée d'une bille d'acier inoxydable, fut créée et implantée chez l'homme en 1966 par Ulf Fernström³⁰⁵. L'utilisation d'un matériau pour remplacer uniquement le tissu lésé, tout en préservant les structures environnantes (AF, plateaux vertébraux, ligaments) est une approche intéressante et de nombreuses prothèses partielles ont été créées, polymériques ou non. Les hydrogels, de par leur taux d'hydratation important et leur capacité à restaurer la hauteur discale, ont souvent été choisis en tant que matériaux pour les prothèses polymériques^{297,306}. Les résultats actuels semblent satisfaisants et le principal inconvénient (risque de déplacement et d'extrusion à travers l'AF) est en passe d'être résolu grâce à l'évolution du design des prothèses.

Le recul clinique d'utilisation de ces prothèses reste faible et il apparaît aujourd'hui qu'elles doivent être essentiellement réservées à une utilisation dans des stades précoces de la dégénérescence du DIV, notamment avant que l'AF ne soit lésé.

Comme l'arthrodèse, l'impact médico-économique de l'implantation des prothèses discales devra être pris en compte et des études de suivi à long terme des patients devront être menées afin de statuer sur le réel bénéfice d'une technique par rapport à une autre, mais également d'une prothèse par rapport à une autre.

L'ensemble de ces approches thérapeutiques permet un traitement symptomatique par la gestion de la douleur, l'immobilisation, l'élimination ou le remplacement du DIV lésé. Bien que généralement efficace, la compréhension du processus de dégénérescence discale et l'identification de molécules clés ont permis de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces cibles sont actuellement étudiées avec intérêt par la communauté scientifique qui espère pouvoir bientôt proposer des traitements innovants.

IV. TRAITEMENTS INNOVANTS DE LA DEGENERESCENCE DISCALE ET DES DOULEURS LOMBAIRES

Comme décrit dans les paragraphes précédents, les traitements de la lombalgie sont aujourd'hui principalement axés sur la gestion de la douleur. Grâce à une récente avancée de la connaissance de la physiopathologie discale, de nouvelles approches sont envisagées avec intérêt. En effet, la découverte de la disparition massive des cellules résidentes du DIV, à l'origine de la rupture de l'homéostasie de la MEC, a conduit à considérer des stratégies de thérapie cellulaire. Ces stratégies consistent en l'injection de cellules du disque, de cellules pluripotentes ou de cellules souches, prédifférenciées ou non. L'injection de ces cellules peut avoir pour objectif de permettre une néo-synthèse de MEC par ces cellules et ainsi favoriser l'anabolisme discal. Par ailleurs, le potentiel immuno-modulateur des MSC a été largement décrit et représente un autre axe de recherche quant la thérapie cellulaire. Ces cellules d'origine autologue ou allogénique peuvent néanmoins présenter des difficultés lors de la transposition à la clinique. En effet, si les premières permettent de s'affranchir du risque de rejet des cellules injectées, elles sous entendent la mise en place d'une médecine personnalisée très onéreuse. A l'opposé, l'utilisation de cellules souches allogéniques issues de banques biologiques permettrait de réduire le coup de tels traitements. Ces banques sont néanmoins toujours en développement et leur mise en place nécessite une caractérisation approfondie du matériel proposé, notamment vis-à-vis de leur potentiel tératogène. Au regard de ces limitations et de l'identification de facteurs biologiques impliqués dans la dégénérescence discale, des thérapies basées sur l'injection intradiscale de chimiokines, de molécules pro-anaboliques ou d'inhibiteurs de cytokines impliquées dans l'inflammation du DIV ont été proposées. Ces thérapies ont pour objectif de stimuler la réparation endogène du tissu discal par attraction de cellules progénitrices/souches issues des tissus environnants pour recoloniser le disque ou stimulation des cellules résidentes encore présentes afin de favoriser l'anabolisme et de réduire le catabolisme. Plus récemment, le rôle de certains gènes et la dérégulation de certaines séquence d'ARN dans la dégénérescence discale a été étudiée et a permis le

développement de stratégies de thérapies géniques basées sur l'injection *in vivo* de gènes ou de courtes séquences d'ARN interférant qui pourront modifier l'activité sécrétoire des cellules et ainsi restaurer l'homéostasie discale. Ces nouvelles thérapies impliquent l'injection de cellules ou de molécules dont la durée de vie peut être limitée. Afin de les protéger contre la dégradation *in situ*, l'intérêt de l'utilisation de biomatériaux est aujourd'hui largement admis. En plus de cet avantage, ces biomatériaux peuvent être très hydratés et permettent ainsi de restaurer, au moins en partie, la hauteur et l'hydratation discale. Par ailleurs, le développement de systèmes associant des biomatériaux de taille (macro, micro, nano) et de nature différente met l'accent sur la possibilité de contrôler dans l'espace et le temps, la libération des biomolécules d'intérêt ainsi que d'améliorer la transfection du matériel génétique injecté. L'ensemble de ces stratégies innovantes et le rôle majeur des biomatériaux pour la médecine régénératrice du DIV ont fait l'objet d'une revue de la littérature.

Article II : **Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: from cell therapies to multi-scaled delivery systems.** N. Henry, J. Clouet, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux. (Soumis - Biotechnology Advances)

ARTICLE II

Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: from cell therapies to multi-scaled delivery systems.

N. Henry, J. Clouet, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux.

(Soumis - Biotechnology Advances)

Résumé

Grâce à l'amélioration de notre compréhension de la physiopathologie de la dégénérescence du disque intervertébral (DIV), de nouvelles stratégies thérapeutiques ont émergées, basées sur l'injection locale de cellules, de molécules bioactives et d'acides nucléiques. Cependant, au regard des conditions environnementales délétères régnant dans le DIV dégénéré, la protection des produits biologiques injectés contre la dégradation *in situ* ainsi que leur libération prolongée, constitue un défi majeur et la stratégie optimale pour la régénération du DIV fait l'objet de recherches intensives. Dans cette revue, nous décrivons le rôle crucial des biomatériaux pour la médecine régénératrice du DIV. Nous mettons ainsi en évidence les polymères, aux échelles macro, micro et nano, les plus pertinents pour promouvoir la réparation endogène du tissu discal. Enfin, nous illustrons le potentiel innovant des systèmes combinant un hydrogel injectable capable de réticuler *in situ* avec des micro ou nanoparticules pour la médecine régénératrice du DIV.

Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: from cell
therapies to multiscaled delivery systems

Nina Henry^{a,b,c}, Johann Clouet^{a,c,d,e}, Jean Le Bideau^b, Catherine Le Visage^{a,c*}, Jérôme
Guicheux^{a,c,f*}.

^{a.} INSERM, U1229, RMeS “Regenerative Medicine and Skeleton”, Team STEP “Skeletal Physiopathology and Joint Regenerative Medicine”, Nantes, France.
^{b.} Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), Université de Nantes, CNRS, 2 rue de la Houssinière, BP 32229, 44322 Nantes cedex 3, France
^{c.} Université de Nantes, UMR 1229, UFR Odontologie, Nantes, France.
^{d.} CHU Nantes, PHU 11 Pharmacie, Pharmacie Centrale, Nantes, France.
^{e.} Université de Nantes, UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Nantes, France.
^{f.} CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, France.

* These authors equally contributed to this work.

Correspondence to:

C. Le Visage and J. Guicheux

INSERM U1229, 1 place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France.

Catherine.levisage@inserm.fr; jerome.guicheux@inserm.fr

1. Abstract.....	3
2. Introduction	4
3. IVD degeneration physiopathology	4
3.1. <i>IVD structure</i>	4
3.2. <i>Extracellular matrix anabolism/catabolism homeostasis</i>	5
4. From physiopathology to IVD specific biotherapies.....	6
4.1. <i>Cell-based therapies.....</i>	6
4.2. <i>Molecular therapies.....</i>	7
4.2.1. Chemo-attractants and endogenous repair potential.....	7
4.2.2. Anabolic factors injection	7
4.2.3. Cytokines inhibitors and anti-inflammatory approaches	8
4.3. <i>Gene and interfering RNA therapies</i>	9
5. Engineering biomaterials for IVD delivery	10
5.1. <i>Natural and synthetic polymers</i>	10
5.1.1. Natural polymers	10
5.1.2. Synthetic polymers	10
5.2. <i>In situ forming hydrogels as macro-scaled delivery systems</i>	11
5.3. <i>Micro-scaled delivery systems</i>	12
5.4. <i>Nano-scaled delivery systems</i>	12
5.4.1. Polymeric nanoparticles	12
5.4.2. Liposomes.....	13
5.4.3. Dendrimers	13
5.4.4. Carbon nanoparticles	13
5.4.5. Silica nanoparticles	13
5.5. <i>Multiscaled systems for complex regenerative strategies</i>	14
6. Conclusion.....	15
7. Acknowledgements	15
8. References	15

1. **Abstract**

As our understanding of the physiopathology of the intervertebral disc (IVD) degeneration has improved, novel therapeutic strategies have emerged, based on the local injection of cells, bioactive molecules, and nucleic acids. However, with regards to the harsh environment constituted by the degenerated IVD, protecting biologics from *in situ* degradation while allowing their long-term delivery, is a major challenge. Yet, the design of the optimal approach for IVD regeneration is still under debate and only few papers provide a critical assessment of IVD-specific carriers for biologics local and sustained delivery. In this review, we highlight the IVD-relevant polymers as well as their design as macro-, micro-, and nano-sized particles to promote endogenous repair. Finally, we illustrate how multiscaled systems, combining *in situ* forming hydrogels with ready-to-use particles, might drive IVD regenerative medicine strategies towards innovation.

2. Introduction

Low back pain (LBP) is a common health condition and it is now well established that over 80% of human adults will experience LBP during their lifetime. LBP became the second most frequent cause for visits to the hospital and the leading cause of years lived with disability (Maher et al., 2017; Vos et al., 2016). Thanks to a better understanding of LBP etiology, the involvement of intervertebral disc (IVD) degeneration, referred to as disc degenerative disease (DDD) (Vos et al., 2016) was identified.

Current treatments of LBP include non-pharmacological, pharmacological or surgical approaches, all being aimed at controlling pain. For early degenerative stages, pharmacotherapies are mainly used (Abdel Shaheed et al., 2016) in association with rehabilitation or education of the patient (Latimer et al., 2004). Regarding more advanced cases, once conservative methods failed, surgical approaches are considered. Spine fusion aims to directly remove the IVD and immobilize the adjacent vertebrae. However, this intervention reduces spine mobility and alongside segments can be affected by an accelerated degenerative process (Baliga et al., 2015). Arthroplasty in turns, by *Nucleus pulposus* or IVD total replacement, aims at conserving the spine motion notably at the affected levels. These interventions, although generally clinically efficient to alleviate pain (Galbusera et al., 2008), remain very invasive and often include long post-operative recovery and non neglectable risks of complications (Baliga et al., 2015).

Recent progress in our understanding of IVD physiopathology has allowed to consider new approaches for IVD regenerative medicine. With respect to the decreasing number of cells in degenerating IVD, cell-based therapies were considered with a growing interest. However, regarding the restrictive regulatory framework and the difficult clinical translatability of cell-based therapies, the use of biological factors targeting IVD degenerative processes was also contemplated. More recently, the implication of gene mutation or microRNA dysregulation were identified in the onset of DDD, allowing to consider the development of a third therapeutic approach based on the delivery of genes or small interfering RNAs (siRNA). In this context, this review will first briefly give recent insights into the pathophysiological mechanisms of DDD and then focus on describing cell-, molecules-, gene- and siRNA-based strategies for tackling DDD as well as the scaffolding biomaterials used for their respective delivery.

3. IVD degeneration physiopathology

3.1. IVD structure

IVDs are fibro-cartilaginous tissues located between the vertebrae which are avascular and non-innervated (Whatley and Wen, 2012). They act as shock-absorbers by distributing the mechanical loads along the spine and allow trunk mobility (Whatley and Wen, 2012; Zhou et al., 2014). IVDs are generally presented as a tri-partite anatomical entity composed as described below (Figure 1):

- The *Nucleus pulposus* (NP). NP is the inner part and the most hydrated region of the IVD (Fontana et al., 2015). NP-cell density in human is the lowest of the IVD (Maroudas et al., 1975). These cells can be classified in two types: the notochordal cells and the nucleopulpocytes (Colombier et al., 2014). Human adult NP cells produce a highly hydrated extracellular matrix (ECM), rich in proteoglycans (mainly aggrecan) and type II collagen.
- The *Annulus fibrosus* (AF). AF is the outer part of the IVD. It can be divided into the outer AF containing oriented lamellar array of densely packed collagen fibers, while the inner AF is less dense and less organized (Raj, 2008; Whatley and Wen, 2012). The AF cells have a fibroblastic morphology (Sakai and Grad, 2015). AF is composed of water, types I and II collagen fibers, proteoglycans and other proteins (Roughley, 2004). The AF retains the pressurized NP and allows the disc compression/decompression (Fontana et al., 2015).
- The endplates (EPs). EPs, composed of hyaline cartilage at the top and bottom of the vertebral bodies, interfaces the IVDs and the adjacent vertebrae. EPs-cells are chondrocytes which synthesize an

ECM rich in proteoglycans, types I and II collagens, and water. Mechanically, EPs support significant loads during daily-living activities and distribute the intradiscal pressures onto the adjacent vertebrae. Nutritionally, they represent the main route for the glucose and oxygen to reach the disc cells through the vertebral capillaries and for waste products to be eliminated from the disc (Fontana et al., 2015; Lotz et al., 2013).

3.2. Extracellular matrix anabolism/catabolism homeostasis

DDD has a complex and multifactorial etiology. Genetics, environmental causes, mechanical factors, as well as ageing, systemic and toxic factors (Elmasry et al., 2015; Hadjipavlou et al., 2008) were identified as risk factors. Interestingly, recent data highlighted that the concomitant presence of notochordal cells and nucleopulpocytes was a pivotal factor for IVD ECM homeostasis (Erwin et al., 2006). Indeed, these two cell types interact *via* synthesized molecules and the early disappearance of notochordal cells was associated with a downregulation of nucleopulpocytes survival. This decrease in nucleopulpocytes density leads to a misbalance in ECM anabolism/catabolism ratio that culminates in the alteration of IVD mechanical properties (Erwin et al., 2011). In the advanced stages of IVD degeneration, proteoglycans, hydration and type-II/type-I collagen ratio are decreased (Russo et al., 2016; W.-J. Wang et al., 2015), leading to a dehydrated and fibrotic NP with a solid-like mechanical behavior (Russo et al., 2016). Additionally, AF structure is disorganized and EPs calcify (Fontana et al., 2015; W.-J. Wang et al., 2015). As the degeneration worsens, innervation and vascularization of the disc occur (Whatley and Wen, 2012), leading to discogenic pain (Alkhatib et al., 2014).

On a molecular point of view, IVD degeneration is associated with an upregulation of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Sakai and Grad, 2015). These two molecules trigger the over-expression of matrix metalloproteinases (MMPs) notably MMP-1, -2, -3, -7, -8 and -13. These MMPs are known for their proteolytic action towards collagen and proteoglycans (Kepler et al., 2013b; W.-J. Wang et al., 2015). Similarly to MMPs, there is a marked increase in the a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs (ADAMTS) 4 and 5. ADAMTS 4 and 5 act as aggrecanases thereby contributing to worsen ECM degradation (Molinos et al., 2015; W.-J. Wang et al., 2015). As a pro-inflammatory cytokine, IL-1 β up-regulate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), thereby triggering the neo-vascularization and neo-innervation of IVD that ultimately result in inflammation and pain (Alkhatib et al., 2014; Whatley and Wen, 2012). Finally, in the presence of TNF- α or IL-1 β , NP cells tend to secrete chemo-attractive molecules including (C-C motif) ligand 5/regulated on activation normal T cell expressed and secreted (CCL5/RANTES) or Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (CXCL6) (Grad et al., 2016), thus increasing MSC migration (Pattappa et al., 2014). This increased secretion of CCL5 was correlated with painful degenerated IVDs (Kepler et al., 2013a). In addition, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) was over-expressed in degenerated IVD and involved in NP cell apoptosis (Z. Liu et al., 2016). Interestingly, SDF-1 also demonstrated a chemo-attracting effect toward MSCs migration in an *ex-vivo* IVD culture model (Pereira et al., 2014).

Contrarily to these catabolic factors, anabolic factors stimulate the biological cascade involved in regenerative processes. Among them, Transforming Growth Factor- β (TGF- β) is known to play a pivotal role in collagen and proteoglycans synthesis and in ECM homeostasis (S. Wang et al., 2015). TGF- β is also one of the most potent inhibitor of TNF- α -induced upregulation of MMPs, as well as aggrecan and type-II collagen degradation (Yang et al., 2015). In parallel, Bone Morphogenic Proteins (BMPs) are known to increase proteoglycan and type-II collagen synthesis as well as cell proliferation and differentiation (S. Wang et al., 2015). Among them, the Growth and Differentiation Factor-5 (GDF-5 or BMP-14) plays a crucial role during musculoskeletal development and postnatal IVD maintenance (Feng et al., 2015). GDF-5 gene mutations notably lead to disc abnormalities in mice (Li et al., 2004). GDF-5 also up-regulates proliferation and secretory activities of NP and AF cells (Chujo et al., 2006) and to

modulate MMPs, IL-1 β or TNF- α expression levels (Enochson et al., 2014; Gruber et al., 2014a). Altogether, these data highlight the pivotal role of GDF-5 in IVD matrix homeostasis.

The ECM homeostasis of IVD and the consequences associated with a homeostasis rupture are illustrated in Figure 2.

4. From physiopathology to IVD specific biotherapies

With regards to the multifactorial nature of DDD, three main therapeutic strategies were considered in the past few years: cell-, molecular- and nucleic acid-based therapies (Figure 3).

4.1. Cell-based therapies

Converging body of evidences suggested that IVD degeneration originates from the early disappearance of IVD resident cells. The IVD supplementation with regenerative cells thus naturally emerged as a consistent strategy. Repopulating a degenerated IVD with healthy cells aim at either (i) restoring tissue homeostasis by transplanting cells able to secrete a functional ECM or (ii) tackling *in situ* inflammation by transplanting stem cells with immune-suppressive and anti-inflammatory properties. To achieve these ambitious and clinically relevant objectives, various cells sources were considered. Logically, NP cells harvested from surgically removed IVDs, were the first used, with promising results in canine study and human clinical trials (Meisel et al., 2007). However, their further use was dramatically hampered by the low cell number upon harvest (Sakai and Grad, 2015). In parallel, pluripotent stem cells such as embryonic stem cells could be of great interest with regards to their theoretical potential to differentiate into NP cells. Nevertheless, legal and ethical controversies limit the use of these cells for clinical application. Induced pluripotent stem (iPS) cells were also considered for various applications in regenerative medicine (Hirshi et al., 2014) and their suitability for IVD repair is being studied (Chen et al., 2013) but further studies are needed before their potential can be judged. Last but not least, adipose-derived (ASCs) or bone marrow-derived (MSCs) mesenchymal stem cells in their undifferentiated state are likely the most widely used in DDD context. In addition to provide us with promising results (see below), the extensive use of MSC raised the question of their allogeneic or autologous origin (Richardson et al., 2016). As a matter of fact, MSC are considered hypo-immunogenic and immune-evasive cells able to be transplanted across major histocompatibility barriers (Ankrum et al., 2014), which made the use of allogeneic MSC a credible alternative to autologous ones.

ASCs are considered particularly advantageous regarding their abundance in fat tissue, their accessibility and their more potent immuno-modulatory effects in comparison to MSC isolated from bone marrow (Li et al., 2015). Of interest, human ASCs exhibit a nucleopulpogenic potential when committed with TGF- β 1 and GDF-5 (Colombier et al., 2016). When implanted in mice, these cells also demonstrated their ability to secrete GAGs and type II collagen, consistently with native NP cells capacities (Colombier et al., 2016). In rabbits, undifferentiated MSCs injected in the NP inhibited disc degeneration by reducing MMP-2, MMP-3 and MMP-13 expression, and promoting the type-II collagen synthesis that result in the maintenance of IVD structure (Miyamoto et al., 2010). The beneficial outcomes of injecting undifferentiated MSCs were further demonstrated in other animal models, such as rat, mouse, dog or pig (Henriksson et al., 2009; Hiyama et al., 2008; Jeong et al., 2009; Marfia et al., 2014; Richardson et al., 2016). In these studies IVD degeneration was significantly slowed down, disc height and MRI signal intensity improved and nucleopulpogenic ECM neo-synthesis observed. In humans, the intradiscal injection of MSCs could lower pain and disability (Orozco et al., 2011). This relief was associated with the anti-inflammatory (Maria et al., 2016; Sakai and Grad, 2015) and pro-anabolic properties of MSC (Shabbir et al., 2009). Several ongoing clinical trials are conducted worldwide to determine the optimal cell source (autologous or allogeneic) to be used in DDD (Sakai and Andersson, 2015).

Despite their global promises, the intradiscal injection of “naked” MSC remains hampered by the harsh environmental condition the cells experience when injected in a degenerated IVD (low oxygen tension, low nutrient level, metabolic products accumulation, acidic pH, high osmolarity and high intradiscal pressure). These stringent conditions are responsible to the poor survival rate and altered activity of the injected cells. To overcome this hurdle, tissue engineers proposed to use cytoprotective 3D scaffolds able to create a biomimetic environment that could support cell survival. These scaffolds could additionally promote cell retention at the injection site thereby limiting the risk of off-target effects related to cell effusion. These scaffolds will be detailed in the last section of this review.

4.2. Molecular therapies

More recently and facing the numerous limitations of cell transplantation, an alternative to cell-based therapies emerged. It consists in exploiting the ability of chemo-attractants molecules to mobilize and recruit endogenous progenitor cells at the degenerated site (Illien-Jünger et al., 2012). This strategy, based on the endogenous body capability to self-regenerate, could free clinicians from the restrictive regulatory framework and cost ineffectiveness of cell transplantation. With respect to the myriad of factors playing a crucial role in IVD physiopathology, many chemo-attractive, pro-anabolic and anti-catabolic molecules were contemplated for the stimulation of resident cells or the attraction/recruitment of endogenous progenitors.

4.2.1. Chemo-attractants and endogenous repair potential

One key factor for improving the endogenous repair of IVD *via* cell attraction/recruitment is the presence of endogenous progenitor with stem cell properties in the IVD (Risbud et al., 2007). These IVD-derived progenitor cells (either from NP or EPs) are very similar to MSCs isolated from the bone marrow of the same patient (Blanco et al., 2010). Interestingly, analyses of the migration capacity of progenitors located in NP, AF and EP, indicate that EP progenitors have the highest migration and invasion potency (S. Liu et al., 2016). To favor cell migration in degenerative IVDs, chemokines were considered with interest since as chemotactic cytokines, they are involved in cell mobilization, attraction and homing. Regarding IVD, the three mainly expressed chemokines are SDF-1, CCL5 and CXCL16, either in healthy or degenerated IVDs. Interestingly, the expression of SDF-1 and CXCR4 were upregulated in degenerated IVD, notably in MSCs isolated from the EPs (S. Liu et al., 2016; Zhang et al., 2014). SDF-1 also increased MSCs attraction in a nucleotomized disc model (Pereira et al., 2014). The implication of SDF-1 in stem cell attraction was also demonstrated in many tissues including myocardium or periodontal ligament (Kaku et al., 2017; Purcell et al., 2012). Recently, IVD cells stimulated with IL-1 β and TNF- α were found to secrete a higher concentration of CCL5 as compared to IVD cells cultured under physiological conditions (Gruber et al., 2014b). The presence of CCL5 in degenerated IVDs as well as herniated and scoliotic discs was further demonstrated by proteomic assays in other *in vitro* studies in human (Kawaguchi et al., 2002; Kepler et al., 2013a). Finally, in AF cells, CXCL16 is up-regulated by IL-1 β , suggesting a role for the CXCL16/CXCR6 system (Gruber et al., 2016).

Altogether, these data highlight the role of chemokines in IVD degenerative process and strengthen their relevance to develop new strategies to attract progenitor cells and stimulate endogenous repair (Illien-Jünger et al., 2012).

4.2.2. Anabolic factors injection

In line with our understanding of DDD, anabolic factors can contribute to IVD regeneration. A large panel of anabolic factors was contemplated for IVD regeneration. Here we mainly focused on those who demonstrated, in several converging reports, some promising results.

TGF- β contributes to maintain the expression levels of connective tissue growth factor (CCN2), one of the most potent factor able to stimulate aggrecan synthesis, in NP cells (Tran et al., 2014). In addition,

CCN2 suppressed the inductive effect of IL-1 β on catabolic genes (Tran et al., 2014). Considering that pro-inflammatory cytokines decreased CCN2 expression, this makes TGF- β an anabolic factor able to counteract the effects of pro-inflammatory cytokines (Bedore et al., 2014). TGF- β was also used in association with dexamethasone to stimulate the proliferation of degenerated human NP cells and exhibit an anti-catabolic gene expression profile (Liang et al., 2013).

GDF-5 is a major factor involved in the early IVD development, and mutations of its related gene lead to severe structural impairment (Feng et al., 2015). Noteworthy, GDF-5 is down-regulated by IL-1 β and TNF- α . *In vitro*, GDF-5 favors cell proliferation and stimulates the synthesis of proteoglycan and type II collagen, thus demonstrating its anabolic activity (Chujo et al., 2006). GDF-5 was used to differentiate human ASC towards nucleopulpopocytes, in association with TGF- β 1 (Colombier et al., 2016). Interestingly, GDF-5 intradiscal injection in rat and rabbits was shown to increase disc height. Consistently, clinical trials were conducted to evaluate the safety and efficacy of intradiscal injection of GDF-5 in patients with DDD (NCT01158924, NCT00813813, NCT01182337 and NCT01124006 on clinicaltrials.gov). As far as we know, no peer-reviewed publication is currently available. While a modest improvement of clinical parameters was observed some adverse events were also reported suggesting that despite the relevance of GDF-5 in DDD, its direct intradiscal injection may not be the most suitable route.

Other anabolic factors were investigated and their anti-apoptotic activity towards NP-cells was evidenced. Indeed, aside from promoting angiogenesis, it is now clear that in IVD, vascular endothelial growth factor (VEGF) also prevents NP cell apoptosis (Tran et al., 2010). Additionally, insulin-like growth factor (IGF-1), platelet-derived growth factors (PDGFs), epidermal growth factor (EGF), and fibroblast growth factor (FGF-2) stimulate cell proliferation and inhibit cell apoptosis in human and animal cells (Vasiliadis and Pneumaticsos, 2014). Together with the abovementioned CCN2 (Tran et al., 2014), these factors demonstrated their anabolic activity.

With regards to the role of anabolic factors in DDD treatment, the use of platelet-rich plasma (PRP), that contain a myriad of multifunctional growth factors, was recently proposed. Two clinical trials suggested the efficacy of PRP in DDD (Kristin et al., 2017; Tuakli-Wosornu et al., 2016). Some additional double blind and controlled clinical trials are now required to confirm these first results.

4.2.3. Cytokines inhibitors and anti-inflammatory approaches

Recent studies highlighted the key role of both TNF- α and interleukins in inflammation and further IVD degeneration, notably *via* the up regulation of MMPs and aggrecanases.

Thus, anti-TNF- α treatments (infliximab) were proposed and shown a significant decreased expression of IL-1 β and IL-6 in NP-cells (Walter et al., 2015), thereby demonstrating their anti-catabolic activity. In addition, the local administration of anti-IL-6 receptor, such as Atlizumab or Tocilizumab, lowered inflammation-related pain in human (Sainoh et al., 2016). Interestingly, human IVD cells overexpressing IL-1 receptor antagonist were able to lower IL-1-dependent increase of MMPs when injected in IVD degenerative explants, demonstrating its anti-catabolic potential (Le Maitre et al., 2007). In parallel, as NF- κ B increases IVD degeneration *via* the upregulation of pro-inflammatory cytokines (Fontana et al., 2015), its inhibition was considered. Indeed, human NP-cell exposure to NF- κ B inhibitor, allowed to significantly decrease IL-1 β -dependent MMPs and ADAMTS upregulation (Orita et al., 2013; Zhongyi et al., 2015). In addition, inhibition of other cytokines such as BDNF, NGF, VEGF or TNF- α was studied and shows promising results in the context of inflammation-associated DDD (Orita et al., 2011; Walter et al., 2015; Wu et al., 2011)

In parallel to the previously described IVD degenerative processes, aging-associated accumulation of oxidative damages is of great interest. Indeed, collagen is subject to glycoxidation reactions that form advanced-glycation end-product (AGEs). The accumulation of these AGEs molecules contribute to IVD degeneration by increasing TNF- α , MMPs and aggrecanases expression, and to a greater extent AGEs participate to the alteration of ECM structural and mechanical properties (Colombini et al., 2008).

Interestingly, administration of an anti-inflammatory drug (pentosan-polysulfate) associated to anti-AGE molecule (pyridoxamine) alleviated NP degeneration by lowering MMPs and ADAMTS production in diabetic mice (Illien-Junger et al., 2013).

With the discovery of molecules involved in IVD degenerative processes, new therapeutic approaches were proposed, either through stimulating anabolism or inhibiting catabolism. Despite encouraging results, the short half-life of such molecules do not allow a long-term activity, and they may not be sufficient to re-activate the physiological IVD machinery. Whether embedding these molecules in biomaterials to allow their *in situ* sustained and controlled delivery, while protecting them from proteolytic degradation may be a good option and will be discussed below.

4.3. Gene and interfering RNA therapies

An alternative to biotherapies may be the genetic modification of resident cells through gene transfer, and two strategies can be envisioned. The vector containing the gene can be introduced in the body (direct or *in vivo* gene therapy) or target cells can be harvested, genetically modified *in vitro* and re-implanted (indirect or *ex vivo* gene therapy) (Goldspiel et al., 1993). Considering the decreased number of cells in degenerative IVD, direct gene therapy could be of interest for early degeneration whereas, for more severe cases, indirect approach seems more adapted. For gene delivery, two carriers were used: the non-viral and viral vectors. Non-viral gene therapy refers to the use of naked DNA or cationic compounds (liposomes, polyplexes, lipopolyplexes) (Daraee et al., 2014; Rezaee et al., 2016). Such gene carriers allow to avoid the risks of mutagenicity, viral infections and viral immunogenicity (Mintzer and Simanek, 2009). However, their applications in IVD degeneration treatment remains limited. Regarding viral vectors, whilst retroviruses are the most commonly used, they have a more potent action on cells with a high dividing rate making them poorly adapted for NP-cell mediated IVD gene therapy (Miller et al., 1990). Many studies thus chose adenoviruses despite their potential infectious and immunogenic risk, with regards to their higher transduction efficiency notably in quiescent or slowly dividing cells. Therapeutic genes encoding for anti-inflammatory agents or MMPs inhibitors (e.g. TIMP-1) were considered as they could drastically reduce the expression of MMPs involved in the ECM degradation (W.-J. Wang et al., 2015). Indeed, the use of adenoviral vectors coding for BMP-2 and TIMP-1 on human degenerated disc cells, increased proteoglycan synthesis (Wallach et al., 2003). Adenoviruses were also used to deliver genes coding for growth factors such as GDF-5 (X.-W. Luo et al., 2016) or TGF- β (Nishida et al., 1999) and efficiently stimulated anabolism.

In parallel to classical gene therapies, there is a growing interest in the use of siRNAs. siRNAs are short non-coding sequences of 20-25 nucleotides that control gene expression by binding to their target mRNA and causing the repression of translation or the RNA degradation (Bartel, 2004). Many miRNAs deregulations emerged as key players in IVD degeneration by triggering NP cell apoptosis, ECM degradation or NP cell proliferation and inflammatory response (see (Zhou et al., 2017) for review) and can thus be envisioned as new therapeutic targets.

Gene- and RNA interfering-based therapies seems particularly interesting for restoring IVD anabolic/catabolic balance. However, as NP cell density drastically decreases during degeneration, the efficiency of such approaches needs to be clarified. Finally, adenoviruses or siRNAs are not integrative tools and do not lead to extended gene expression. In addition, as siRNAs need to be protected from endonuclease degradation, the use of specifically designed biomaterials-based systems could, as mentioned previously for peptidic molecules, be rationally considered.

The widening of our understanding of IVD degenerative processes led to propose new therapeutic strategies based on the local administration of cells, molecules, genes or siRNA. Despite encouraging results, these therapies need further improvement with regards to the harsh environment in which these

biologics are injected. To improve cell survival and protect molecules and nucleic acid from degradation, biomaterials were considered. These biomaterials could additionally allow the biologics to be delivered in a spatio-temporally controlled manner thereby promoting long-term IVD regeneration.

5. Engineering biomaterials for IVD delivery

Successful delivery of fragile biologics into IVDs is highly challenging, mostly because of their short *in vivo* half-life. With the aim of targeting this poorly vascularized tissue, delivery routes are limited and direct minimally invasive injection attracted attention. While reviews extensively described pharmaceutical innovations, including self-setting hydrogels, microspheres and liposomes, for the oral (Diab et al., 2017), the intra-vitreous (Bochot and Fattal, 2012), and the transdermal (Naves et al., 2017) routes, only few papers provide a critical assessment of IVD-specific approaches for local and sustained delivery. Here, we highlight the rationale selection of natural or synthetic polymers, we exemplify the design of delivery systems based on macro-, micro-, and nano- sized properties, and we illustrate how multiscaled combined systems might help direct IVD regenerative medicine strategies.

5.1. Natural and synthetic polymers

One key parameter in the design of delivery systems is the selection of the constitutive polymer, as chemical functionalities of a polymer affect all performance aspects, including encapsulation efficiency, polymer degradation rate and release (Mitragotri et al., 2014). As such, recent advances in delivery systems are based on polymers tailored for a specific tissue and engineered to exert distinct biological functions.

5.1.1. Natural polymers

Among natural polymers, collagen, hyaluronic acid, alginate and chitosan were extensively studied (Sionkowska, 2011). Extracted from natural sources or obtained by bacterial fermentation, these macromolecules present various advantages such as large-scale production, low toxicity and similarity to ECM components.

Collagen, a major component of healthy IVD ECM, exhibits biodegradability, weak antigenicity and superior biocompatibility as compared to other natural proteins. Collagen widespread biomedical use is based on its ability to be shaped into films, sponges, micro or nanoparticles (Liu et al., 2013). Gelatin, derived from collagen hydrolysis, is biodegradable in a physiological environment, with the formation of harmless metabolic products. In degenerated IVD, injectable gelatin microspheres impregnated with PRP reduced NP-cells apoptosis and slowed down degeneration in adult rabbits (Sawamura et al., 2009). Hyaluronic acid (HA), another leading constituent of the NP ECM, was also studied as a scaffold for tissue engineering (Sionkowska et al., 2016), but less for IVD strategies.

While they cannot be found in the human body, alginate, a cell-wall polysaccharide constituent of brown algae, and chitosan, a polysaccharide synthesized by crustaceans, were used for multiple biomedical applications (Bernkop-Schnürch and Dünhaupt, 2012). Alginate microparticles were designed for the *in vitro* delivery of PRP for the treatment of degenerated IVD (Sawamura et al., 2009), although their ionic gelation-dependent low stability in the body might constitute a drawback. Similarly, cationic chitosan was considered for IVD regenerative applications, as cell or molecule carrier (Cheng et al., 2010; Roughley et al., 2006).

5.1.2. Synthetic polymers

Synthetic polymers are obtained through reproducible industrial processes, with tunable physicochemical and mechanical properties. The most commonly used for drug delivery systems are poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and poly-ε-caprolactone (PCL) (Kondiah et al., 2016).

PLGA microspheres were widely used for the release of TGF- β 3 or anti-inflammatory molecules (Bhardwaj et al., 2007; Liang et al., 2013). They were used for recombinant human GDF-5 delivery *in vivo* in a rat model and increased the aggrecan and type II collagen synthesis (Yan et al., 2013). PLGA microspheres were also used for the sustained delivery of IL-1 β receptor antagonist in a 3D culture model and this treatment effectively attenuates IL-1 β -mediated inflammatory response of the 3D cultured NP-cells (Gorth et al., 2012).

PCL, a semi-crystalline and hydrophobic polymer, is currently used in FDA-approved sutures for surgery or and in commercially available contraceptive devices (Wei et al., 2009). PCL is often associated with hydrophilic polymers, either natural or synthetic ones (*e.g.* PEG, PAA or pNIPAAm) to form di- or triblock amphiphilic copolymers (Fu et al., 2014; Li and Tan, 2015). Moreover, PCL was extensively used for IVD tissue engineering, especially for AF repair (Wisner et al., 2014). PCL-based or PCL-coated microparticles were successfully designed for the sustained delivery of bioactive, although not for IVD applications molecules (Jung et al., 2015; Z. Luo et al., 2016).

In a context of IVD regenerative medicine, the usefulness of these natural and synthetic polymers is broadened further by our ability to create systems with multiple shapes and sizes that convey drugs, cytokines, growth factors or stem cells in a controlled manner. They are reviewed in the following sections.

5.2. *In situ* forming hydrogels as macro-scaled delivery systems

Hydrogels, networks of hydrophilic polymers capable of absorbing large amounts of water, are of particular interest for highly hydrated NP and AF tissue regeneration. Besides water, they provide a mechanical support and a 3D microenvironment adapted for cell survival and proliferation. Attention was focused on the development of stimuli-responsive polymer solutions that could be injected in a minimally invasive manner prior to *in situ* solidifying, ensuring a perfect fit to the desired tissue. Hydrogels *in situ* formation occurs through chemical covalent bonds or physical bonds (electrostatic or hydrophobic interactions).

Among chemical cross-linking, photo-induced crosslinking requires to produce radical initiating species and a precursor solution of a photoreactive polymer, usually a polyethylene glycol (PEG) acrylate or methacrylate derivative (Francisco et al., 2014; Li et al., 2014). While the use of photo-crosslinked polymers allows a time-controlled gelation, limited access of the light apparatus to the target tissue weakens this strategy for IVD regeneration. Click chemistry, Schiff's base chemistry, Michael-type reactions or enzymatic, protein or pH modification based crosslinking approaches might be better suited for IVD *in situ* gelation (Blanquer et al., 2014). These processes are generally compatible with cell or bioactive molecule loading as they often take place in mild conditions (37°C, physiological pH, short time period). In the early 2000, a silanized cellulose-based hydrogel, which crosslinking is triggered by pH was developed (Bourges et al., 2002). This hydrogel already demonstrated its interest for articular cartilage (Vinatier et al., 2009) and myocardium regeneration (Mathieu et al., 2012) and is currently studied for IVD regeneration (Henry et al., 2017).

Physically cross-linked hydrogels are formed via non-covalent interactions in response to an external stimulus (pH, temperature, molecule level, light, pressure, electric current) (Qiu and Park, 2012). Thermoresponsive polymers spontaneously undergo a sol-gel transition when exposed to a physiological temperature after *in vivo* injection. Recombinant polypeptides (*e.g.* elastin-like polypeptide (Nettles et al., 2010)), naturally-derived polysaccharides (*e.g.* chitosan (Cheng et al., 2013)) and synthetic polymers (*e.g.* block copolymers of PEG and PLGA (Tran et al., 2012), poly (N-isopropylacrylamide) (p-NIPAAm) (Willems et al., 2015)) are the most commonly reported thermo-responsive polymers for IVD regeneration.

***In situ* forming hydrogels** exhibit many advantages for IVD treatment. They bring an aqueous environment that can rehydrate the degenerated microenvironment, protect biologics and can restore, at least partially, IVD mechanical properties. Hydrogels permeability allows a good transport of nutrient to encapsulated cells. Nevertheless, hydrogels can present some restrictive properties such as weak mechanical properties. One of the main drawback of *in situ* forming bulk hydrogels is the difficulty to tune their release characteristics. Indeed, while diffusion of entrapped molecules can be slightly modified by adjusting the polymer network mesh, exchanges with the targeted microenvironment are limited to the interface hydrogel/tissue, usually in the order of few cm²/g. By comparison, micro- and nano-scaled delivery system can develop a specific area superior to 1000 m²/g as measured by N₂ adsorption-desorption experiments.

5.3. Micro-scaled delivery systems

In parallel to stimuli-responsive polymer solutions ensuring a perfect fit to the IVD defect following *in situ* gelation, injectable micro-sized particles, with diameters varying from 20 µm to 200 µm, provide with release kinetics depending on their size and shape. Their release properties can be modified by tuning parameters such as size, chemical composition, crosslinking degree or polymer molecular weight (Balmert and Little, 2012). Moreover, chemical modification of microparticles surface can allow for covalent coupling of factors such as antibodies and receptors. Microparticles are able to deliver biological factors over a long period of time while protecting them from inactivation (Wenk et al., 2009).

Many inorganic and polymer-based microparticles can be prepared by simple or double emulsion methods, in which a solution of the material is emulsified in water, then particles are formed during the evaporation of the organic solvent. A recent modified protocol combines a crosslinking process and the emulsion step in oil phase (Phromsopha and Baimark, 2014). Other production methods are spray drying, gelation, coacervation, electrospray, supercritical fluid mixing and microfluidic technique. While their main advantage over classical emulsion is the narrower particle size distribution, the yield is often disappointing.

Recently, GDF-5-loaded PLGA microspheres, with an *in vitro* sustained delivery for 42 days, were injected in rat degenerated IVDs. A restoration of the disc height to almost 90% of the non-punctured disc was achieved (Yan et al., 2013). Moreover, the injection significantly increased aggrecan and type II collagen the mRNA expression, whereas type I collagen mRNA expression was significantly decreased, implying that a micro-sized carrier could be of interest for IVD regeneration (Yan et al., 2013).

5.4. Nano-scaled delivery systems

In parallel to microparticles, many materials were used to design nanoparticles for biomedical applications, as nanocarriers are easily taken up by cells (Wilczewska et al., 2012). Polymeric nanoparticles, liposomes, dendrimers, polymers, silicon or carbon materials, and magnetic nanoparticles are examples of nano-carriers used as drug delivery systems notably for cancer (Sun et al., 2014) or bone regeneration (van Rijt and Habibovic, 2017). In this section, we highlight the ones that can reasonably be considered in the context of DDD.

5.4.1. Polymeric nanoparticles

Bioactive molecules can be either encapsulated or immobilized onto the surface of the nanoparticles, then released by desorption, diffusion, or nanoparticle erosion. Thus, degradable nanocarriers are widely used in biomedical applications as they can be hydrolyzed *in situ* (Kohane et al., 2006) and often considered to be biocompatible with tissues and cells, as they do not induce pro-inflammatory or immune reactions (des Rieux et al., 2006). An upregulation of aggrecan and type II collagen was obtained with using chitosan/Poly-(c-glutamic acid) nanoparticles loaded with an anti-inflammatory drug, diclofenac. These

nanoparticles were injected in a needle-punctured bovine IVD cultured *in vitro* with IL-1 β . Additionally, a down-regulation of IL-6, IL-8, MMP1 and MMP3 was noted (Teixeira et al., 2016).

5.4.2. Liposomes

Self-organized spherical liposomes, usually 80-300 nm in diameter, contain at least one lipid bilayer surrounding an aqueous core (Daraee et al., 2014). They are thus able to encapsulate both hydrophobic and hydrophilic molecules within the lipid bilayer or the aqueous core, respectively. Liposomes were first used to improve chemotherapeutic agent solubility and therapeutic index, by allowing targeted delivery and enhanced tissue penetration. Since liposomes interact with cells by adsorption, fusion, endocytosis or lipid transfer, they were studied as gene and siRNA carriers, especially cationic liposomes (Majzoub et al., 2016). Release kinetics can be tuned by liposome composition, pH, osmotic gradient, incorporation of temperature- or pH-sensitive lipids (dos Santos Giuberti et al., 2011), and the surrounding environment.

Liposomes were thus used for drug delivery in various applications such as anti-cancer or anti-inflammation therapies, or to reach specific organs (lungs, liver, spleen, brain). However, their use for tackling IVD degeneration is not reported yet. Interestingly, lipid nanocapsules were successfully designed for nucleic acid delivery (Huynh et al., 2009) and their application to siRNA delivery for IVD regeneration could be of interest.

5.4.3. Dendrimers

Dendrimers are branched polymers which toxicity is mainly related to functional groups presented at the surface layer and can be lowered by functionalization, *e.g.* by PEGylation (Zeng et al., 2016). This functionalization improves dendrimers surface activity, biological and physicochemical properties. Drugs are entrapped in the internal structure of the dendrimer, adsorbed or chemically bonded onto the dendrimer surface according to its properties (sensitivity to temperature of pH, toxicity, solubility). One of the most commonly used in biomedical applications, is the poly-(amino amide) (PAMAM) as it was proven non-toxic and safe (Chauhan et al., 2009) and its capacity of gene or drug delivery was extensively explored (Zhao et al., 2011). Indeed, PAMAM dendrimers can modulate cytokine and chemokine release (Seelbach et al., 2015) and exhibit an anti-inflammatory behavior by inhibiting pro-inflammatory cytokine secretion (Bosch, 2011). Thereby, dendrimers demonstrated their suitability in rheumatoid arthritis and musculoskeletal diseases and their application in IVD regeneration could be envisioned.

5.4.4. Carbon nanoparticles

The most commonly used carbon nanoparticles are carbon-nanotubes and were widely studied for drug delivery in biomedical applications (Beg et al., 2011). They are characterized by a single or multiwall graphene-based tube with a high specific surface area and possible excellent electronic and thermal conductivity (Beg et al., 2011). They have excellent mechanical properties and are thus of interest as fillers in composite materials (Harrison and Atala, 2007). Toxicity due to their dimensions and released impurities was reported, but their biocompatibility can be enhanced with chemical surface engraftment of PEG, PAMAM or albumin (Harrison and Atala, 2007). Molecules are encapsulated inside carbon-nanotubes or chemically adsorbed onto their surface. Carbon-nanotubes improve hydrogels mechanical properties (Dong et al., 2013) and can be of potential interest for IVD regenerative medicine.

5.4.5. Silica nanoparticles

Mesoporous silica is a widely studied biomaterial regarding its drug delivery capacity in particular for cancer therapies (Yang and Yu, 2016) or nerve growth (Sun et al., 2016). Indeed, mesoporous colloidal silica exhibit several advantages such as cytocompatibility, high specific surface area and ease of functionalization (Moritz and Geszke-Moritz, 2015). Additionally, silica nanoparticles size, shape, surface pattern, porosity and pore size are easily tunable (Hoffmann et al., 2006). In the biomedical field, best known mesoporous silica nanoparticles are MCM-41 and SBA-15. Drug loading into mesoporous silica might occur *via* chemical or physical adsorption and release is usually controlled by diffusion throughout the mesopores. The potential of these particles was demonstrated for biomedical applications (Vallet-Regi and Balas, 2008) and more recently, for the IVD (Henry et al., 2017).

499

500 **5.5. Multiscaled systems for complex regenerative strategies**

501 Over the past few years, composite materials, composed of at least two distinct components, drew
502 attention in biomedical engineering since they possess additional properties that each constituent alone
503 does not exhibit. They were widely studied for bone regeneration, and successful clinical trials were
504 recently reviewed (Jahan and Tabrizian, 2016).

505 Regarding specific IVD applications, we would like to direct the reader's attention to multiscaled systems
506 illustrated in Figure 4 that emphasizes the integration of technologies such as *in situ* forming hydrogels
507 with ready-to-use micro or nanoparticles. The assembly of specific functionalities obtained by combining
508 a bulk matrix, to restore hydration and mechanical properties, with a long-term reservoir of cells or
509 molecules, to provide biological cues, could constitute a breakthrough in IVD regenerative therapies. The
510 main outcome of this review is to highlight the crucial role of biomaterials in IVD regenerative medicine
511 strategies. With regards to the aforementioned device needs, we want to stress out that biomaterials are
512 considered the driving force of the IVD regenerative medicine train (Figure 5). Biomaterials are essential
513 for the design and development of hydrogels capable of restoring load-bearing function while supporting
514 cells until an appropriate ECM is synthesized. Biomaterials are also essential for engineering efficient and
515 robust delivery devices that can be tailored to specific tissues.

516 For example, we recently reported a multiscaled system where Si-HPMC hydrogel, supplemented with
517 rod-shaped silica nanofibers, provided a sustained release of TGF- β 1 and GDF-5, as compared to the plain
518 hydrogel, while maintaining their *in vitro* biological activity (Henry et al., 2017). Recently, TGF- β 3
519 loaded PLGA nanoparticles dispersed in a dextran/gelatin hydrogel, although not injectable, increased the
520 gene expression of both aggrecan and type II collagen of MSCs *in vitro* (Gan et al., 2016). We believe that
521 promising engineering technologies such as interpenetrating network-strengthened hydrogel (Gan et al.,
522 2017), self-assembling nanofibrous peptide hydrogel (Wan et al., 2016) and programmed
523 sequential bioactive factors delivery to target multiple repair steps (Bayer et al., 2017), could bring
524 significant advances to IVD regenerative strategies. Finally, an ambitious strategy would aim at delivering
525 chemo-attractants from micro or nanoparticles to attract progenitor cells towards a hydrogel-based
526 microenvironment that would promote endogenous repair.

527

528

529

6. Conclusion

IVD degeneration is a major health concern and thanks to recent discoveries, the physiopathology of this disease is today better understood. Building on this deeper knowledge, various biotherapies were proposed in the past few years, including cell-based therapies, molecular therapies and nucleic acid-based therapies. These therapies aim at locally injecting biologics including cells, proteins or DNA as mentioned above. Even if promising results were obtained so far *in vitro*, the harsh environment of degenerated IVD is however a major concern that has hampered the clinical translatability of such concepts. The main outcome of this review is to highlight the essential role of biomaterials in the IVD regenerative medicine strategies. Indeed, injectable *in situ* crosslinking hydrogels could restore IVD height and hydration and would be particularly suited for IVD regenerative strategies. Additionally, hydrogels can improve cell viability and protect bioactive molecules from *in situ* degradation. Finally, hydrogels can be used as scaffolds, supplemented or not with micro or nanoparticles. These so-formed multiscaled systems would allow a sustained delivery of the biologics promoting long-term IVD regenerative processes.

The design of the optimal system for IVD regeneration is still under debate as disc degeneration is a multifactorial disease. In view of the major cell number decrease with degeneration, cell-based therapies were widely considered. However, the regulatory framework and the costs associated with these strategies may restrict their use. We believe that an effective approach would target the early degenerative processes and involve multiscaled biomaterials allowing molecules to be sustainably delivered *in situ* for enabling a prolonged stimulation of endogenous repair.

7. Acknowledgements

Authors acknowledge financial support from: Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée (AP-RMA-2015-018), Région Pays de la Loire (Paris Scientifique BIO2, LMA project and DIVA project), Agence Nationale pour la Recherche (REMEDIIV, JC/JC STIMUDISC) and Fondation pour la Recherche Médicale (DBS20131128442).

8. Figures legends

Figure 1: Healthy intervertebral disc (IVD) local vascularization, innervation and internal organization

A. Located between vertebrae, IVD is composed of two vertebral endplates, an *Annulus fibrosus* (purple) and a *Nucleus pulposus* (NP, blue). Since IVD is non-innervated and non-vascularized, oxygen and glucose supply as well as metabolite excretion occur by diffusion through the vertebral endplates. This particular property induces specific conditions of osmolarity and pH, leading the IVD resident cells to adapt their metabolism. B. In AF tissue, fibroblast-like cells are organized parallel to collagen concentric lamellae. In NP tissue, large vacuolated notochordal cells and nucleopulpocytes coexist and ensure the extracellular matrix homeostasis.

Figure 2: NP homeostasis rupture leads to IVD degeneration

In a healthy IVD, regulation of anabolic and catabolic processes (i.e., homeostasis) enables the tissue to be hydrated and maintains its mechanical properties. Under various factors such as genetic, aging, environmental causes or mechanical stress, the cellular dialogue underlying the extracellular matrix homeostasis is disrupted. This rupture causes lower anabolism and increased catabolism, ultimately

leading to ECM degradation, tissue inflammation, vascularization, fibrosis and nerve ingrowth. Altogether, these phenomena are the key players of IVD degeneration.

Figure 3: Current IVD regenerative medicine is based on three approaches

Cell-based therapies. Considering the pivotal role of cell number decrease in IVD degeneration, cell-based therapies have been increasingly considered. Autologous or allogeneic cells have been proposed and stem cells have been the object of massive investigations. Stem cells have been mainly isolated from adipose tissue or bone marrow and more recently, pluripotent stem cells have been contemplated. It is also largely debated whether the optimal cells for IVD repair should be differentiated or undifferentiated. **Molecular therapies.** The broadened understanding of the phenomena involved during IVD degeneration has made it possible to consider molecular therapies via the direct injection of various factors to promote anabolism, to manage inflammation or to attract regenerative cells. **Nucleic acid-based therapies.** Recent approaches target DNA and miRNA sequences and mostly aim to downplay catabolic factor expression. Finally, combined approaches such as genetically modified cells that could contribute to decreasing MMP local expression and activity, could potentiate the efficacy of these therapies.

Figure 4: Multiscaled systems associate in situ forming scaffolds with ready-to-use particles

In the context of IVD regenerative medicine, we propose to combine in situ forming systems with ready-to-use micro- or nanoparticles, thereby forming multiscaled systems. Indeed, we hypothesize that injectable polymers that undergo a local gel formation will restore IVD hydration and mechanical properties, while micro- or nano-sized carriers loaded with cells or molecules will provide supportive cues for regenerative processes.

Figure 5: Biomaterials: the driving force of the IVD regenerative medicine train

Biomaterials are essential for the design and development of delivery systems for IVD regenerative medicine. Indeed, they can protect and deliver nucleic acid, bioactive molecules or cells for a long period of time and may thus contribute to regenerating the degraded ECM of IVD.

9. References

- Abdel Shaheed, C., Maher, C.G., Williams, K.A., Day, R., McLachlan, A.J., 2016. Efficacy, Tolerability, and Dose-Dependent Effects of Opioid Analgesics for Low Back Pain. *JAMA Intern. Med.* 176, 958. doi:10.1001/jamainternmed.2016.1251
- Alkhatib, B., Rosenzweig, D.H., Krock, E., Roughley, P.J., Beckman, L., Steffen, T., Weber, M.H., Ouellet, J.A., Haglund, L., Scoliosis, M., 2014. Acute mechanical injury of the human intervertebral discs - Link to degeneration and pain. *Eur. Cell. Mater.* 28, 98–111.
- Ankrum, J.A., Ong, J.F., Karp, J.M., 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 32, 252–260. doi:10.1038/nbt.2816
- Baliga, S., Treon, K., Craig, N.J.A., 2015. Low back pain: Current surgical approaches. *Asian Spine J.* 9, 645–657. doi:10.4184/asj.2015.9.4.645
- Balmert, S.C., Little, S.R., 2012. Biomimetic Delivery with Micro- and Nanoparticles. *Adv. Mater.* 24, 3757–3778. doi:10.1038/jid.2014.371

613 Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116,
614 281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5

615 Bayer, E.A., Jordan, J., Gottardi, R., Fedorchak, M., Kumta, P.N., Little, S., 2017. Programmed
616 Platelet Derived Growth Factor- β and Bone Morphogenetic Protein-2 Delivery from a
617 Hybrid Calcium Phosphate/Alginate Scaffold. *Tissue Eng. Part A* Ahead of print.
618 doi:10.1089/ten.TEA.2017.0027

619 Bedore, J., Leask, A., Séguin, C.A., 2014. Targeting the extracellular matrix: Matricellular
620 proteins regulate cell-extracellular matrix communication within distinct niches of the
621 intervertebral disc. *Matrix Biol.* 37, 124–130. doi:10.1016/j.matbio.2014.05.005

622 Beg, S., Rizwan, M., Sheikh, A.M., Hasnain, M.S., Anwer, K., Kohli, K., 2011. Advancement in
623 carbon nanotubes: Basics, biomedical applications and toxicity. *J. Pharm. Pharmacol.* 63,
624 141–163. doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01167.x

625 Bernkop-Schnürch, A., Dünnhaupt, S., 2012. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur. J.*
626 *Pharm. Biopharm.* 81, 463–469. doi:10.1016/j.ejpb.2012.04.007

627 Bhardwaj, U., Sura, R., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J., 2007. Controlling acute
628 inflammation with fast releasing dexamethasone-PLGA microsphere/pva hydrogel
629 composites for implantable devices. *J. diabetes Sci. Technol.* 1, 8–17.
630 doi:10.1177/193229680700100103

631 Blanco, J.F., Graciani, I.F., Sanchez-Guijo, F.M., Muntion, S., Hernandez-Campo, P.,
632 Santamaria, C., Carrancio, S., Barbado, M.-V., Cruz, G., Gutierrez-Cosio, S., Herrero, C.,
633 San Miguel, J.F., Brinon, J.G., del Canizo, M.-C., 2010. Isolation and characterization of
634 mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with
635 bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects. *Spine (Phila. Pa. 1976).*
636 35, 2259–2265. doi:10.1097/BRS.0b013e3181cb8828

637 Blanquer, S.B.G., Grijpma, D.W., Poot, A. a., 2014. Delivery systems for the treatment of
638 degenerated intervertebral discs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 84, 172–187.
639 doi:10.1016/j.addr.2014.10.024

640 Bochet, A., Fattal, E., 2012. Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. *J.*
641 *Control. Release* 161, 628–634. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.019

642 Bosch, X., 2011. Dendrimers to treat rheumatoid arthritis. *ACS Nano* 5, 6779–6785.
643 doi:10.1021/nn203190x

644 Bourges, X., Weiss, P., Daculsi, G., Legeay, G., 2002. Synthesis and general properties of
645 silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface*
646 *Sci* 99, 215–228.

647 Chauhan, A.S., Jain, N.K., Diwan, P. V., 2009. Pre-clinical and behavioural toxicity profile of
648 PAMAM dendrimers in mice. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 466, 1535–1550.
649 doi:10.1098/rspa.2009.0448

650 Chen, J., Lee, E.J., Jing, L., Christoforou, N., Leong, K.W., Setton, L.A., 2013. Differentiation of
651 mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) into nucleus pulposus-like cells in vitro. *PLoS*
652 *One* 8, e75548. doi:10.1371/journal.pone.0075548

653 Cheng, Y.H., Yang, S.H., Liu, C.C., Gefen, A., Lin, F.H., 2013. Thermosensitive hydrogel made
654 of ferulic acid-gelatin and chitosan glycerophosphate. *Carbohydr. Polym.* 92, 1512–1519.

doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.074

Cheng, Y.H., Yang, S.H., Su, W.Y., Chen, Y.C., Yang, K.C., Cheng, W.T., Wu, S.C., Lin, F.H., 2010. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration: an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 16, 695–703. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0229

Chujo, T., An, H.S., Akeda, K., 2006. Effects of Growth Differentiation Factor-5 on the Intervertebral Disc % In Vitro Bovine Study and In Vivo Rabbit Disc Degeneration Model Study. *Spine (Phila Pa 1976)* 31, 2909–2917.

Colombier, P., Camus, A., Lescaudron, L., Clouet, J., Guicheux, J., 2014. Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissue engineers. *Trends Biotechnol.* 32, 433–5. doi:10.1016/j.tibtech.2014.05.006

Colombier, P., Clouet, J., Boyer, C., Ruel, M., Bonin, G., Lesoeur, J., Moreau, A., Fellah, B.H., Weiss, P., Lescaudron, L., Camus, A., Guicheux, J., 2016. TGF- β 1 and GDF5 Act Synergistically to Drive the Differentiation of Human Adipose Stromal Cells toward Nucleus Pulposus -like Cells. *Stem Cells* 34, 653–667. doi:10.1002/stem.2249

Colombini, A., Lombardi, G., Corsi, M.M., Banfi, G., 2008. Pathophysiology of the human intervertebral disc. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 837–842. doi:10.1016/j.biocel.2007.12.011

Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., Akbarzadeh, A., 2014. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 1401, 1–11. doi:10.3109/21691401.2014.953633

des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J., Préat, V., 2006. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Control. Release* 116, 1–27. doi:10.1016/j.jconrel.2006.08.013

Diab, R., Canilho, N., Pavel, I.A., Haffner, F.B., Girardon, M., Pasc, A., 2017. Silica-based systems for oral delivery of drugs, macromolecules and cells. *Adv. Colloid Interface Sci.* In press. doi:http://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.005

Dong, W., Huang, C., Wang, Y., Sun, Y., Ma, P., Chen, M., 2013. Superior mechanical properties of double-network hydrogels reinforced by carbon nanotubes without organic modification. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 22380–22394. doi:10.3390/ijms141122380

dos Santos Giuberti, C., de Oliveira Reis, E.C., Ribeiro Rocha, T.G., Leite, E.A., Lacerda, R.G., Ramaldes, G.A., de Oliveira, M.C., 2011. Study of the pilot production process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. *J. Liposome Res.* 21, 60–9. doi:10.3109/08982101003754377

Elmasry, S., Asfour, S., De Rivero Vaccari, J.P., Travascio, F., 2015. Effects of tobacco smoking on the degeneration of the intervertebral disc: A finite element study. *PLoS One* 10, 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0136137

Enochson, L., Stenberg, J., Brittberg, M., Lindahl, a, 2014. GDF5 reduces MMP13 expression in human chondrocytes via DKK1 mediated canonical Wnt signaling inhibition. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 566–77. doi:10.1016/j.joca.2014.02.004

Erwin, W.M., Ashman, K., O'Donnel, P., Inman, R.D., 2006. Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by

697 intervertebral disc chondrocytes. *Arthritis Rheum* 54, 3859–3867. doi:10.1002/art.22258
 698 Erwin, W.M., Islam, D., Inman, R.D., Fehlings, M.G., Tsui, F.W., 2011. Notochordal cells
 699 protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the
 700 mechanisms of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 13, R215.
 701 doi:10.1186/ar3548
 702 Feng, C., Liu, H., Yang, Y., Huang, B., Zhou, Y., 2015. Growth and Differentiation Factor-5
 703 Contributes to the Structural and Functional Maintenance of the Intervertebral Disc. *Cell.*
 704 *Physiol. Biochem.* 35, 1–16. doi:10.1159/000369670
 705 Fontana, G., See, E., Pandit, A., 2015. Current trends in biologics delivery to restore
 706 intervertebral disc anabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 84, 146–158.
 707 doi:10.1016/j.addr.2014.08.008
 708 Francisco, A.T., Hwang, P.Y., Jeong, C.G., Jing, L., Chen, J., Setton, L.A., 2014.
 709 Photocrosslinkable laminin-functionalized polyethylene glycol hydrogel for intervertebral
 710 disc regeneration. *Acta Biomater.* 10, 1102–1111. doi:10.1016/j.actbio.2013.11.013
 711 Fu, W., Liu, Z., Feng, B., Hu, R., He, X., Wang, H., Meng, Y., Huang, H., Zhang, H., Wang, W.,
 712 2014. Electrospun gelatin / PCL and collagen / PLCL scaffolds for vascular tissue
 713 engineering. *Int. J. Nanomedicine* 9, 2335–2344. doi:10.2147/IJN.S61375
 714 Galbusera, F., Bellini, C.M., Zweig, T., Ferguson, S., Raimondi, M.T., Lamartina, C., Brayda-
 715 Bruno, M., Fornari, M., 2008. Design concepts in lumbar total disc arthroplasty. *Eur. Spine*
 716 *J.* 17, 1635–1650. doi:10.1007/s00586-008-0811-x
 717 Gan, Y., Li, P., Wang, L., Mo, X., Song, L., Xu, Y., Zhao, C., Ouyang, B., Tu, B., Luo, L., Zhu,
 718 L., Dong, S., Li, F., Zhou, Q., 2017. An interpenetrating network-strengthened and
 719 toughened hydrogel that supports cell-based nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials*
 720 136, 12–28. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.05.017
 721 Gan, Y., Li, S., Li, P., Xu, Y., Wang, L., Zhao, C., Ouyang, B., Tu, B., Zhang, C., Luo, L., Luo,
 722 X., Mo, X., Zhou, Q., 2016. A Controlled Release Codelivery System of MSCs
 723 Encapsulated in Dextran/Gelatin Hydrogel with TGF- β 3-Loaded Nanoparticles for Nucleus
 724 Pulposus Regeneration. *Stem Cells Int.* 2016. doi:10.1155/2016/9042019
 725 Goldspiel, B.R., Green, L., Calis, K.A., 1993. Human gene therapy. *Clin. Pharm.* 12, 488–505.
 726 Gorth, D.J., Mauck, R.L., Chiaro, J.A., Mohanraj, B., Hebel, N.M., Dodge, G.R., Elliott, D.M.,
 727 Smith, L.J., 2012. IL-1ra delivered from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres
 728 attenuates IL-1 β -mediated degradation of nucleus pulposus in vitro. *Arthritis Res. Ther.* 14,
 729 R179. doi:10.1186/ar3932
 730 Grad, S., Bow, C., Karppinen, J., Luk, K.D., Cheung, K.M., Alini, M., Samartzis, D., 2016.
 731 Systemic blood plasma CCL5 and CXCL6: Potential biomarkers for human lumbar disc
 732 degeneration. *Eur. Cell. Mater.* 30, 1–10.
 733 Gruber, H., Marrero, E., Ingram, J., Hoelscher, G., Hanley, E., 2016. The chemokine, CXCL16,
 734 and its receptor, CXCR6, are constitutively expressed in human annulus fibrosus and
 735 expression of CXCL16 is up-regulated by exposure to IL-1 β in vitro. *Biotech. Histochem.*
 736 295, 1–8. doi:10.1080/10520295.2016.1237672
 737 Gruber, H.E., Hoelscher, G.L., Ingram, J.A., Bethea, S., Hanley, E.N., 2014a. Growth and
 738 differentiation factor-5 (GDF-5) in the human intervertebral annulus cells and its modulation

739 by IL-1b and TNF-b in vitro. *Exp. Mol. Pathol.* 96, 225–229.
740 doi:10.1016/j.yexmp.2014.02.005

741 Gruber, H.E., Hoelscher, G.L., Ingram, J.A., Bethea, S., Norton, H.J., Hanley, E.N., 2014b.
742 Production and expression of RANTES (CCL5) by human disc cells and modulation by IL-
743 1- β and TNF- α in 3D culture. *Exp. Mol. Pathol.* 96, 133–138.
744 doi:10.1016/j.yexmp.2014.01.002

745 Hadjipavlou, a G., Tzermiadianos, M.N., Bogduk, N., Zindrick, M.R., 2008. The
746 pathophysiology of disc degeneration: a critical review. *J. Bone Joint Surg. Br.* 90, 1261–
747 1270. doi:10.1302/0301-620X.90B10.20910

748 Harrison, B.S., Atala, A., 2007. Carbon nanotube applications for tissue engineering.
749 *Biomaterials* 28, 344–353. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.044

750 Henriksson, H.B., Svanvik, T., Jonsson, M., Sci, L.M., Hagman, M., Horn, M., Lindahl, A.,
751 Brisby, H., 2009. Transplantation of Human Mesenchymal Stems Cells Into Intervertebral
752 Discs in a Xenogeneic Porcine Model. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 34, 141–148.

753 Henry, N., Clouet, J., Le Visage, C., Weiss, P., Gautron, E., Humber, B., Terrisse, H., Guicheux,
754 J., Le Bideau, J., 2017. Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of protein-
755 silica interactions. *J Mater Chem B* 5, 2908–2920. doi:10.1039/C7TB00332C

756 Hirshi, K.K., Li, S., Roy, K., 2014. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine.
757 *Annu Rev Biomed Eng* 16, 277–294. doi:10.1021/nl061786n.Core-Shell

758 Hiyama, A., Mochida, J., Iwashina, T., Omi, H., Watanabe, T., Serigano, K., Tamura, F., Sakai,
759 D., 2008. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J.*
760 *Orthop. Res.* 26, 589–600. doi:10.1002/jor.20584

761 Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., Froba, M., 2006. Silica based mesoporous organic-
762 inorganic hybrid materials. *Angew Chem Int Ed* 45, 3216–51. doi:10.1002/anie.200503075

763 Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2009. Lipid nanocapsules: A new platform
764 for nanomedicine. *Int. J. Pharm.* 379, 201–209. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.026

765 Illien-Junger, S., Grosjean, F., Laudier, D.M., Vlassara, H., Striker, G.E., Iatridis, J.C., 2013.
766 Combined Anti-Inflammatory and Anti-AGE Drug Treatments Have a Protective Effect on
767 Intervertebral Discs in Mice with Diabetes. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0064302

768 Illien-Jünger, S., Pattappa, G., Peroglio, M., Benneker, L.M., Stoddart, M.J., Sakai, D., Mochida,
769 J., Grad, S., Alini, M., 2012. Homing of Mesenchymal Stem Cells in Induced Degenerative
770 Intervertebral Discs in a Whole Organ Culture System. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 37, 1865–
771 1873. doi:10.1097/BRS.0b013e3182544a8a

772 Jahan, K., Tabrizian, M., 2016. Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in
773 bony defects. *Biomater. Sci.* 4, 25–39. doi:10.1039/C5BM00163C

774 Jeong, J.H., Jin, E.S., Min, J.K., Jeon, S.R., Park, C.S., Kim, H.S., Choi, K.H., 2009. Human
775 mesenchymal stem cells implantation into the degenerated coccygeal disc of the rat.
776 *Cytotechnology* 59, 55–64. doi:10.1007/s10616-009-9192-1

777 Jung, S.-M., Yoon, G.H., Lee, H.C., Shin, H.S., 2015. Chitosan nanoparticle/PCL nanofiber
778 composite for wound dressing and drug delivery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 26, 252–263.
779 doi:10.1080/09205063.2014.996699

780 Kaku, M., Kitami, M., Rosales Rocabado, J.M., Ida, T., Akiba, Y., Uoshima, K., 2017.
781 Recruitment of bone marrow-derived cells to the periodontal ligament via the stromal cell-
782 derived factor-1/C-X-C chemokine receptor type 4 axis. *J. Periodontal Res.* Ahead of print.
783 doi:10.1111/jre.12433

784 Kawaguchi, S., Yamashita, T., Katahira, G., Yokozawa, H., Torigoe, T., Sato, N., 2002.
785 Chemokine profile of herniated intervertebral discs infiltrated with monocytes and
786 macrophages. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 27, 1511–6. doi:10.1097/00007632-200207150-
787 00006

788 Kepler, C.K., Markova, D.Z., Dibra, F., Yadla, S., Vaccaro, A.R., Risbud, M. V, Albert, T.J.,
789 Anderson, D.G., 2013a. Expression and relationship of proinflammatory chemokine
790 RANTES/CCL5 and cytokine IL-1 β in painful human intervertebral discs. *Spine (Phila. Pa.*
791 *1976)*. 38, 873–80. doi:10.1097/BRS.0b013e318285ae08

792 Kepler, C.K., Ponnappan, R.K., Tannoury, C. a, Risbud, M. V, Anderson, D.G., 2013b. The
793 molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J.* 13, 318–30.
794 doi:10.1016/j.spinee.2012.12.003

795 Kohane, D.S., Tse, J.Y., Yeo, Y., Padera, R., Shubina, M., Langer, R., 2006. Biodegradable
796 polymeric microspheres and nanospheres for drug delivery in the peritoneum. *J. Biomed.*
797 *Mater. Res. - Part A* 77, 351–361. doi:10.1002/jbm.a.30654

798 Kondiah, P.J., Choonara, Y.E., Kondiah, P.P.D., Marimuthu, T., Kumar, P., Du Toit, L.C., Pillay,
799 V., 2016. A review of injectable polymeric hydrogel systems for application in bone tissue
800 engineering. *Molecules* 21. doi:10.3390/molecules21111580

801 Kristin, C., Robert, S., Michelle, P., 2017. Effects of the intradiscal implantation of stromal
802 vascular fraction plus platelet rich plasma in patients with degenerative disc disease. *J.*
803 *Transl. Med.* 15, 12. doi:10.1186/s12967-016-1109-0

804 Latimer, J., Maher, C., Refshauge, K., 2004. The attitudes and beliefs of physiotherapy students
805 to chronic back pain. *Clin. J. Pain* 20, 45–50. doi:10.1097/00002508-200401000-00009

806 Le Maitre, C.L., Hoyland, J.A., Freemont, A.J., 2007. Interleukin-1 receptor antagonist delivered
807 directly and by gene therapy inhibits matrix degradation in the intact degenerate human
808 intervertebral disc: an in situ zymographic and gene therapy study. *Arthritis Res. Ther.* 9,
809 R83. doi:10.1186/ar2282

810 Li, C., Wang, T., Hu, L., Wei, Y., Liu, J., Mu, X., Nie, J., Yang, D., 2014. Photocrosslinkable
811 bioadhesive based on dextran and PEG derivatives. *Mater. Sci. Eng. C* 35, 300–306.
812 doi:10.1016/j.msec.2013.10.032

813 Li, C., Wu, X., Tong, J., Yang, X., Zhao, J., Zheng, Q., Zhao, G., Ma, Z., 2015. Comparative
814 analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under
815 xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 55. doi:10.1186/s13287-015-
816 0066-5

817 Li, X., Leo, B.M., Beck, G., Balian, G., Anderson, G.D., 2004. Collagen and proteoglycan
818 abnormalities in the GDF-5-deficient mice and molecular changes when treating disk cells
819 with recombinant growth factor. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 29, 2229–34.
820 doi:10.1097/01.brs.0000142427.82605.fb

821 Li, Z., Tan, B.H., 2015. Towards the development of polycaprolactone based amphiphilic block

822 copolymers: Molecular design, self-assembly and biomedical applications. Mater. Sci. Eng.
823 C 45, 620–634. doi:10.1016/j.msec.2014.06.003

824 Liang, C.Z., Li, H., Tao, Y.Q., Peng, L.H., Gao, J.Q., Wu, J.J., Li, F.C., Hua, J.M., Chen, Q.X.,
825 2013. Dual release of dexamethasone and TGF- β 3 from polymeric microspheres for stem
826 cell matrix accumulation in a rat disc degeneration model. Acta Biomater. 9, 9423–9433.
827 doi:10.1016/j.actbio.2013.08.019

828 Liu, S., Liang, H., Lee, S., Li, Z., Zhang, J., Fei, Q., 2016. Isolation and identification of stem
829 cells from degenerated human intervertebral discs and their migration characteristics. Acta
830 Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 49, 101–109. doi:10.1093/abbs/gmw121

831 Liu, Y., Ren, L., Wang, Y., 2013. Crosslinked collagen-gelatin-hyaluronic acid biomimetic film
832 for cornea tissue engineering applications. Mater. Sci. Eng. C 33, 196–201.
833 doi:10.1016/j.msec.2012.08.030

834 Liu, Z., Ma, C., Shen, J., Wang, D., Hao, J., Hu, Z., 2016. SDF-1/CXCR4 axis induces apoptosis
835 of human degenerative nucleus pulposus cells via the NF- κ B pathway. Mol. Med. Rep. 14,
836 783–789. doi:10.3892/mmr.2016.5341

837 Lotz, J.C., Fields, A.J., Liebenberg, E.C., 2013. The role of the vertebral end plate in low back
838 pain. Glob. spine J. 3, 153–64. doi:10.1055/s-0033-1347298

839 Luo, X.-W., Liu, K., Chen, Z., Zhao, M., Han, X.-W., Bai, Y.-G., Feng, G., 2016. Adenovirus-
840 mediated GDF-5 promotes the extracellular matrix expression in degenerative nucleus
841 pulposus cells. J. Zhejiang Univ. Sci. B 17, 30–42. doi:10.1631/jzus.B1500182

842 Luo, Z., Jin, L., Xu, L., Zhang, Z.L., Yu, J., Shi, S., Li, X., Chen, H., 2016. Thermosensitive
843 PEG–PCL–PEG (PECE) hydrogel as an *in situ* gelling system for ocular drug delivery of
844 diclofenac sodium. Drug Deliv. 23, 63–68. doi:10.3109/10717544.2014.903535

845 Maher, C., Underwood, M., Buchbinder, R., 2017. Non-specific low back pain. Lancet 389, 736–
846 47. doi:10.1016/S0140-6736(11)60610-7

847 Majzoub, R.N., Ewert, K.K., Safinya, C.R., 2016. Cationic liposome-nucleic acid nanoparticle
848 assemblies with applications in gene delivery and gene silencing. Philos. Trans. A. Math.
849 Phys. Eng. Sci. 374. doi:10.1098/rsta.2015.0129

850 Marfia, G., Campanella, R., Navone, S.E., Zucca, I., Scotti, A., Figini, M., Di Vito, C.,
851 Alessandri, G., Riboni, L., Parati, E., 2014. Potential use of human adipose mesenchymal
852 stromal cells for intervertebral disc regeneration: a preliminary study on biglycan-deficient
853 murine model of chronic disc degeneration. Arthritis Res. Ther. 16, 457.
854 doi:10.1186/s13075-014-0457-5

855 Maria, A.T.J., Toupet, K., Maumus, M., Fonteneau, G., Le Quellec, A., Jorgensen, C., Guilpain,
856 P., Noël, D., 2016. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy
857 for systemic sclerosis. J. Autoimmun. 70, 1–9. doi:10.1016/j.jaut.2016.03.013

858 Maroudas, A., Stockwell, R.A., Nachemson, A., Urban, J., 1975. Factors involved in the nutrition
859 of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. J. Anat.
860 120, 113–30.

861 Mathieu, E., Lamirault, G., Toquet, C., Lhommet, P., Rederstorff, E., Sourice, S., Biteau, K.,
862 Hulin, P., Forest, V., Weiss, P., Guicheux, J., Lemarchand, P., 2012. Intramyocardial
863 Delivery of Mesenchymal Stem Cell-Seeded Hydrogel Preserves Cardiac Function and

864 Attenuates Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. PLoS One 7, e51991.
865 doi:10.1371/journal.pone.0051991

866 Meisel, H.J., Siodla, V., Ganey, T., Minkus, Y., Hutton, W.C., Alasevic, O.J., 2007. Clinical
867 experience in cell-based therapeutics: Disc chondrocyte transplantation. A treatment for
868 degenerated or damaged intervertebral disc. Biomol. Eng. 24, 5–21.
869 doi:10.1016/j.bioeng.2006.07.002

870 Miller, D.G., Adam, M.A., Miller, A.D., 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in
871 cells that are actively replicating at the time of infection. Mol. Cell. Biol. 10, 4239–42.
872 doi:10.1128/MCB.10.8.4239.Updated

873 Mintzer, M.A., Simanek, E.E., 2009. Nonviral vectors for gene delivery. Chem. Rev. 109, 259–
874 302. doi:10.1021/cr800409e

875 Mitragotri, S., Burke, P. a., Langer, R., 2014. Overcoming the challenges in administering
876 biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. Nat. Rev. Drug Discov. 13, 655–
877 672. doi:10.1038/nrd4363

878 Miyamoto, T., Muneta, T., Tabuchi, T., Matsumoto, K., Saito, H., Tsuji, K., Sekiya, I., 2010.
879 Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc
880 degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus
881 pulposus cells in rabbits. Arthritis Res. Ther. 12, R206. doi:10.1186/ar3182

882 Molinos, M., Almeida, C.R., Caldeira, J., Cunha, C., Goncalves, R.M., Barbosa, M.A., 2015.
883 Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration. J R Soc Interface 12,
884 20141191. doi:10.1098/rsif.2014.1191

885 Moritz, M., Geszke-Moritz, M., 2015. Mesoporous materials as multifunctional tools in
886 biosciences: Principles and applications. Mater. Sci. Eng. C 49, 114–151.
887 doi:10.1016/j.msec.2014.12.079

888 Naves, L., Dhand, C., Almeida, L., Rajamani, L., Ramakrishna, S., Soares, G., 2017. Poly(lactic-
889 co-glycolic) acid drug delivery systems through transdermal pathway: an overview. Prog.
890 Biomater. 6, 1–11. doi:10.1007/s40204-017-0063-0

891 Nettles, D.L., Chilkoti, A., Setton, L.A., 2010. Applications of Elastin-like Polypeptides in Tissue
892 Engineering. Adv. Drug Deliv. Rev. 62, 1479–1485.
893 doi:10.1016/j.addr.2010.04.002.Applications

894 Nishida, K., Kang, J.D., Gilbertson, L.G., Moon, S., Suh, J., Vogt, M.T., Robbins, P.D., Evans,
895 C.H., 1999. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene
896 therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming
897 growth factor beta 1 encoding gene. Spine (Phila. Pa. 1976). 24, 2419–2425.

898 Orita, S., Eguchi, Y., Kamoda, H., Arai, G., Ishikawa, T., Miyagi, M., Inoue, G., Suzuki, M.,
899 Toyone, T., Aoki, Y., Takahashi, K., Ohtori, S., 2011. Brain-Derived Neurotrophic Factor
900 Inhibition at the Punctured Intervertebral Disc Downregulates the Production of Calcitonin
901 Gene-Related Peptide in Dorsal Root Ganglia in Rats. Spine (Phila. Pa. 1976). 36, 1737–
902 1743. doi:10.1097/BRS.0b013e31821d7b9f

903 Orita, S., Miyagi, M., Kobori, S., Gemba, T., Ishikawa, T., Inoue, G., Toyone, T., Aoki, Y.,
904 Eguchi, Y., Takahashi, K., Ohtori, S., 2013. IκB kinase b inhibitor downregulates pain-
905 related neuropeptide production in the sensory neurons innervating injured lumbar

906 intervertebral discs in the dorsal root ganglia of rats. *Spine J.* 13, 284–288.
 907 doi:10.1016/j.spinee.2013.01.020

908 Orozco, L., Soler, R., Morera, C., Alberca, M., Sanchez, A., Garcia-Sancho, J., 2011.
 909 Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study.
 910 *Transplantation* 92, 822–828. doi:10.1097/TP.0b013e3182298a15

911 Pattappa, G., Peroglio, M., Sakai, D., Mochida, J., Benneker, L.M., Alini, M., Grad, S., Science,
 912 S., 2014. Ccl5 / Rantes Is a Key Chemoattractant Released By Degenerative Intervertebral
 913 Discs in Organ Culture. *Eur Cell Mater* 1, 124–136. doi:10.22203/eCM.v027a10

914 Pereira, C.L., Gonçalves, R.M., Peroglio, M., Pattappa, G., D’Este, M., Eglin, D., Barbosa, M. a,
 915 Alini, M., Grad, S., 2014. The effect of hyaluronan-based delivery of stromal cell-derived
 916 factor-1 on the recruitment of MSCs in degenerating intervertebral discs. *Biomaterials* 35,
 917 8144–53. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.06.017

918 Phromsopha, T., Baimark, Y., 2014. Preparation of starch/gelatin blend microparticles by a
 919 water-in-oil emulsion method for controlled release drug delivery. *Int. J. Biomater.* 2014, 1–
 920 6. doi:10.1155/2014/829490

921 Purcell, B.P., Elser, J.A., Mu, A., Margulies, K.B., Burdick, J.A., 2012. Synergistic effects of
 922 SDF-1 α chemokine and hyaluronic acid release from degradable hydrogels on directing bone
 923 marrow derived cell homing to the myocardium. *Biomaterials* 33, 7849–7857.
 924 doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.005

925 Qiu, Y., Park, K., 2012. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv.*
 926 *Rev.* 64, 49–60. doi:10.1016/j.addr.2012.09.024

927 Raj, P.P., 2008. Intervertebral disc: Anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract.*
 928 8, 18–44. doi:10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x

929 Rezaee, M., Oskuee, R.K., Nassirli, H., Malaekheh-Nikouei, B., 2016. Progress in the
 930 development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. *J. Control.*
 931 *Release* 236, 1–14. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.023

932 Richardson, S.M., Kalamegam, G., Pushparaj, P.N., Matta, C., Memic, A., Khademhosseini, A.,
 933 Mobasheri, R., Poletti, F.L., Hoyland, J.A., Mobasheri, A., 2016. Mesenchymal stem cells in
 934 regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration.
 935 *Methods* 99, 69–80. doi:10.1016/j.ymeth.2015.09.015

936 Risbud, M. V, Guttapalli, A., Tsai, T.-T., Lee, J.Y., Danielson, K.G., Vaccaro, A.R., Albert, T.J.,
 937 Gazit, Z., Gazit, D., Shapiro, I.M., 2007. Evidence for skeletal progenitor cells in the
 938 degenerate human intervertebral disc. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 32, 2537–2544.
 939 doi:10.1097/BRS.0b013e318158dea6

940 Roughley, P., Hoemann, C., DesRosiers, E., Mwale, F., Antoniou, J., Alini, M., 2006. The
 941 potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus
 942 supplementation. *Biomaterials* 27, 388–396. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.06.037

943 Roughley, P.J., 2004. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the
 944 extracellular matrix. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 29, 2691–2699.
 945 doi:10.1097/01.brs.0000146101.53784.b1

946 Russo, F., Hartman, R.A., Bell, K.M., Vo, N., Sowa, G.A., Kang, J.D., Vadala, G., Denaro, V.,
 947 2016. Biomechanical Evaluation of Transpedicular Nucleotomy with Intact Annulus

948 Fibrosus. Spine (Phila Pa 1976) 42, E193–E201. doi:10.1097/BRS.0000000000001762

949 Sainoh, T., Orita, S., Miyagi, M., Inoue, G., Yamauchi, K., Suzuki, M., Sakuma, Y., Kubota, G.,
950 Oikawa, Y., Inage, K., Sato, J., Nakata, Y., Aoki, Y., Takahashi, K., Ohtori, S., 2016. Single
951 intradiscal injection of the interleukin-6 receptor antibody tocilizumab provides short-term
952 relief of discogenic low back pain; prospective comparative cohort study. J. Orthop. Sci. 21,
953 2–6. doi:10.1016/j.jos.2015.10.005

954 Sakai, D., Andersson, G.B.J., 2015. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration:
955 obstacles and solutions. Nat. Rev. Rheumatol. 11, 243–256. doi:10.1038/nrrheum.2015.13

956 Sakai, D., Grad, S., 2015. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc
957 disease. Adv. Drug Deliv. Rev. 84, 159–171. doi:10.1016/j.addr.2014.06.009

958 Sawamura, K., Ikeda, T., Nagae, M., Okamoto, S., Mikami, Y., Hase, H., Ikoma, K., Yamada, T.,
959 Sakamoto, H., Matsuda, K., Tabata, Y., Kawata, M., Kubo, T., 2009. Characterization of in
960 vivo effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres on
961 degenerated intervertebral discs. Tissue Eng. Part A 15, 3719–3727.
962 doi:10.1089/ten.TEA.2008.0697

963 Seelbach, R.J., Fransen, P., Pulido, D., D’Este, M., Duttonhoefer, F., Sauerbier, S., Freiman,
964 T.M., Niemeyer, P., Albericio, F., Alini, M., Royo, M., Mata, A., Eglin, D., 2015. Injectable
965 Hyaluronan Hydrogels with Peptide-Binding Dendrimers Modulate the Controlled Release
966 of BMP-2 and TGF- β 1. Macromol. Biosci. 15, 1035–1044. doi:10.1002/mabi.201500082

967 Shabbir, A., Zisa, D., Suzuki, G., Lee, T., 2009. Heart failure therapy mediated by the trophic
968 activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. AJP
969 Hear. Circ. Physiol. 296, H1888–H1897. doi:10.1152/ajpheart.00186.2009

970 Sionkowska, A., 2011. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new
971 biomaterials: Review. Prog. Polym. Sci. 36, 1254–1276.
972 doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003

973 Sionkowska, A., Kaczmarek, B., Lewandowska, K., Grabska, S., Pokrywczynska, M.,
974 Kloskowski, T., Drewna, T., 2016. 3D composites based on the blends of chitosan and
975 collagen with the addition of hyaluronic acid. Int. J. Biol. Macromol. 89, 442–448.
976 doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.085

977 Sun, B., Taing, A., Liu, H., Nie, G., Wang, J., Fang, Y., Liu, L., Xue, Y., Shi, J., Liao, Y.-P., Ku,
978 J., Xia, T., Liu, Y., 2016. Nerve Growth Factor-Conjugated Mesoporous Silica
979 Nanoparticles Promote Neuron-Like PC12 Cell Proliferation and Neurite Growth. J.
980 Nanosci. Nanotechnol. 16, 2390–3.

981 Sun, T., Zhang, Y.S., Pang, B., Hyun, D.C., Yang, M., Xia, Y., 2014. Engineered nanoparticles
982 for drug delivery in cancer therapy. Angew. Chemie - Int. Ed. 53, 12320–12364.
983 doi:10.1002/anie.201403036

984 Teixeira, G.Q., Leite Pereira, C., Castro, F., Ferreira, J.R., Gomez-Lazaro, M., Aguiar, P.,
985 Barbosa, M.A., Neidlinger-Wilke, C., Goncalves, R.M., 2016. Anti-inflammatory
986 Chitosan/Poly-gamma-glutamic acid nanoparticles control inflammation while remodeling
987 extracellular matrix in degenerated intervertebral disc. Acta Biomater. 42, 168–179.
988 doi:10.1016/j.actbio.2016.06.013

989 Tran, C.M., Markova, D., Smith, H.E., Susarla, B., Ponnappan, R.K., Anderson, D.G., Symes, A.,

990 Shapiro, I.M., Risbud, M. V., 2010. Regulation of CCN2/connective tissue growth factor
 991 expression in the nucleus pulposus of the intervertebral disc: Role of smad and activator
 992 protein 1 signaling. *Arthritis Rheum.* 62, 1983–1992. doi:10.1002/art.27445

993 Tran, C.M., Schoepflin, Z.R., Markova, D.Z., Kepler, C.K., Anderson, D.G., Shapiro, I.M.,
 994 Risbud, M. V., 2014. CCN2 Suppresses Catabolic Effects of Interleukin-1 β through α 5 β 1
 995 and α V β 3 Integrins in Nucleus Pulposus Cells. *J. Biol. Chem.* 289, 7374–7387.
 996 doi:10.1074/jbc.M113.526111

997 Tran, V.T., Karam, J.P., Garric, X., Coudane, J., Benoit, J.P., Montero-Menei, C.N., Venier-
 998 Julienne, M.C., 2012. Protein-loaded PLGA-PEG-PLGA microspheres: a tool for cell
 999 therapy. *Eur J Pharm Sci* 45, 128–137. doi:10.1016/j.ejps.2011.10.030

1000 Tuakli-Wosornu, Y.A., Terry, A., Boachie-Adjei, K., Harrison, J.R., Gribbin, C.K., LaSalle, E.E.,
 1001 Nguyen, J.T., Solomon, J.L., Lutz, G.E., 2016. Lumbar Intradiskal Platelet-Rich Plasma
 1002 (PRP) Injections: A Prospective, Double-Blind, Randomized Controlled Study. *PM R* 8, 1–
 1003 10. doi:10.1016/j.pmrj.2015.08.010

1004 Vallet-Regi, M., Balas, F., 2008. Silica materials for medical applications. *Open Biomed Eng J* 2,
 1005 1–9. doi:10.2174/1874120700802010001

1006 van Rijt, S., Habibovic, P., 2017. Enhancing regenerative approaches with nanoparticles. *J. R.*
 1007 *Soc. Interface* 14. doi:10.1098/rsif.2017.0093

1008 Vasiliadis, E., Pneumaticos, S., 2014. Biologic treatment of mild and moderate intervertebral disc
 1009 degeneration. *Mol. Med.* 20, 1. doi:10.2119/molmed.2014.00145

1010 Vinatier, C., Gauthier, O., Fatimi, A., Merceron, C., Masson, M., Moreau, A., Moreau, F., Fellah,
 1011 B., Weiss, P., Guicheux, J., 2009. An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of
 1012 autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1259–
 1013 1267. doi:10.1002/bit.22137

1014 Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R.M., Bhutta, Z.A., Brown, A., Carter, A., Casey, D.C.,
 1015 Charlson, F.J., Chen, A.Z., Coggeshall, M., Cornaby, L., Dandona, L., Dicker, D.J., Dilegge,
 1016 T., Erskine, H.E., Ferrari, A.J., Fitzmaurice, C., Fleming, T., Forouzanfar, M.H., Fullman,
 1017 N., Gething, P.W., Goldberg, E.M., Graetz, N., Haagsma, J.A., Hay, S.I., Johnson, C.O.,
 1018 Kassebaum, N.J., Kawashima, T., Kemmer, L., Khalil, I.A., Kinfu, Y., Kyu, H.H., Leung, J.,
 1019 Liang, X., Lim, S.S., Lopez, A.D., Lozano, R., Marczak, L., Mensah, G.A., Mokdad, A.H.,
 1020 Naghavi, M., Nguyen, G., Nsoesie, E., Olsen, H., Pigott, D.M., Pinho, C., Rankin, Z.,
 1021 Reinig, N., Salomon, J.A., Sandar, L., Smith, A., Stanaway, J., Steiner, C., Teeple, S.,
 1022 Thomas, B.A., Troeger, C., Wagner, J.A., Wang, H., Wanga, V., Whiteford, H.A., Zoeckler,
 1023 L., Abajobir, A.A., Abate, K.H., Abbafati, C., Abbas, K.M., Abd-Allah, F., Abraham, B.,
 1024 Abubakar, I., Abu-Raddad, L.J., Abu-Rmeileh, N.M.E., Ackerman, I.N., Adebisi, A.O.,
 1025 Ademi, Z., Adou, A.K., Afanvi, K.A., Agardh, E.E., Agarwal, A., Kiadaliri, A.A.,
 1026 Ahmadieh, H., Ajala, O.N., Akinyemi, R.O., Akseer, N., Al-Aly, Z., Alam, K., Alam,
 1027 N.K.M., Aldhahri, S.F., Alegretti, M.A., Alemu, Z.A., Alexander, L.T., Alhabib, S., Ali, R.,
 1028 Alkerwi, A., Alla, F., Allebeck, P., Al-Raddadi, R., Alsharif, U., Altirkawi, K.A., Alvis-
 1029 Guzman, N., Amare, A.T., Amberbir, A., Amini, H., Ammar, W., Amrock, S.M., Andersen,
 1030 H.H., Anderson, G.M., Anderson, B.O., Antonio, C.A.T., Aregay, A.F., Ärnlöv, J.,
 1031 Artaman, A., Asayesh, H., Assadi, R., Atique, S., Avokpaho, E.F.G.A., Awasthi, A.,
 1032 Quintanilla, B.P.A., Azzopardi, P., Bacha, U., Badawi, A., Balakrishnan, K., Banerjee, A.,
 1033 Barac, A., Barker-Collo, S.L., Bärnighausen, T., Barregard, L., Barrero, L.H., Basu, A.,

1034 Bazargan-Hejazi, S., Beghi, E., Bell, B., Bell, M.L., Bennett, D.A., Bensenor, I.M., Benzian,
 1035 H., Berhane, A., Bernabé, E., Betsu, B.D., Beyene, A.S., Bhala, N., Bhatt, S., Biadgilign, S.,
 1036 Bienhoff, K., Bikbov, B., Biryukov, S., Bisanzio, D., Bjertness, E., Blore, J., Borschmann,
 1037 R., Boufous, S., Brainin, M., Brazinova, A., Breitborde, N.J.K., Brown, J., Buchbinder, R.,
 1038 Buckle, G.C., Butt, Z.A., Calabria, B., Campos-Nonato, I.R., Campuzano, J.C., Carabin, H.,
 1039 Cárdenas, R., Carpenter, D.O., Carrero, J.J., Castañeda-Orjuela, C.A., Rivas, J.C., Catalá-
 1040 López, F., Chang, J.-C., Chiang, P.P.-C., Chibueze, C.E., Chisumpa, V.H., Choi, J.-Y.J.,
 1041 Chowdhury, R., Christensen, H., Christopher, D.J., Ciobanu, L.G., Cirillo, M., Coates,
 1042 M.M., Colquhoun, S.M., Cooper, C., Cortinovis, M., Crump, J.A., Damtew, S.A., Dandona,
 1043 R., Daoud, F., Dargan, P.I., das Neves, J., Davey, G., Davis, A.C., Leo, D. De, Degenhardt,
 1044 L., Gobbo, L.C. Del, Dellavalle, R.P., Deribe, K., Deribew, A., Derrett, S., Jarlais, D.C. Des,
 1045 Dharmaratne, S.D., Dhillon, P.K., Diaz-Torné, C., Ding, E.L., Driscoll, T.R., Duan, L.,
 1046 Dubey, M., Duncan, B.B., Ebrahimi, H., Ellenbogen, R.G., Elyazar, I., Endres, M., Endries,
 1047 A.Y., Ermakov, S.P., Eshрати, B., Estep, K., Farid, T.A., Farinha, C.S. e S., Faro, A., Farvid,
 1048 M.S., Farzadfar, F., Feigin, V.L., Felson, D.T., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, J.G.,
 1049 Fernandes, J.C., Fischer, F., Fitchett, J.R.A., Foreman, K., Fowkes, F.G.R., Fox, J., Franklin,
 1050 R.C., Friedman, J., Frostad, J., Fürst, T., Futran, N.D., Gabbe, B., Ganguly, P., Gankpé,
 1051 F.G., Gebre, T., Gebrehiwot, T.T., Gebremedhin, A.T., Geleijnse, J.M., Gessner, B.D.,
 1052 Gibney, K.B., Ginawi, I.A.M., Giref, A.Z., Giroud, M., Gishu, M.D., Giussani, G., Glaser,
 1053 E., Godwin, W.W., Gomez-Dantes, H., Gona, P., Goodridge, A., Gopalani, S.V., Gotay,
 1054 C.C., Goto, A., Gouda, H.N., Grainger, R., Greaves, F., Guillemin, F., Guo, Y., Gupta, R.,
 1055 Gupta, R., Gupta, V., Gutiérrez, R.A., Haile, D., Hailu, A.D., Hailu, G.B., Halasa, Y.A.,
 1056 Hamadeh, R.R., Hamidi, S., Hammami, M., Hancock, J., Handal, A.J., Hankey, G.J., Hao,
 1057 Y., Harb, H.L., Harikrishnan, S., Haro, J.M., Havmoeller, R., Hay, R.J., Heredia-Pi, I.B.,
 1058 Heydarpour, P., Hoek, H.W., Horino, M., Horita, N., Hosgood, H.D., Hoy, D.G., Htet, A.S.,
 1059 Huang, H., Huang, J.J., Huynh, C., Iannarone, M., Iburg, K.M., Innos, K., Inoue, M., Iyer,
 1060 V.J., Jacobsen, K.H., Jahanmehr, N., Jakovljevic, M.B., Javanbakht, M., Jayaraman, S.P.,
 1061 Jayatilleke, A.U., Jee, S.H., Jeemon, P., Jensen, P.N., Jiang, Y., Jibat, T., Jimenez-Corona,
 1062 A., Jin, Y., Jonas, J.B., Kabir, Z., Kalkonde, Y., Kamal, R., Kan, H., Karch, A., Karema,
 1063 C.K., Karimkhani, C., Kasaeian, A., Kaul, A., Kawakami, N., Keiyoro, P.N., Kemp, A.H.,
 1064 Keren, A., Kesavachandran, C.N., Khader, Y.S., Khan, A.R., Khan, E.A., Khang, Y.-H.,
 1065 Khera, S., Khoja, T.A.M., Khubchandani, J., Kieling, C., Kim, P., Kim, C., Kim, D., Kim,
 1066 Y.J., Kisson, N., Knibbs, L.D., Knudsen, A.K., Kokubo, Y., Kolte, D., Kopec, J.A., Kosen,
 1067 S., Kotsakis, G.A., Koul, P.A., Koyanagi, A., Kravchenko, M., Defo, B.K., Bicer, B.K.,
 1068 Kudom, A.A., Kuipers, E.J., Kumar, G.A., Kutz, M., Kwan, G.F., Lal, A., Lalloo, R.,
 1069 Lallukka, T., Lam, H., Lam, J.O., Langan, S.M., Larsson, A., Lavados, P.M., Leasher, J.L.,
 1070 Leigh, J., Leung, R., Levi, M., Li, Y., Li, Y., Liang, J., Liu, S., Liu, Y., Lloyd, B.K., Lo,
 1071 W.D., Logroscino, G., Looker, K.J., Lotufo, P.A., Lunevicius, R., Lyons, R.A., Mackay,
 1072 M.T., Magdy, M., Razek, A. El, Mahdavi, M., Majdan, M., Majeed, A., Malekzadeh, R.,
 1073 Marcenes, W., Margolis, D.J., Martinez-Raga, J., Masiye, F., Massano, J., McGarvey, S.T.,
 1074 McGrath, J.J., McKee, M., McMahon, B.J., Meaney, P.A., Mehari, A., Mejia-Rodriguez, F.,
 1075 Mekonnen, A.B., Melaku, Y.A., Memiah, P., Memish, Z.A., Mendoza, W., Meretoja, A.,
 1076 Meretoja, T.J., Mhimbira, F.A., Millel, A., Miller, T.R., Mills, E.J., Mirarefin, M.,
 1077 Mitchell, P.B., Mock, C.N., Mohammadi, A., Mohammed, S., Monasta, L., Hernandez,
 1078 J.C.M., Montico, M., Mooney, M.D., Moradi-Lakeh, M., Morawska, L., Mueller, U.O.,
 1079 Mullany, E., Mumford, J.E., Murdoch, M.E., Nachega, J.B., Nagel, G., Naheed, A., Naldi,
 1080 L., Nangia, V., Newton, J.N., Ng, M., Ngalesoni, F.N., Nguyen, Q. Le, Nisar, M.I., Pete,

1081 P.M.N., Nolla, J.M., Norheim, O.F., Norman, R.E., Norrving, B., Nunes, B.P., Ogbo, F.A.,
 1082 Oh, I.-H., Ohkubo, T., Olivares, P.R., Olusanya, B.O., Olusanya, J.O., Ortiz, A., Osman, M.,
 1083 Ota, E., PA, M., Park, E.-K., Parsaeian, M., de Azeredo Passos, V.M., Caicedo, A.J.P.,
 1084 Patten, S.B., Patton, G.C., Pereira, D.M., Perez-Padilla, R., Perico, N., Pesudovs, K.,
 1085 Petzold, M., Phillips, M.R., Piel, F.B., Pillay, J.D., Pishgar, F., Plass, D., Platts-Mills, J.A.,
 1086 Polinder, S., Pond, C.D., Popova, S., Poulton, R.G., Pourmalek, F., Prabhakaran, D., Prasad,
 1087 N.M., Qorbani, M., Rabiee, R.H.S., Radfar, A., Rafay, A., Rahimi, K., Rahimi-Movaghar,
 1088 V., Rahman, M., Rahman, M.H.U., Rahman, S.U., Rai, R.K., Rajsic, S., Ram, U., Rao, P.,
 1089 Refaat, A.H., Reitsma, M.B., Remuzzi, G., Resnikoff, S., Reynolds, A., Ribeiro, A.L.,
 1090 Blancas, M.J.R., Roba, H.S., Rojas-Rueda, D., Ronfani, L., Roshandel, G., Roth, G.A.,
 1091 Rothenbacher, D., Roy, A., Sagar, R., Sahathevan, R., Sanabria, J.R., Sanchez-Niño, M.D.,
 1092 Santos, I.S., Santos, J.V., Sarmiento-Suarez, R., Sartorius, B., Satpathy, M., Savic, M.,
 1093 Sawhney, M., Schaub, M.P., Schmidt, M.I., Schneider, I.J.C., Schöttker, B., Schwebel, D.C.,
 1094 Scott, J.G., Seedat, S., Sepanlou, S.G., Servan-Mori, E.E., Shackelford, K.A., Shaheen, A.,
 1095 Shaikh, M.A., Sharma, R., Sharma, U., Shen, J., Shepard, D.S., Sheth, K.N., Shibuya, K.,
 1096 Shin, M.-J., Shiri, R., Shiue, I., Shrim, M.G., Sigfusdottir, I.D., Silva, D.A.S., Silveira,
 1097 D.G.A., Singh, A., Singh, J.A., Singh, O.P., Singh, P.K., Sivonda, A., Skirbekk, V., Skogen,
 1098 J.C., Sligar, A., Sliwa, K., Soljak, M., Søreide, K., Sorensen, R.J.D., Soriano, J.B., Sposato,
 1099 L.A., Sreeramareddy, C.T., Stathopoulou, V., Steel, N., Stein, D.J., Steiner, T.J., Steinke, S.,
 1100 Stovner, L., Stroumpoulis, K., Sunguya, B.F., Sur, P., Swaminathan, S., Sykes, B.L.,
 1101 Szoëke, C.E.I., Tabarés-Seisdedos, R., Takala, J.S., Tandon, N., Tanne, D., Tavakkoli, M.,
 1102 Taye, B., Taylor, H.R., Ao, B.J. Te, Tedla, B.A., Terkawi, A.S., Thomson, A.J., Thorne-
 1103 Lyman, A.L., Thrift, A.G., Thurston, G.D., Tobe-Gai, R., Tonelli, M., Topor-Madry, R.,
 1104 Topouzis, F., Tran, B.X., Truelsen, T., Dimbuene, Z.T., Tsilimbaris, M., Tura, A.K., Tuzcu,
 1105 E.M., Tyrovolas, S., Ukwaja, K.N., Undurraga, E.A., Uneke, C.J., Uthman, O.A., van Gool,
 1106 C.H., Varakin, Y.Y., Vasankari, T., Venketasubramanian, N., Verma, R.K., Violante, F.S.,
 1107 Vladimirov, S.K., Vlassov, V.V., Vollset, S.E., Wagner, G.R., Waller, S.G., Wang, L.,
 1108 Watkins, D.A., Weichenthal, S., Weiderpass, E., Weintraub, R.G., Werdecker, A.,
 1109 Westerman, R., White, R.A., Williams, H.C., Wiysonge, C.S., Wolfe, C.D.A., Won, S.,
 1110 Woodbrook, R., Wubshet, M., Xavier, D., Xu, G., Yadav, A.K., Yan, L.L., Yano, Y.,
 1111 Yaseri, M., Ye, P., Yebyo, H.G., Yip, P., Yonemoto, N., Yoon, S.-J., Younis, M.Z., Yu, C.,
 1112 Zaidi, Z., Zaki, M.E.S., Zeeb, H., Zhou, M., Zodpey, S., Zuhlke, L.J., Murray, C.J.L., 2016.
 1113 Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310
 1114 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease
 1115 Study 2015. *Lancet* 388, 1545–1602. doi:10.1016/S0140-6736(16)31678-6
 1116 Wallach, C.J., Sobajima, S., Watanabe, Y., Kim, J.S., Georgescu, H.I., Robbins, P., Gilbertson,
 1117 L.G., Kang, J.D., 2003. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured
 1118 proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs. *Spine (Phila. Pa. 1976)*.
 1119 28, 2331–2337. doi:10.1097/01.BRS.0000085303.67942.94
 1120 Walter, B. a, Purmessur, D., Likhitanichkul, M., Weinberg, A., Cho, S.K., Qureshi, S. a., Hecht,
 1121 A.C., Iatridis, J.C., 2015. Inflammatory Kinetics and Efficacy of Anti-inflammatory
 1122 Treatments on Human Nucleus Pulposus Cells. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 40, 1.
 1123 doi:10.1097/BRS.0000000000000932
 1124 Wan, S., Borland, S., Richardson, S.M., Merry, C.L.R., Saiani, A., Gough, J.E., 2016. Self-
 1125 assembling peptide hydrogel for intervertebral disc tissue engineering. *Acta Biomater.* 46,
 1126 29–40. doi:10.1016/j.actbio.2016.09.033

1127 Wang, S., Chang, Q., Lu, J., Wang, C., 2015. Growth factors and platelet-rich plasma: promising
 1128 biological strategies for early intervertebral disc degeneration. *Int. Orthop.* 39, 927–934.
 1129 doi:10.1007/s00264-014-2664-8

1130 Wang, W.-J., Yu, X.-H., Wang, C., Yang, W., He, W.-S., Zhang, S.-J., Yan, Y.-G., Zhang, J.,
 1131 2015. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin. Chim. Acta.* 448.
 1132 doi:10.1016/j.cca.2015.06.023

1133 Wei, X.W., Gong, C.Y., Gou, M.L., Fu, S.Z., Guo, Q.F., Shi, S., Luo, F., Guo, G., Qiu, L.Y.,
 1134 Qian, Z.Y., 2009. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as
 1135 drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 381, 1–18. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.033

1136 Wenk, E., Meinel, A.J., Wildy, S., Merkle, H.P., Meinel, L., 2009. Microporous silk fibroin
 1137 scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue
 1138 engineering. *Biomaterials* 30, 2571–2581. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.073

1139 Whatley, B.R., Wen, X., 2012. Intervertebral disc (IVD) : Structure, degeneration, repair and
 1140 regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* 32, 61–77. doi:10.1016/j.msec.2011.10.011

1141 Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., Car, H., 2012. Nanoparticles as drug
 1142 delivery systems. *Pharmacol Rep* 64, 1020–1037.

1143 Willems, N., Yang, H.-Y., Langelaan, M.L.P., Tellegen, A.R., Grinwis, G.C.M., Kranenburg, H.-
 1144 J.C., Riemers, F.M., Plomp, S.G.M., Craenmehr, E.G.M., Dhert, W.J.A., Papen-Botterhuis,
 1145 N.E., Meij, B.P., Creemers, L.B., Tryfonidou, M.A., 2015. Biocompatibility and intradiscal
 1146 application of a thermoreversible celecoxib-loaded poly-N-isopropylacrylamide MgFe-
 1147 layered double hydroxide hydrogel in a canine model. *Arthritis Res. Ther.* 17, 214.
 1148 doi:10.1186/s13075-015-0727-x

1149 Wismer, N., Grad, S., Fortunato, G., Ferguson, S.J., Alini, M., Eglin, D., 2014. Biodegradable
 1150 electrospun scaffolds for annulus fibrosus tissue engineering: effect of scaffold structure and
 1151 composition on annulus fibrosus cells in vitro. *Tissue Eng. Part A* 20, 672–82.
 1152 doi:10.1089/ten.TEA.2012.0679

1153 Wu, J., Guan, T., Zheng, S., Grosjean, F., Liu, W., Xiong, H., Gordon, R., Vlassara, H., Striker,
 1154 G.E., Zheng, F., 2011. Inhibition of inflammation by pentosan polysulfate impedes the
 1155 development and progression of severe diabetic nephropathy in aging C57B6 mice. *Lab.*
 1156 *Investig.* 91, 1459–1471. doi:10.1038/labinvest.2011.93

1157 Yan, J., Yang, S., Sun, H., Guo, D., Wu, B., Ji, F., Zhou, D., 2013. Effects of releasing
 1158 recombinant human growth and differentiation factor-5 from poly(lactic-co-glycolic acid)
 1159 microspheres for repair of the rat degenerated intervertebral disc. *J. Biomater. Appl.* 29, 72–
 1160 80. doi:10.1177/0885328213515034

1161 Yang, H., Gao, F., Li, X., Wang, J., Liu, H., Zheng, Z., 2015. TGF- β 1 antagonizes TNF- α
 1162 induced up-regulation of matrix metalloproteinase 3 in nucleus pulposus cells: role of the
 1163 ERK1/2 pathway. *Connect. Tissue Res.* 8207, 1–8. doi:10.3109/03008207.2015.1054030

1164 Yang, Y., Yu, C., 2016. Advances in silica based nanoparticles for targeted cancer therapy.
 1165 *Nanomedicine* 12, 317–32. doi:10.1016/j.nano.2015.10.018

1166 Zeng, Y., Kurokawa, Y., Win-Shwe, T.-T., Zeng, Q., Hirano, S., Zhang, Z., Sone, H., 2016.
 1167 Effects of PAMAM dendrimers with various surface functional groups and multiple
 1168 generations on cytotoxicity and neuronal differentiation using human neural progenitor

1169 cells. *J. Toxicol. Sci.* 41, 351–70. doi:10.2131/jts.41.351

1170 Zhang, H., Zhang, L., Chen, L., Li, W., Li, F., Chen, Q., 2014. Stromal cell-derived factor-1 and
 1171 its receptor CXCR4 are upregulated expression in degenerated intervertebral discs. *Int. J.*
 1172 *Med. Sci.* 11, 240–245. doi:10.7150/ijms.7489

1173 Zhao, Y., Fan, X., Liu, D., Wang, Z., 2011. PEGylated thermo-sensitive poly(amidoamine)
 1174 dendritic drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 409, 229–236.
 1175 doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.005

1176 Zhongyi, S., Sai, Z., Chao, L., Jiwei, T., 2015. Effects of nuclear factor kappa B signaling
 1177 pathway in human intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 40, 224–32.
 1178 doi:10.1097/BRS.0000000000000733

1179 Zhou, X., Chen, L., Grad, S., Alini, M., Pan, H., Yang, D., Zhen, W., Li, Z., Huang, S., Peng, S.,
 1180 2017. The roles and perspectives of microRNAs as biomarkers for intervertebral disc
 1181 degeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* Ahead of print. doi:10.1002/term

1182 Zhou, Z., Gao, M., Wei, F., Liang, J., Deng, W., Dai, X., Zhou, G., Zou, X., 2014. Shock
 1183 absorbing function study on denucleated intervertebral disc with or without hydrogel
 1184 injection through static and dynamic biomechanical tests in vitro. *Biomed Res. Int.* 2014,
 1185 461724. doi:10.1155/2014/461724

1186

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

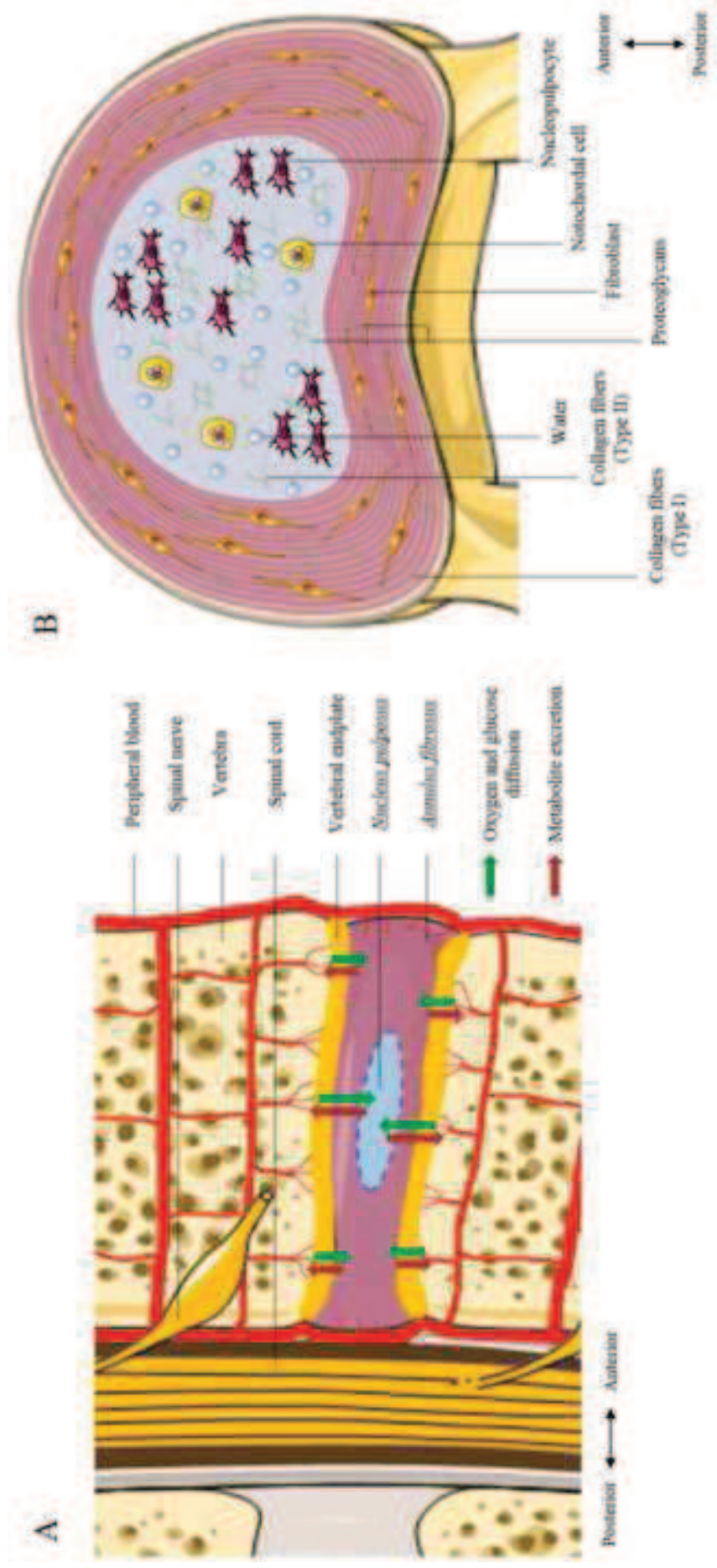


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

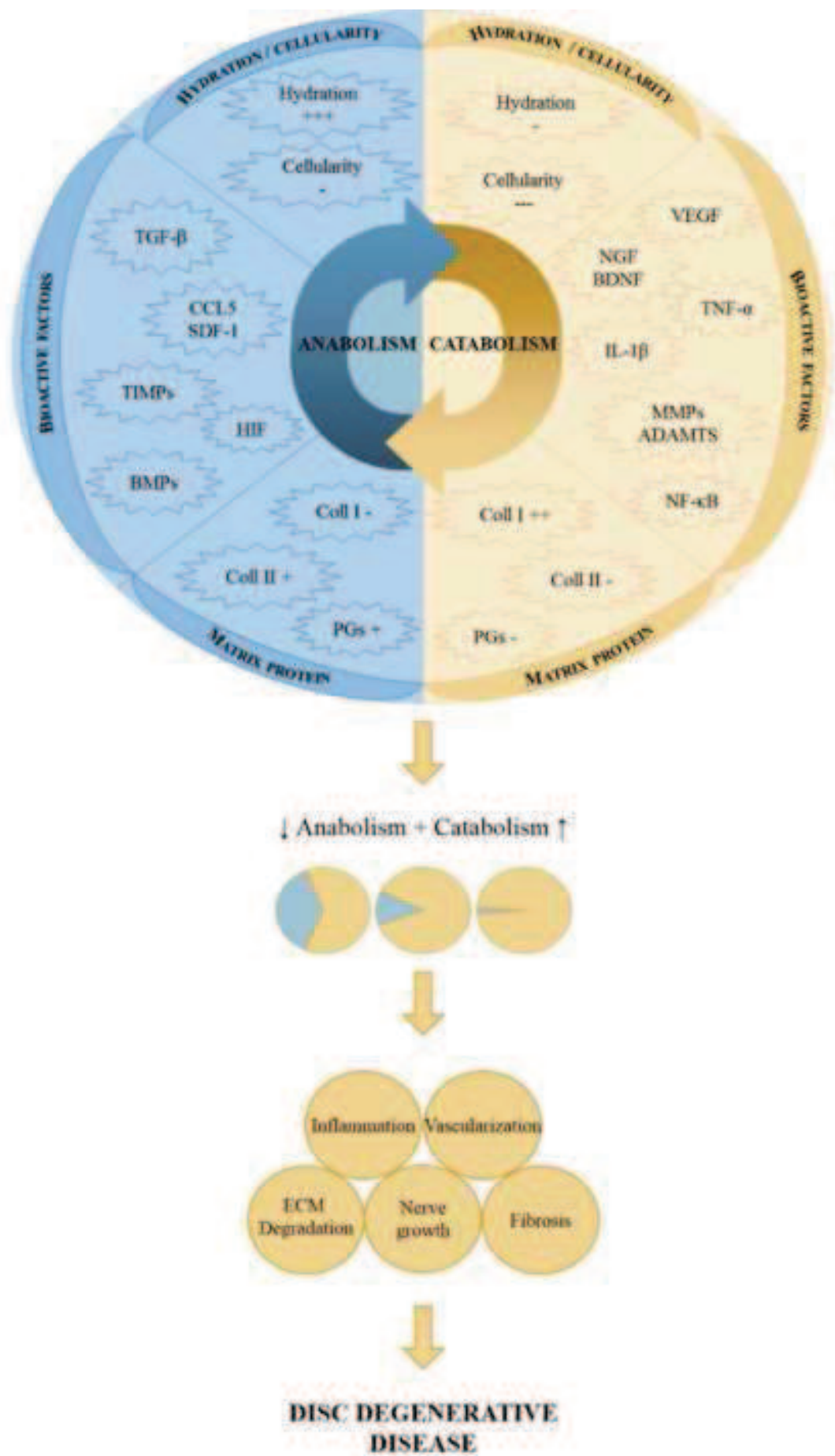


Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)

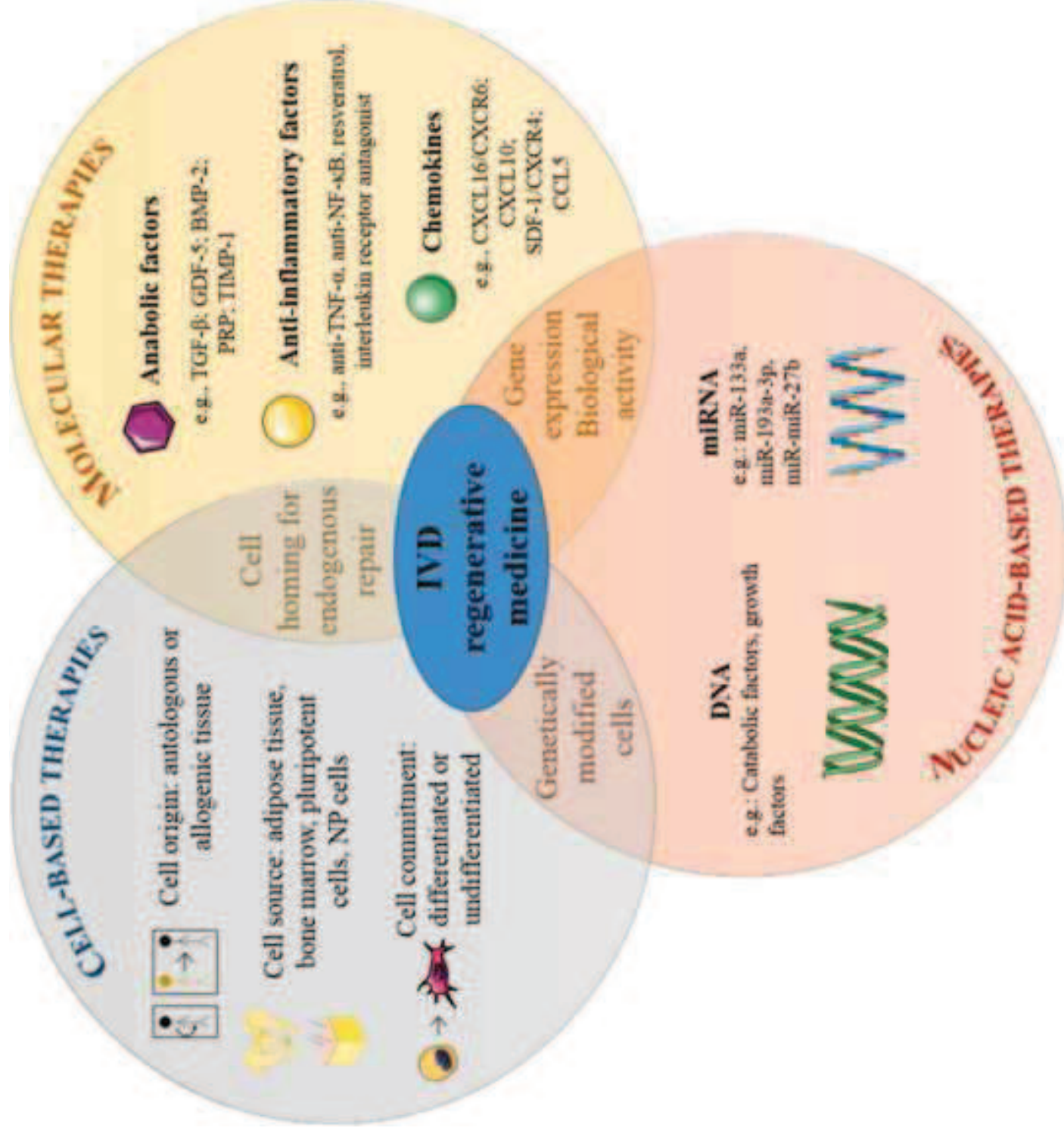


Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)

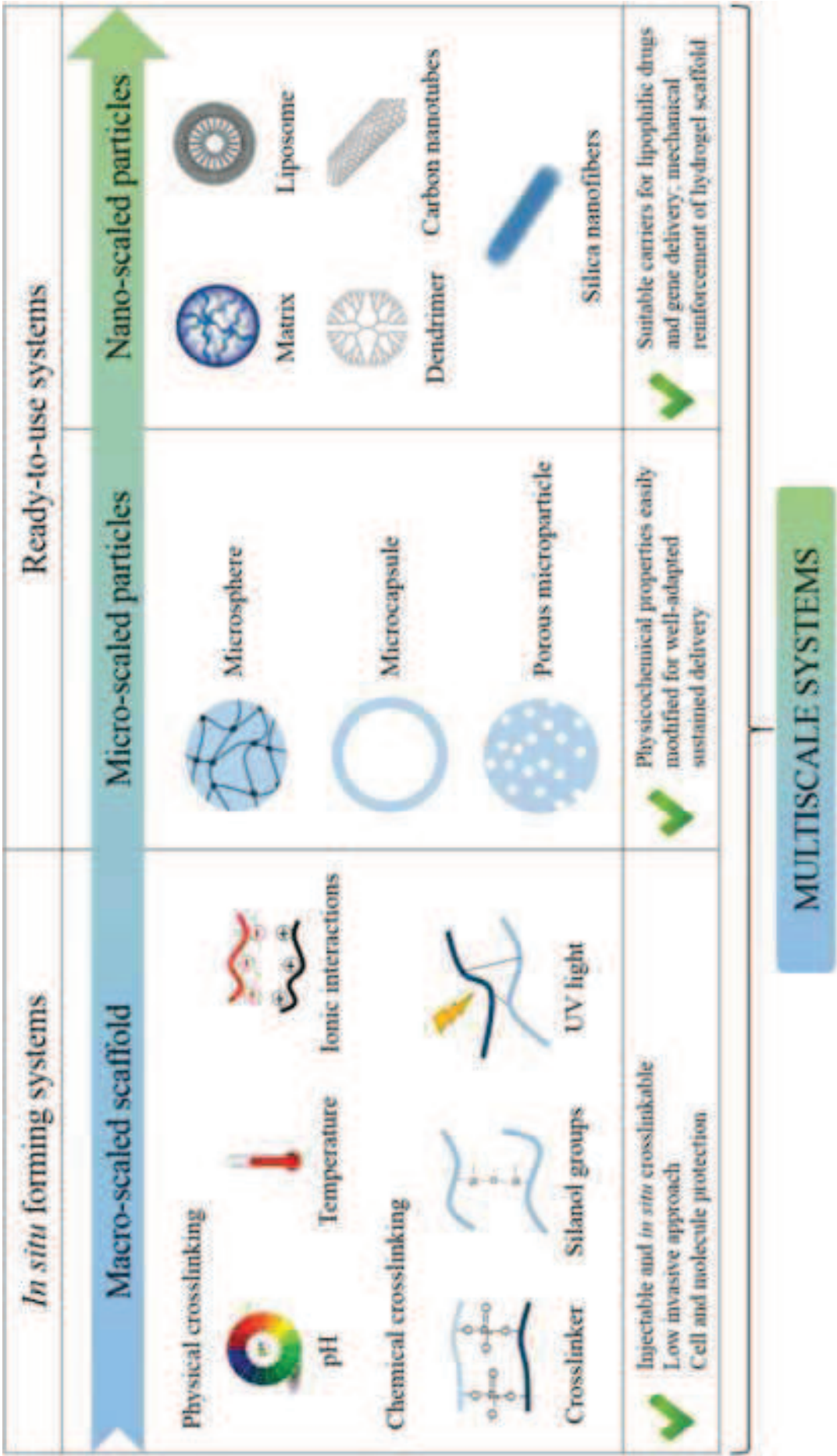
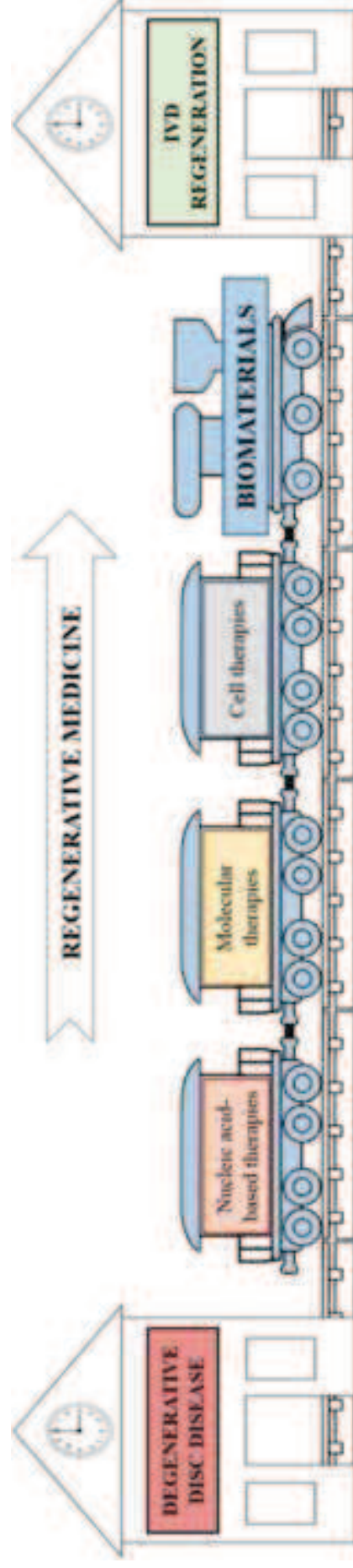


Figure 5

[Click here to download high resolution image](#)



L'ensemble des données présentées ci-dessus et les deux articles de revue ont permis de mettre en évidence la nécessité absolue de développer de nouveaux biomatériaux capables de libérer de manière prolongée des molécules biologiquement actives. Ces molécules permettront de stimuler les cellules résidentes du DIV et ainsi stopper la progression des processus dégénératifs, voire engager une régénérescence du tissu discal.

Ainsi, au cours de cette thèse nous avons étudié deux biomatériaux : la silice, sous forme de nanofibres et le pullulane, sous forme de microbilles. Pour ces deux matériaux, la synthèse et la caractérisation ont été réalisées avant de s'intéresser à la capacité de chacun de ces matériaux à former un support pour la libération prolongée de molécules actives. Deux facteurs de croissance, le TGF- β 1 et le GDF-5, ont particulièrement été étudiés et le maintien de leur activité biologique après libération a également été analysé. Les résultats obtenus seront développés dans la seconde partie de ce manuscrit.

PARTIE II - DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES A LIBERATION PROLONGEE DE MORPHOGENES

Article III

Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of the protein-silica interactions. N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, P. Weiss, Eric Gautron, D. Renard, T. Cordonnier, F. Boury, B. Humbert, H. Terrisse, J. Guicheux, J. Le Bideau. *J Mater Chem B*, 2017; **5**: 2908-2920

Article IV

Pullulan based microbeads for the sustained delivery of growth factors: new insight for intervertebral disc regenerative medicine. N. Henry, J. Clouet, A. Fragale, Louise Griveau, P. Weiss, J. Le Bideau, J. Guicheux, C. Le Visage. *Drug Delivery*, 2017 ; **24 (1)** : 999–1010

I. NANOFIBRES DE SILICE

1. Rationnel de l'étude

L'implication de différentes molécules dans les processus dégénératifs du DIV a été récemment démontrée et le développement de systèmes à libération prolongée (DDS) pour la délivrance *in situ* de certaines de ces molécules, capables de stopper la progression des processus dégénératifs, voire engager une régénérescence du tissu discal, présente un intérêt majeur.

Ces DDS sont développés à partir de divers biomatériaux en fonction des propriétés physicochimiques et mécaniques souhaitées pour l'application visée. Parmi ces matériaux, les silices colloïdales apparaissent particulièrement intéressantes. En effet, le contrôle de leurs voies de synthèses permet d'ajuster leur facteur de forme et leur porosité³⁰⁷, ce qui peut permettre d'adapter la taille des pores à l'application visée. Ainsi, de nombreuses formes de silice ont été développées pour la délivrance de molécules actives, notamment la MCM-41 et la SBA-15³⁰⁸⁻³¹⁴. De plus, les silices colloïdales possèdent une faible cytotoxicité³¹⁵, rendant leur utilisation pertinente pour des applications *in vivo*.

Récemment, cette silice colloïdale a été utilisée pour la synthèse de nanoparticules présentant un facteur de forme de 10 et nommées nanofibres de silice (SNFs)³¹⁶. De manière intéressante, une thèse soutenue en 2012 par Nela Buchtová et réalisée en collaboration entre le laboratoire RMeS (anciennement LIOAD) et l'Institut des Matériaux Jean Rouxel de Nantes (IMN), a mis en évidence la possibilité d'utiliser ces SNFs dans le cadre du développement de nouvelles stratégies d'ingénierie tissulaire pour la régénérescence du cartilage articulaire³¹⁷. Dans ce travail, les SNFs ont été associées à un hydrogel développé au laboratoire RMeS dans les années 2000³¹⁸, l'hydroxypropyl méthylcellulose silanisé (HPMC-Si). Ce polymère a notamment été utilisé pour véhiculer des cellules souches pour la médecine régénératrice du myocarde ou du cartilage articulaire^{319,320}, et présente les avantages d'être capable de réticuler *in situ* après injection et d'être biocompatible. La présence de groupements silanols, tant sur les chaînes de ce polymère Si-HPMC que sur les SNFs, permet après mise en présence des deux éléments, la formation de liaison Si-O-Si qui induisent un renforcement des propriétés mécaniques du système formé vis-à-vis de celles de l'hydrogel

seul. Ainsi, il a été démontré que le module d'Young en compression pouvait être multiplié jusqu'à 5 au seuil de percolation des SNFs, atteignant ainsi une valeur proche de celle d'un NP sain³²¹.

Au regard de toutes ces données, l'utilisation des SNFs pour la libération prolongée des facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5, en association avec l'hydrogel de Si-HPMC, semble particulièrement adaptée dans le cadre de la médecine régénératrice du DIV. Ainsi, nous avons réalisé une première étude de faisabilité avec une protéine modèle, le lysozyme. Cette protéine et les deux facteurs de croissances, TGF- β 1 et GDF-5, présentent en effet une ionisation semblable, à pH neutre, et des poids moléculaires proches. Nous avons ainsi fait l'hypothèse que le lysozyme permettrait d'évaluer correctement le potentiel d'adsorption/libération du TGF- β 1 et du GDF-5 sur les SNFs, ainsi que de déterminer les conditions d'association optimales. Cette première étape nous a de plus permis d'étudier les interactions protéine/silice en jeu lors de l'adsorption des protéines sur les SNFs. Dans un second temps, les cinétiques de libération des facteurs de croissance adsorbés sur les SNFs ont été réalisées, tout en s'assurant du maintien de leur activité biologique *in vitro*. L'ensemble des résultats obtenus est décrit dans l'article III **Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of the protein-silica interactions**. N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, P. Weiss, Eric Gautron, D. Renard, T. Cordonnier, F. Boury, B. Humbert, H. Terrisse, J. Guicheux, J. Le Bideau. *J Mater Chem B*, 2017; **5**: 2908-2920

ARTICLE III

Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of the protein-silica interactions.

N. Henry, J. Clouet, C. Le Visage, P. Weiss, Eric Gautron, D. Renard, T. Cordonnier, F. Boury, B.

Humbert, H. Terrisse, J. Guicheux, J. Le Bideau.

J Mater Chem B, 2017; **5**: 2908-2920

Résumé

L'utilisation de systèmes à libération prolongée pour la délivrance de molécules *in situ*, est aujourd'hui largement envisagée dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques en ingénierie tissulaire. Dans cette étude, l'utilisation de nanofibres de silice (SNFs) pour la délivrance de protéines biologiquement actives est proposée. La quantité de protéine adsorbée sur les SNFs a été étudiée en fonction du pH, du temps et de la concentration de la solution initiale. Les interactions créées entre la protéine et les SNFs ont ensuite été analysées par microscopie électronique, spectroscopie de perte d'énergie électronique et infrarouge. Des mesures de potentiel zéta ont également été réalisées afin d'apprécier les charges des deux entités dans les différentes conditions de travail choisies. Les cinétiques de libération ainsi que le maintien de l'activité biologique des protéines libérées ont été étudiés. La première partie de ce travail a été réalisée avec une protéine modèle, le lysozyme. Dans un deuxième temps, deux facteurs de croissance impliqués dans la différenciation de cellules stromales issues du tissu adipeux humain vers des cellules présentant un phénotype proches des nucléopulpocytes, le GDF-5 et le TGF- β 1, ont été utilisés. Nous avons ainsi démontré que les interactions protéine-silice sont majoritairement sous le contrôle de liaisons hydrogènes associées localement à des interactions électrostatiques. Ces résultats apportent une meilleure compréhension des phénomènes en jeu lors de l'adsorption ainsi qu'une méthode de contrôle de l'adsorption et la libération de protéines sur les SNFs. Il convient de souligner que la libération des facteurs de croissance, et la persistance de leur activité biologique jusqu'à 28 jours, semblent compatibles avec les stratégies actuelles de médecine régénératrice des disques intervertébraux.



Cite this: DOI: 10.1039/c7tb00332c

Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of the protein–silica interactions

Nina Henry,^{abc} Johann Clouet,^{acde} Catherine Le Visage,^{ac} Pierre Weiss,^{ac} Eric Gautron,^b Denis Renard,^f Thomas Cordonnier,^g Franck Boury,^g Bernard Humbert,^b Hélène Terrisse,^b Jérôme Guicheux^{†ach} and Jean Le Bideau^{id†*b}

Drug delivery systems are proposed for the *in situ* controlled delivery of therapeutic molecules in the scope of tissue engineering. We propose herein silica nanofibers as carriers for the loading and release of bioactive proteins. The influence of pH, time and concentration on the amount of adsorbed proteins was studied. The interactions allowing loading were then studied by means of electron microscopy, zeta potential measurements, electron energy loss spectroscopy and attenuated total reflectance Fourier transform infrared analysis. Release profiles were determined and biological activities were enzymatically assessed. The first part of the work was carried out with lysozyme as a model protein, and then bioactive growth factors TGF- β 1 and GDF-5 were used because their significance in human adipose stromal cell differentiation towards intervertebral disc nucleopulpyocytes was previously assessed. It is demonstrated that protein–silica nanofiber interactions are mainly driven by hydrogen bonds and local electrostatic interactions. The present data thus provide a better understanding of the adsorption phenomenon involved, as well as a method to control protein adsorption and release. It is worth pointing out that the kinetic release of growth factors, up to 28 days, and their biological activity maintenance seem to be compatible with intervertebral disc regenerative medicine.

Received 1st February 2017,
Accepted 22nd March 2017

DOI: 10.1039/c7tb00332c

rsc.li/materials-b

1. Introduction

A large panel of drug delivery systems (DDSs) has been proposed for the *in situ* sustained or time-controlled delivery of therapeutic molecules including biomaterial-based nano- or micro-systems. These systems have been contemplated for cancer treatment,^{1,2} imaging,^{3,4} wound healing^{5,6} and skeletal regenerative medicine.^{7–9} Among the biomaterials used for the development of DDSs,^{10–13} colloidal silicas have been widely studied since their porosity, shape and synthesis can be controlled.¹⁴ Moreover, colloidal silicas were shown to present low cytotoxicity.¹⁵ In a previous work, we have presented the use of rod-shaped

colloidal silica nanofibers (SNFs) associated with hydrogels for tissue engineering.^{16,17} Herein, in line with this work, we investigate the use of these SNFs as DDSs for the purpose of tissue engineering.

Intervertebral disc (IVD) is a fibrocartilage located between vertebrae that play a pivotal role in the spine kinematics as a shock transmitter allowing trunk movement. Early after birth in humans, this structure, and notably its central part (*i.e.* the nucleus pulposus (NP)), initiates a process of degeneration leading to the loss of IVD biomechanical functions that in turn is one of the leading causes of low back pain.¹⁸ To address this clinical issue, regenerative medicine approaches have been considered with interest. Notably, the use of biomaterials combined with regenerative cells and/or bioactive molecules has recently been the object of particular attention for the repair or rejuvenation of degenerated IVD.^{19,20}

In this context, we have proposed the use of a self-setting hydrogel consisting of silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC).²¹ The Si-HPMC hydrogel has already been used as a carrier for stem cells notably in myocardium regeneration.²² However, for implantation in tissue experiencing a high level of mechanical constraints, *e.g.* IVD or articular cartilage, the first generation of Si-HPMC hydrogels fails to exhibit appropriate biomechanical properties. To overcome this limitation, we have

^a INSERM, UMRS 1229, RMeS “Regenerative Medicine and Skeleton”, Team STEP “Physiopathology and joint regenerative medicine”, Nantes, France

^b Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), UMR 6502 CNRS – Université de Nantes, Nantes, France. E-mail: Jean.LeBideau@cnsr-imn.fr

^c UFR Odontologie, Université de Nantes, Nantes, France

^d CHU Nantes, PHU 11 Pharmacie, Pharmacie Centrale, Nantes, France

^e Université de Nantes, UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Nantes, France

^f INRA, UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44300 Nantes, France

^g INSERM, UMRS 1232, CRCINA, Team 17, Angers, France

^h CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, France

[†] The authors have equally contributed to this work.

previously associated the Si-HPMC hydrogel with SNFs.¹⁷ These SNFs exhibit factors around 10 and their percolation threshold is obtained at a low loading, *i.e.* 3 wt% of SNFs in the Si-HPMC hydrogel, leading to a markedly increased (~ 5 fold) compressive Young's modulus up to 27 kPa, more closely related to that of healthy NPs.²³ In the light of the aforementioned data, it seems reasonable to speculate that in addition to being a relevant nano-reinforcement for the Si-HPMC hydrogel, SNFs could conjointly be a promising reservoir for the *in situ* delivery of bioactive molecules driving the IVD regenerative process such as the Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) or Growth Differentiation Factor-5 (GDF-5). Indeed, the synergistic role of these two growth factors has been recently demonstrated with respect to the differentiation of human adipose stromal cells towards NP cells.²⁴

The objective of the present work is to determine whether SNFs can be a relevant carrier for the loading and release of molecules. In this purpose, we first selected lysozyme as this is an extensively described model protein.^{25–28} The influence of pH, time and concentration on the amount of adsorbed lysozyme onto the SNFs was studied. The interactions allowing lysozyme to be loaded onto SNFs were then studied by electron microscopy, zeta potential measurements, electron energy loss spectroscopy and attenuated total reflectance Fourier transform infrared analysis. Finally, lysozyme release profiles were determined and biological activities were enzymatically assessed. In the second part of the work, we studied the adsorption and release capacities of TGF- β 1 and GDF-5 onto and from SNFs while ensuring the maintenance of their biological activity.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

All chemicals were used as received without any further purification. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB $\geq 99\%$, ref: H6269), Perfluorooctanoic acid (PFOA 96%, ref: 171468), sodium hydroxide, Tetraethylorthosilicate (TEOS $\geq 99\%$, ref: 86578), *Micrococcus Lysodeikticus* (ref: M3770) and lysozyme from chicken hen egg white (ref: L6876) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). (3-Mercaptopropyl) Trimethoxysilane (MPTMS 95%, ref: AB111219) was purchased from Abcr GmbH & co KG (Karlsruhe, Germany). Hydrochloric acid (HCl 35%, ref: UN1789) was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Pierce BCATM Protein Assay Kit (ref: 23225), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ref: 31966021), Ham's F-12 Nutrient Mix (F12, ref: 31765027), Penicillin/Streptomycin (ref: 15140122), HEPES 1 M (ref: 15630056), Gentamicin 50 mg mL⁻¹ (ref: 15750045) and Phosphate Buffer Saline (PBS, ref: 20012019) were purchased from ThermoFisher Scientific (Saint-Aubin, France). Fetal Bovine Serums were purchased from PAN Biotech (FBS Premium, South America origin ref: 3302 – GmbH Aidenbach, Germany) and Dominique Dutscher (FBS, South America origin, ref: S1810 – Brumath, France). GDF-5 (ref: 120-01) and TGF- β 1 (ref: 100-21) were purchased from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France).

2.2. SNF synthesis and characterization

The synthesis of SNFs was performed using a protocol adapted from Rambaud *et al.*¹⁶ In a typical synthesis, 0.6 g of CTAB and 0.06 g of PFOA were dissolved in 280 mL of distilled water and 2.1 mL of NaOH (10 M) under constant magnetic stirring at 260 rpm. The temperature of the solution was raised and kept at 60 °C and the silica precursors (3.7 mL of TEOS and 350 μ L of MPTMS) were added to this solution. After 4 additional hours at the same temperature, the solution was filtered and washed with distilled water and ethanol. SNFs were then put in a reflux of ethanol with a few drops of HCl at 90 °C for 17 h. Finally, the suspension was washed again with ethanol. The solid was dried at 50 °C and the remaining templates were removed by calcination for 6 h at 550 °C under an ambient atmosphere. The resulting material was a white powder.

Scanning Electron Microscopy (SEM) was carried out using a field emission gun SEM JSM 7600F (Jeol). Transmission Electron Microscopy (TEM) micrographs were acquired using a Hitachi HF2000 (cold FEG, 100 kV, 0.23 nm point to point resolution). X-Ray Diffraction (XRD) patterns were obtained using a Siemens D5000 operating in the Bragg-Brentano geometry using a CuK α radiation source ($\lambda = 1.5418$ Å). N₂ adsorption/desorption analyses were performed after treatment under vacuum at 100 °C using a 3Flex (Micrometrics). The specific surface area was determined through the BET model and the pore size dimensions were calculated using the Barret-Joyner-Halenda (BJH) method.

2.3. Lysozyme adsorption onto SNFs

Lysozyme adsorption on SNFs was carried out by suspending 25 mg of SNFs in 400 μ L of 30 mM phosphate buffer pH 4, 7 or 10 for the first set of experiments. A solution of lysozyme was added for a final volume of 500 μ L at 1 mg mL⁻¹, 10 mg mL⁻¹ and 25 mg mL⁻¹. Subsequent experimentations were performed at pH 10 at concentrations ranging from 1 to 100 mg mL⁻¹. Controls were also performed (lysozyme solution without SNFs and SNFs without lysozyme). Adsorption was allowed for 1 h, 24 h or 48 h at 4 °C under rotary stirring at 24 rpm on a Mini LabRollerTM Dual Format Rotator (Labnet). The suspensions were then centrifuged for 20 minutes at 7000 rpm and the supernatant was removed. For the determination of the protein concentration in the supernatant, the BCA protein assay kit was used. The amount of adsorbed lysozyme was then calculated from the difference between initial and supernatant concentrations. The remaining SNFs were kept at -20 °C for further experiments.

Zeta potential analyses were first performed on lysozyme and SNFs alone, using a NaCl solution at different concentrations (10⁻¹, 10⁻² and 10⁻³ M). We additionally studied lysozyme-loaded SNFs. In this later case, a 1 mg mL⁻¹ solution of lysozyme was used and adsorption was performed as previously described. The analyses were performed in either a NaCl solution at 10⁻² M in ultrapure water or a Phosphate Buffer Saline solution (PBS) which is composed of KCl, NaCl, KH₂PO₄ and Na₂HPO₄ for an ionic strength of $\sim 3 \times 10^{-2}$ M. All suspensions were prepared at 10 mg mL⁻¹. SNFs alone were dispersed in the medium by being immersed into an ultrasound bath for 3 h. The suspensions were

adjusted to the desired pH values with aliquots of NaOH (2 M) or HCl (5 M) solutions before zeta potential measurements.

The analyses were performed using a Zetasizer Nano ZS (Malvern), and the conversion of electrophoretic mobility into zeta potential was done through the Smoluchowski approximation.

Visual Molecular Dynamics (VMD) v. 1.9.2 was used to model the electrostatic potential distribution around the protein at the desired pH and ionic strength (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/).²⁹ The electrostatic potential distribution of hen egg white lysozyme (LYS) was modelled using a given crystallographic structure, namely PDB 2VB1, taken from the RSCB Protein Data Bank (www.rscb.org). The electrostatic potential distribution for the protein at the desired pH and ionic strength was calculated using the true Poisson–Boltzmann electrostatics solver APBS (Adaptive Poisson–Boltzmann Solver) and the PDB2PQR software^{30,31} available at www.poissonboltzmann.org. Protonation states for titrable protein groups were assigned by PROPKA 3.0 (protpka.org) using a heuristic method to compute the pK_a perturbations due to desolvation, hydrogen bonding and charge–charge interactions.

2.4. Lysozyme–SNF interaction characterization

TEM was performed on SNFs prepared at different concentrations of lysozyme. For this purpose, SNFs were dried, finely dispersed mechanically and deposited on 300 Mesh copper grids covered with a holey carbon film (Electron Microscopy Sciences). Lysozyme was also observed alone by TEM: a solution of lysozyme was prepared at 1 mg mL^{−1} in phosphate buffer saline (PBS) pH 10 and a drop of this solution was deposited on Parafilm[®]. A silicon monoxide film deposited on a 300 Mesh copper grid (Electron Microscopy Sciences) was placed in contact for 3 minutes and rapidly dried. Then, the grid was kept in contact with a uranyl acetate solution for 5 seconds to perform negative staining.

Electron energy loss spectroscopy (EELS) was performed to assess the nature of the observed material on the SNFs as compared to lysozyme. The samples were prepared as previously described for the TEM experiments and the EELS spectra were acquired on a modified PEELS 666 spectrometer (Gatan). EELS allowed identifying unambiguously the lysozyme by detecting the presence of carbon, nitrogen and oxygen, by calculating the ratio between these elements (C/N/O).

The attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) method was chosen to use only a few milligrams of the samples. SNFs prepared at different concentrations of lysozyme were analyzed before and after the release experiments, and compared with SNFs alone. Lysozyme was analyzed after solubilizing in PBS pH 10 and then freeze-dried. The studies were performed using a Vertex 70 (Bruker) spectrometer equipped with an ATR accessory (Harrick ATR accessory ConcentratIR, 6 reflections) shipped with a diamond crystal. A total of 1000 scans from 400 cm^{−1} to 6000 cm^{−1} were acquired for each sample with a spectral resolution of 4 cm^{−1}. Data were handled using the Opus software.

2.5. Release kinetics of lysozyme and enzymatic activity

The kinetics of lysozyme release was assessed by using lysozyme loaded SNFs prepared as described previously. SNFs were

resuspended in 1 mL of PBS pH 7.2 and stirred for 20 days at 37 °C. At selected times, suspensions were centrifuged for 10 minutes at 5000 rpm. Supernatants were collected and analyzed using the BCA[™] protein assay kit to determine the amount of released lysozyme. SNFs were then resuspended in 1 mL of fresh PBS and stirred again at 37 °C. The remaining amount of adsorbed lysozyme was calculated from the difference with the initial adsorbed amount.

In parallel, the enzymatic activity of the released lysozyme was tested using *Micrococcus lysodeikticus* as lysozyme is known for degrading bacterial walls.³² Tests were performed on the supernatant samples as well as on positive controls (fresh solution of lysozyme and control solution prepared during adsorption experiments) and negative controls (inactivated lysozyme solution, PBS and the supernatant of SNFs without lysozyme). Briefly, a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* was prepared with 0.6–0.8 absorbance at 450 nm, as recommended by the supplier. In a 96-well microplate, 10 µL of the samples or controls were added together with 250 µL of the *Micrococcus lysodeikticus* suspension. After 20 minutes of incubation at 37 °C, the absorbance was read at 450 nm using a Victor 3V 1420 Multilabel Plate Counter (Perkin Elmer).

2.6. Growth factor adsorption and delivery

Growth factors (TGF-β1 and GDF-5) were adsorbed onto the SNFs according to the previously described protocol for lysozyme adsorption. Briefly, TGF-β1 and GDF-5 adsorption on SNFs was carried out by suspending 25 mg of SNFs in 400 µL of 30 mM phosphate buffer pH 7. A solution of growth factors was added for a final volume of 500 µL at 1000 ng mL^{−1}, 2000 ng mL^{−1} and 4000 ng mL^{−1}. Controls were also prepared (growth factor solution without SNFs and SNFs without growth factor). Adsorption was allowed for 48 h at 4 °C under rotary stirring at 24 rpm on a Mini LabRoller[™] Dual Format Rotator (Labnet). The suspensions were then centrifuged for 10 minutes at 5000 rpm and the supernatant was removed.

2.6.1. Delivery from free SNFs. SNFs were resuspended in 0.5 mL PBS/BSA 1% (w/v) filtered on a 0.20 µm porosity filter and stirred for 21 days at 37 °C. At selected times, suspensions were centrifuged for 10 minutes at 5000 rpm. Supernatants were collected, replaced by fresh PBS/BSA 1% and kept at −80 °C for further experiments. The determination of growth factor concentration in the supernatant was performed using ELISA DuoSet[®] assay kits (RnD Systems – DY240 and DY583 for TGF-β1 and GDF-5 respectively).

2.6.2. Delivery from the Si-HPMC/SNF hydrogel. The Si-HPMC/SNF hydrogel was prepared as previously described¹⁷ and deposited in a 12-well plate and controls were also prepared (Si-HPMC loaded with growth factors without SNFs). Cross-linking was allowed for 3 h at 37 °C and 1 mL of PBS/BSA 1% (w/v) was added on the top of the hydrogel. The plate was then incubated at 37 °C under mild stirring for 28 days. At selected times, the medium was collected, replaced by fresh PBS/BSA 1% and kept at −80 °C for further experiments. The determination of growth factor concentration in the supernatant was performed using

ELISA Duoset[®] assay kits (RnDSystems – DY240 and DY583 for TGF- β 1 and GDF-5 respectively).

2.6.3. Biological activity of the released factors. Stromal cells isolated from human adipose tissue (hASC) were cultured using DMEM supplemented with 10% FBS (Dominique Dutscher), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) at 37 °C, 5% CO₂. Chondrogenic ATDC5 cells were cultured using DMEM/F12 media supplemented with 5% FBS (Pan Biotech), 1% HEPES and 0.1% gentamycin. When 80% confluence was reached, the cells were seeded in a 6-well plate at 100 000 and 150 000 cells per well for hASC and ATDC5, respectively. The cells were allowed to proliferate until reaching approximately 80% confluence and serum starved for 24 h with the same medium described above, before stimulation with released growth factors. Supernatants of the delivery from Si-HPMC associated SNFs loaded with TGF- β 1 and GDF-5 were deposited onto hASC and ATDC5 cells, respectively, and incubated for 1 h at 37 °C. The media were then removed and the plates were frozen with liquid nitrogen. The proteins were extracted on ice using a homemade RIPA buffer and assayed using the BCA[™] Protein Assay Kit. Western Blot was performed and after migration using 4–15% Criterion[™] TGX[™] precast gels (ref: 567-1083 – Bio-Rad), proteins were transferred onto 0.2 μ m PVDF membranes (ref: 1704156 – Bio-Rad) using the Transblot[®] Turbo[™] transfer system (Bio-Rad). Smad 1 (antibody 1/1000th ref: 9743S – cell signaling) and P-Smad 1/5/8 (antibody 1/1000th ref: 9511S – cell signaling) were detected for cells stimulated with GDF-5. Smad 2

(antibody 1/1000th ref: 3102S – cell signaling) and P-Smad 2/3 (antibody 1/1000th ref: 3101S – cell signaling) were detected for cells stimulated with TGF- β 1. All primary antibodies were revealed using a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody (1/2000th ref: 7074S – cell signaling) and the SuperSignal[™] West Dura substrate (ref: 34076 – ThermoFisher Scientific) on the ChemiDoc[™] MP Imaging System (Bio-Rad) and the Image Lab software.

2.7. Statistics

Statistical analyses (Graphpad software) were performed using either a two-way Anova followed by a Bonferroni post-test or a one-way Anova followed by a non-parametric Kruskal–Wallis test. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

3. Results

3.1. SNF synthesis and characterization

In order to analyze whether SNFs could be conjointly a nano-reinforcement for the Si-HPMC hydrogel and a reservoir for the delivery of bioactive molecules, we first synthesized and characterized rod-shaped mesoporous silica nanofibers (SNFs) following previously described protocols.¹⁶ Each batch produced about 800 mg of SNFs with a yield of 20 wt% as referred to the mass of the silica precursors. Ten batches of SNFs were obtained for the entire study according to the protocol

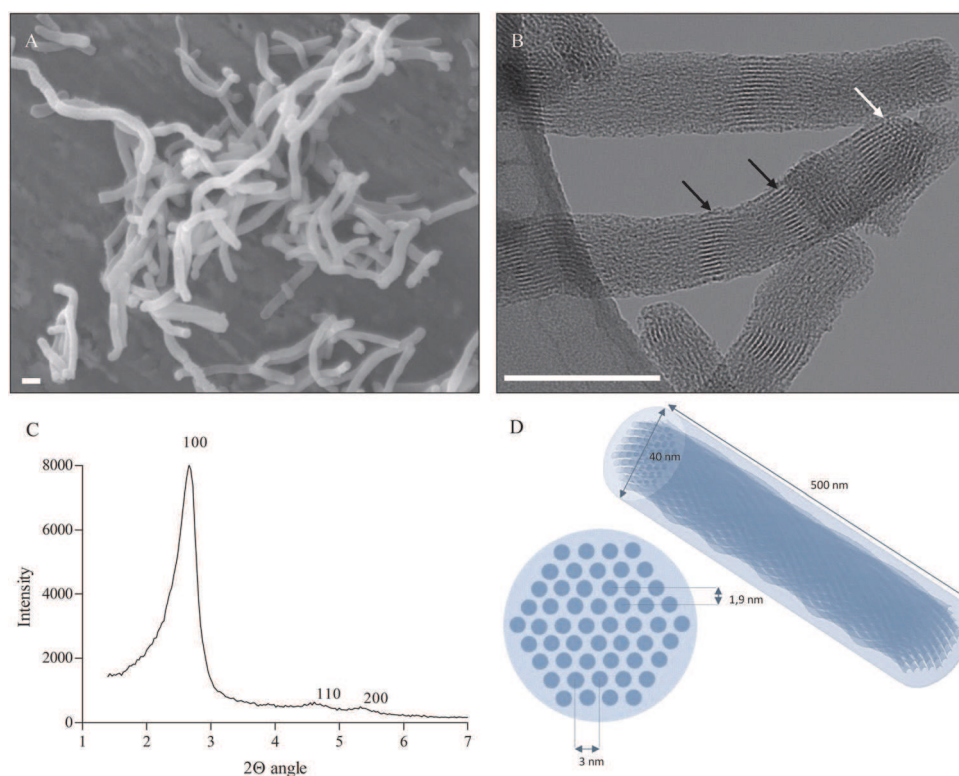


Fig. 1 Structural characterization and schematic representation of SNFs. (A) SEM and (B) TEM micrographs showing the morphology and internal helical porous network of SNFs (scale bar: 100 nm). XRD analyses of SNFs (C) confirm the hexagonal internal structure; helical and hexagonal arrangement is illustrated on schematic entire and cross-section representations (D).

previously described. The SEM analysis of a representative sample is presented in Fig. 1A. The rod-shaped SNFs were of approximately 500 nm length and 40 nm diameter, in accordance with the literature.¹⁷ TEM observation indicates the presence of a helicoidal network of pores coaxially with the SNF axis (Fig. 1B, black arrows). Additionally, the extremity of one of the SNFs (white arrow) shows the hexagonal organization of the network, perpendicular to the SNF axis. This observation is further supported by the XRD diagram (Fig. 1C) demonstrating the hexagonally ordered pore network. This structure is schematically represented in Fig. 1D. The porosity and specific surface area were investigated by N₂ adsorption/desorption (BJH and BET models respectively). The results demonstrated that SNFs exhibit mesoporosity with pore diameters of about 2 nm, and a BET specific surface area of $1110 \pm 162 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ was found to be within the range of mesoporous silica classically described in the literature (data not shown).^{16,33} The 10 batches were then mixed together and further experiments of adsorption, characterization and release were performed using this pooled material.

3.2. Lysozyme adsorption on SNFs

To determine whether SNFs may allow molecule adsorption, we then used lysozyme as a model protein.^{25–28} This protein was chosen with respect to its molecular weight and surface ionization at neutral pH, which are similar to those of GDF-5 and TGF- β . Indeed, these parameters, and particularly surface ionization, are well known to play a key role within a surface adsorption-based sustained release system.³⁴ The determination of lysozyme adsorption onto SNFs as a function of pH and incubation time was then performed. First experiments were performed with an initial concentration of lysozyme arbitrarily fixed at 10 mg mL^{-1} (Fig. 2A). The initial concentrations of 1 and 25 mg mL^{-1} were also tested, but data were not shown since similar trends were obtained. Fig. 2A highlights a significant increase in the adsorbed amount of lysozyme on the SNFs as a function of incubation time and buffer pH. Regarding the influence of the initial concentration, Fig. 2B establishes that the adsorbed amount of lysozyme increases significantly as a function of the initial concentrations at pH 10. Finally, Fig. 2C shows a maximal adsorption efficiency ($>90\%$) for concentrations ranging from 1 mg mL^{-1} to 10 mg mL^{-1} . This adsorption efficiency decreases with higher concentrations and reaches approximately 30% at 100 mg mL^{-1} .

3.3. Lysozyme–SNF interaction characterization

3.3.1 Zeta potential and electrostatic potential distribution analyses. To understand the dependence of lysozyme adsorption on pH, three sets of zeta potential experiments were performed on both the lysozyme and SNFs alone, in the presence of different NaCl concentrations (Fig. 3A). As expected, we observed that the lower the ionic concentration in the media, the higher the zeta potential absolute value, both for lysozyme and SNFs. The evolution of zeta potential *versus* pH is classical for both samples, with decreasing values when pH increases. For SNFs, zeta potential values are negative in a wide pH-range, with an isoelectric point (IEP) of about 3. For lysozyme, the IEP depends

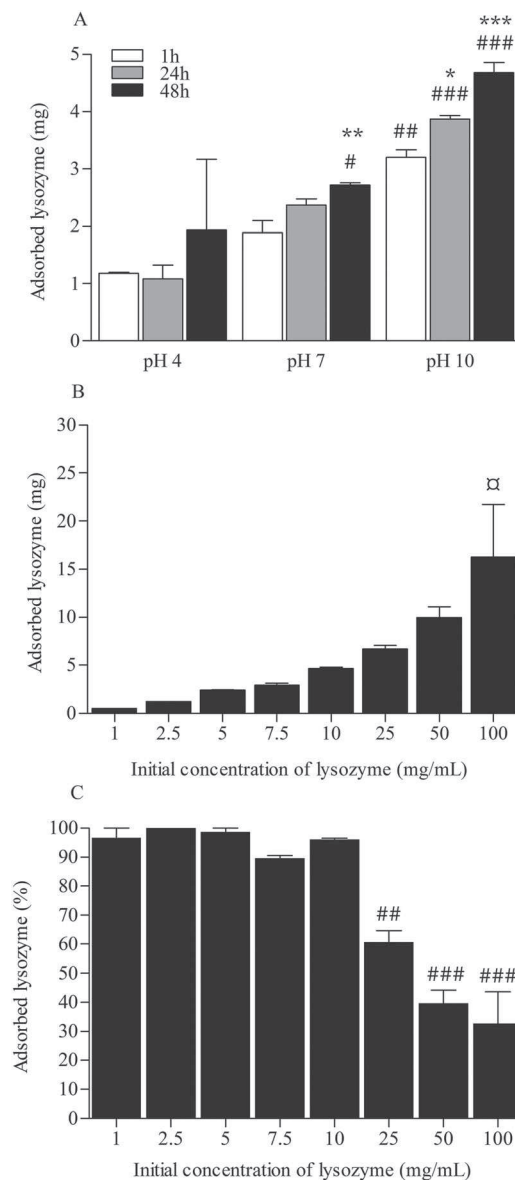


Fig. 2 Lysozyme adsorption onto SNFs as a function of pH, time and initial concentration. Influence of (A) the pH of the medium and incubation time (10 mg mL^{-1}), (B) the initial protein concentration in the medium (pH 10, 48 h of incubation time) (* significantly different from 1 h at the same pH and # significantly different from the same incubation time at different pH; α significantly different from concentrations ranging from 1 to 25 mg mL^{-1} with * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$); (C) adsorption efficiency as a function of the initial concentration of lysozyme in the medium (pH 10, 48 h of incubation time) (# significantly different from concentrations ranging from 1 to 10 mg mL^{-1} with ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$).

on ionic strength (about 7 for 10^{-1} M in NaCl, 9 for 10^{-2} M and 10 for 10^{-3} M), and zeta potential gets positive values in a large pH-range. These modifications of the IEP could be induced by anionic specific adsorption of chloride anions onto the surface of lysozyme.

Experiments were then performed on lysozyme, SNFs alone and lysozyme-loaded SNFs in two media, NaCl 10^{-2} M solution and PBS (Fig. 3B and C), in order to detect potential interactions

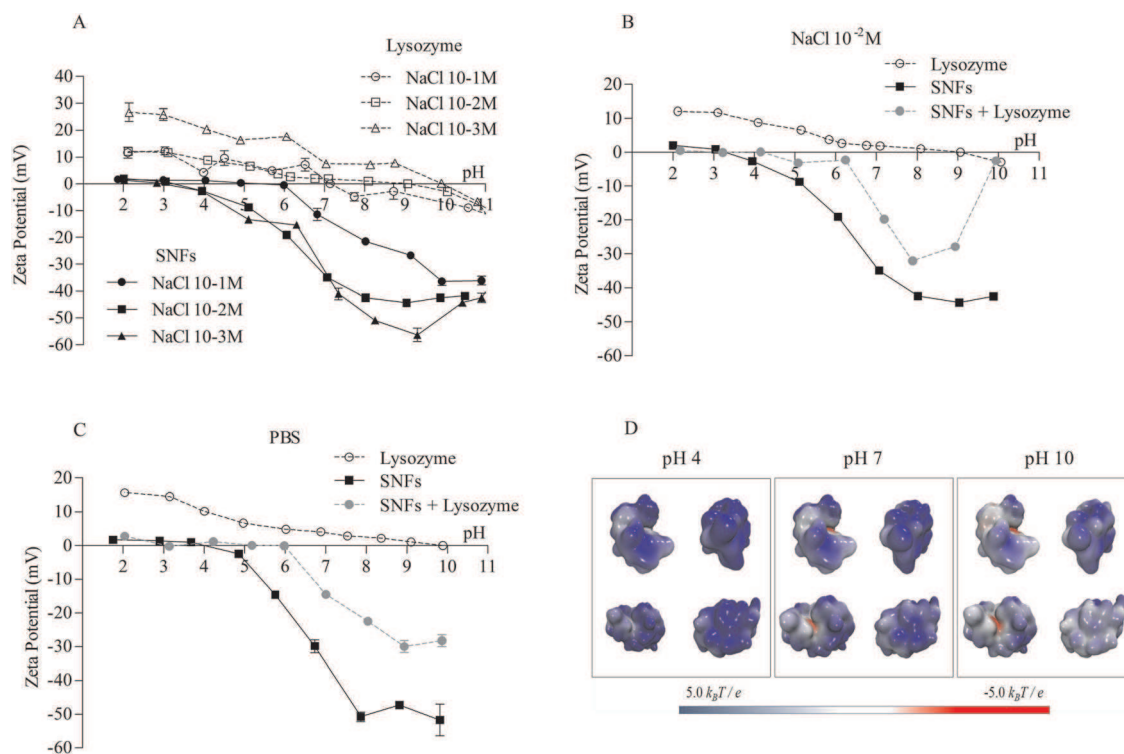


Fig. 3 Zeta potential of lysozyme, SNFs alone or after lysozyme adsorption. (A) Influence of NaCl concentration on zeta potential of both lysozyme and SNFs alone. Influence of pH on the zeta potential of lysozyme, SNFs alone or SNFs after lysozyme adsorption suspensions at 10 mg mL⁻¹ in (B) NaCl 10⁻² M solution or (C) PBS at 3 × 10⁻² M. The pH suspensions were adjusted using NaOH (2 M) and HCl (5 M). (D) Four views of 3d representations of the electrostatic potential distribution at the solvent-accessible surface of a lysozyme molecule as a function of pH calculated at pH 4, 7 and 10 respectively. k_B , Boltzmann constant; t , temperature; e , elementary charge ($1k_B T/e \approx 0.0253$ V). The protonation state of each amino acid or basic residue was evaluated at the chosen pH using PROPKA 3.0. The electrostatic map was computed online with the Adaptive Poisson–Boltzmann Solver (APBS) and drawn using the software Visual Molecular Dynamics (VMD).

between SNFs and lysozyme. A comparison between Fig. 3B and C highlights a small shift of the IEP for the SNFs from 3 in NaCl solution to 4 in PBS. Similarly, the lysozyme study, when changing the medium, shows a small shift of the IEP from 9 in NaCl solution to 10 in PBS. In both experiments, a slight increase in the absolute value of zeta potential in PBS compared to that in NaCl solution was observed. However, the evolution of zeta potential according to pH shows a similar tendency in both media. In addition, it is observed that regarding lysozyme-loaded SNFs, zeta potential is comprised between the lysozyme and SNF alone values at each pH. The global charge of the edifice is almost neutral for pH lower than 6 in both media and decreases to negative values for higher pH. The most important feature of zeta potential curves recorded for lysozyme-loaded SNFs is the significant shift of the SNF IEP towards higher pH, in NaCl (shift of 1 pH unit) as in PBS (shift of 2 pH units).

Finally, we calculated the electrostatic potential distribution of lysozyme as a function of pH using the PROPKA software as described previously (Fig. 3D). Our model protein (2VB1) has an isoelectric point at pH = 10.90. As a result, in an event at the highest alkaline pH = 10 probed here, protonation of basic and acidic surface amino-acid groups leads to a slightly significant +3.6 net charge on the lysozyme monomer. At the lowest pH = 4 tested here, the net charge increases up to +11.77, and at the intermediate neutral pH = 7, the net charge is +8.27. It was

therefore observed that in acidic medium the lysozyme surface was homogeneously and strongly positive. In alkaline medium, close to the IEP of lysozyme, a minor local negatively charged zone coexists with large neutral and positive zones, leading to a heterogeneously charged molecule. These electrostatic potential distributions, relatively to pH, amplify the significance of the Coulomb forces for adsorption behaviors of lysozyme on SNFs. In particular, the heterogeneity of surface charge distribution at a fixed pH makes this protein a suitable model system for this work. In addition, the calculated electrostatic potential distributions according to pH are therefore in accordance with the zeta potential analyses.

3.3.2 TEM observation. To gain insights into the mechanisms underlying adsorption of lysozyme onto SNFs, we then performed Transmission Electron Microscopy (TEM) analyses of representative samples. SNFs alone (Fig. 4A), and SNFs prepared with initial concentrations of lysozyme at 2.5, 50 and 100 mg mL⁻¹, are presented in Fig. 4B–D, respectively. As the initial lysozyme concentration increased from 2.5 to 50 mg mL⁻¹, the images showed more and more spherical particles of approximately 10 nm diameter (Fig. 4B and C, black arrows) adsorbed on the surface of the SNFs. At the highest concentration of 100 mg mL⁻¹, SNFs were embedded in an organic shell (Fig. 4D, white dotted line). To assess that both the spherical particles and the organic shell were lysozyme, electron energy loss spectroscopy (EELS) was

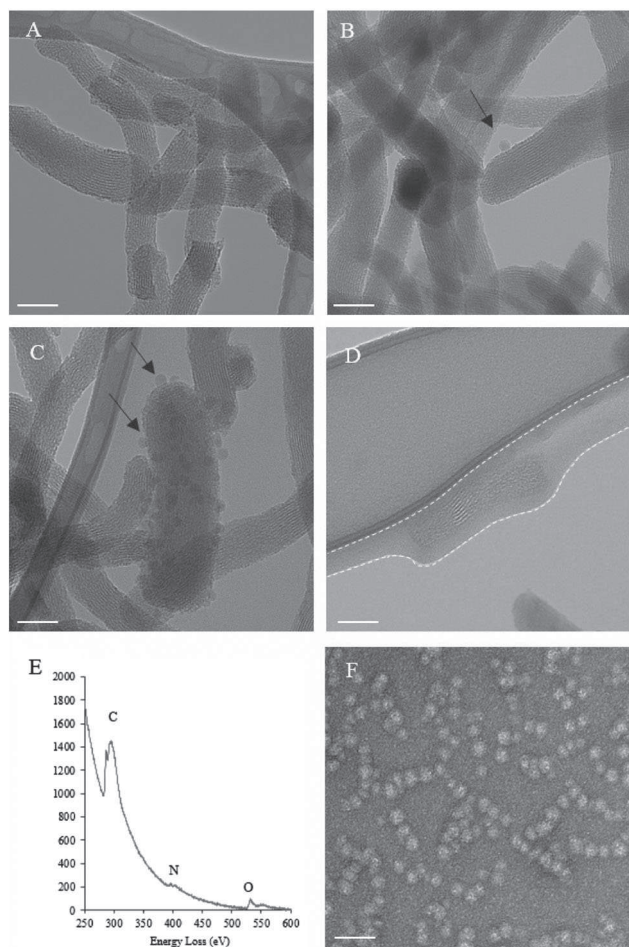


Fig. 4 TEM observation and characterization of the adsorbed lysozyme onto SNFs at pH 7. TEM micrographs of SNFs (A) without lysozyme and (B–D) with increasing amount of adsorbed lysozyme (2.5, 50 and 100 mg mL⁻¹); (E) represents a typical spectrum obtained in EELS analysis on previously presented samples; (F) presents lysozyme morphology when adsorbed on a silica coated TEM grid and negatively stained with a uranyl acetate solution (black arrows: lysozyme aggregates, white dotted zone: organic shell. (a–d) and (f), scale bar = 50 nm).

performed as previously described in the Experimental section on the samples presented in Fig. 4B–D and on lysozyme alone. The carbon/nitrogen/oxygen (C/N/O) elemental ratios were calculated and a representative spectrum is presented Fig. 4E. The C/N/O ratio can be determined for the lysozyme alone (79/15/6 at% respectively) and in the organic shell observed for the concentrations of 100 mg mL⁻¹ (78/16/6 at% respectively). Nevertheless, the C/N/O ratio could not be established for concentrations where spherical particles were observed on the SNFs (2.5 and 50 mg mL⁻¹) because of their dispersion and their lack of stability, even at -180 °C, when the electron beam was focused on them. The morphological analyses of silica-adsorbed lysozyme were then performed using lysozyme directly deposited onto silica coated copper grids and negatively stained with uranyl acetate. As in Fig. 4B and C, spherical particles of 10–20 nm diameter were observed (Fig. 4F).

3.3.3 Infrared study. After the experimental evidence that lysozyme was likely to be adsorbed onto the surface of SNFs, we

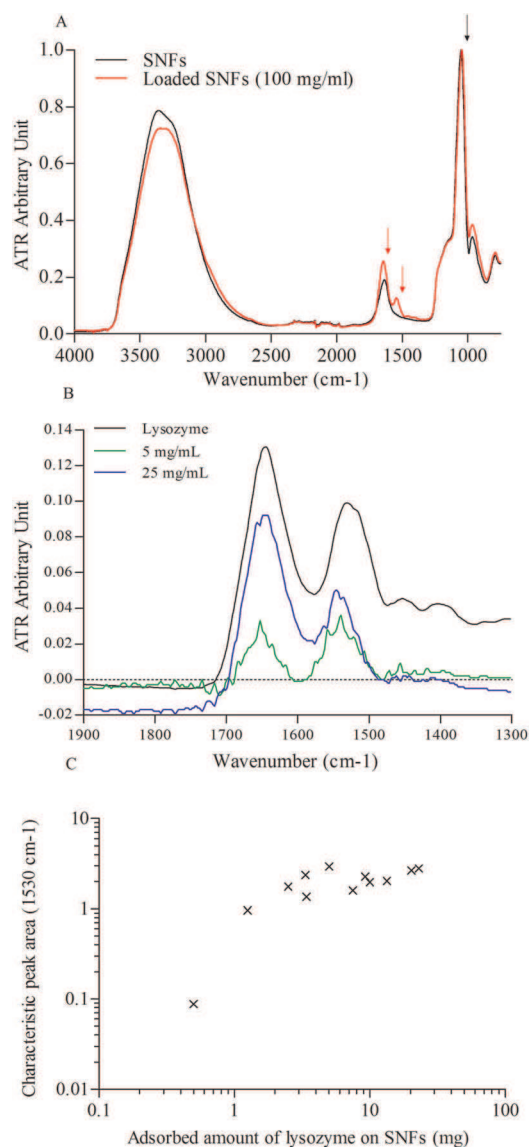


Fig. 5 ATR/FTIR analysis of SNFs alone as compared with SNFs with lysozyme at different initial concentrations. (A) Spectrum of SNFs alone (black) were compared with spectra of SNFs prepared with an initial concentration of 100 mg mL⁻¹ of lysozyme (red). Characteristic vibrational bands were identified (black arrow: Si–O–Si characteristic vibrational band, red arrows: amide i and ii characteristic vibrational bands); (B) spectra of lysozyme alone and of SNFs prepared with initial concentrations of lysozyme at 5 and 25 mg mL⁻¹; (C) amide ii characteristic vibrational band area as a function of the adsorbed amount of lysozyme.

were interested in determining whether specific SNF/lysozyme interactions may account for the adsorption process. Fig. 5A shows the attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) comparative analyses of SNFs alone (black curve) or loaded with lysozyme (red curve). The black arrow indicates the active infrared phonons of the silica bulk (Si–O–Si stretching vibrational modes are centered at 1053 cm⁻¹). The two red arrows correspond to the stretching vibration of amide I and II bands of lysozyme (respectively 1640 cm⁻¹ and 1523 cm⁻¹ for free lysozyme at pH 10). The first band being superimposed to the bending mode signal of the physisorbed

water and to the overtone of the silica phonons, its signal was therefore not exploited in our study. For instance, consecutively to the sorption of the lysozyme molecules, some water molecules are desorbed showing a strong decrease of the absorbance around 1630 cm^{-1} , while the amide I signal increases around 1640 cm^{-1} . Fig. 5B displays the $1300\text{--}1900\text{ cm}^{-1}$ spectral range with few examples obtained with initial concentrations of the adsorbed lysozyme, after very careful substraction of the SNF spectrum with the Opus software. The absorption centered around 1530 cm^{-1} (assigned to the amide II signal) was well separated from the amide I and water signals and increased on a flat background. The integrated intensity of this 1530 cm^{-1} band was plotted *versus* the amount of the adsorbed lysozyme, and two tendencies were found, as presented in Fig. 5C: both tendencies are consistent with the chemiometric approach (multivariate curve resolution, data not shown).³⁵ For a low adsorbed amount we observe a strong increase of the area peak of amide II, related to a strong chemical adsorption potential, its spectra are characterized by a narrower profile. In the second part of the graph, the increase of the area peak is much lower and is related to low-energy adsorption. The widths of the amide I and II bands increase weakly as compared to the first sorption step.

3.4. Release kinetics of lysozyme and enzymatic activity

After the characterization of the loading capacity of SNFs and their interactions with lysozyme, we determined the release kinetics of lysozyme and whether the released lysozyme was still biologically active.

SNFs were incubated for 48 h (pH 10, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) in the presence of 1 to 100 mg mL^{-1} lysozyme prior to centrifugation. Release experiments were then performed by incubating lysozyme-loaded SNFs in PBS pH 7.2 at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cumulative release profiles are displayed in Fig. 6.

For initial concentrations ranging from 5 to 100 mg mL^{-1} , a burst effect was observed within the 1st hour. At 5 mg mL^{-1} , this burst effect represented 31% of the total amount released and the release rate was of 0.14 mg h^{-1} . For the highest concentration, 80% of the total loaded amount was released within this burst period, representing a 4.92 mg h^{-1} release rate. For 5 and 100 mg mL^{-1} , these release rates slowed down during the following 3 hours to less than 0.01 and 1.9 mg h^{-1} , respectively. After the first 4 hours, for concentrations ranging from 25 to 100 mg mL^{-1} , the release reached a plateau after 3 days whereas for lower concentrations (7.5 and 10 mg mL^{-1}) this plateau was reached after 6 days. There was no additional release between day 6 and day 20, except for the 5 mg mL^{-1} concentration where a release was observed until 20 days.

Overall, the lysozyme release efficiency was related to the initial concentration of lysozyme. While SNFs prepared with an initial concentration of 100 mg mL^{-1} reached a maximum release of 53%, SNFs prepared with initial concentrations ranging from 5 to 50 mg mL^{-1} released 18% to 41% of the initial adsorbed lysozyme, respectively. On the other hand, with SNFs prepared with low concentrations of 1 and 2.5 mg mL^{-1} , no release could be detected at any time.

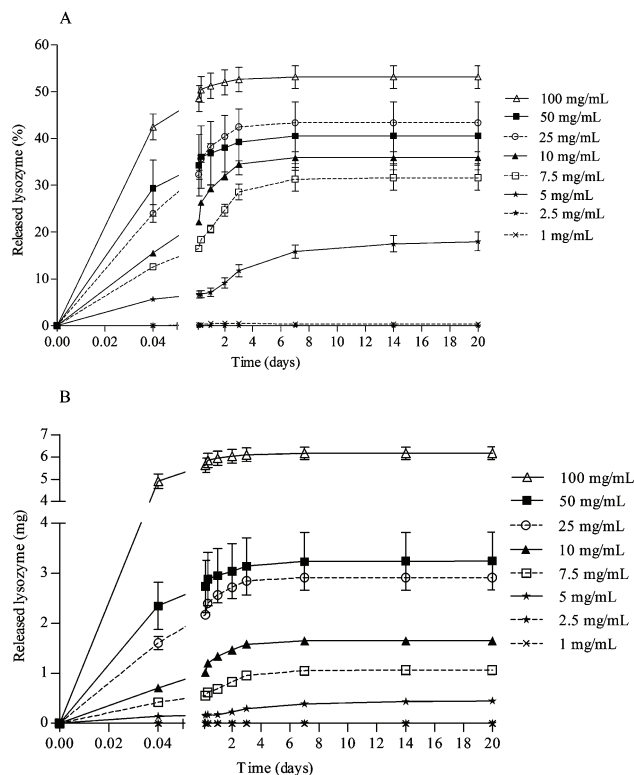


Fig. 6 Cumulative release profiles of lysozyme adsorbed onto the SNFs. Results are expressed as a function of (A) a percentage of the initial adsorbed amount of lysozyme and (B) the total released amount of lysozyme. SNFs were incubated with lysozyme for 48 h at pH 10, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ then release experiments were performed at pH 7.2 and $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Protein assays of the supernatant after 1 h, 4 h, 8 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d, 14 d and 20 d release were performed as described in the Experimental section.

We also confirmed that the released lysozyme was still enzymatically active, using the specific lysis assay of *Micrococcus lysodeikticus* (Table 1). As expected, negative controls did not show any enzymatic activity whereas, with positive controls, *Micrococcus lysodeikticus* was entirely degraded evidencing the enzymatic activity of the released lysozyme. The supernatant of SNFs prepared with initial concentrations of 1 and 2.5 mg mL^{-1} , which did not contain any lysozyme, did not show any enzymatic activity, while the supernatant of SNFs prepared at concentrations ranging from 5 to 100 mg mL^{-1} showed a maintained enzymatic activity.

3.5. Growth factor adsorption and delivery

The objective of this study was to determine whether SNFs could be used as a biomaterial for the delivery of bioactive molecules in addition to their demonstrated Si-HPMC hydrogel reinforcement capacity.¹⁷ We were thus interested in their TGF- β 1 and GDF-5 adsorption/release potential.

SNFs were incubated with the growth factors at $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ and $4\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ for 48 h at pH 7, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Release experiments were then performed in PBS/BSA 1%, at pH 7.2, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Growth factor assays of the supernatant after 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 1 day, 2 d, 3 d, 7 d, 14 d and 21 d release were performed as described in the Experimental section. Adsorption of both

Table 1 Lysozyme enzymatic activity after 20 days of release lysozyme enzymatic activity was detected by a micrococcus lysodeikticus degradation test, as described in the Experimental section. All samples tested were supernatants from 20 days released lysozyme from SNFs, at 37 °C. Controls were incubated at 37 °C except for those annotated * were prepared extemporaneously

Samples	Enzymatic activity
Supernatant (SNFs prepared at 1 and 2.5 mg mL ⁻¹)	—
Supernatant (SNFs prepared at 5 to 100 mg mL ⁻¹)	+
Controls	
Inactivated lysozyme*	—
PBS*	—
Lysozyme*	+
Silica nanofibers	—
Control lysozyme	+

growth factors reached 100% as we were not able to detect them in the supernatants collected after adsorption (data not shown). Release profiles of TGF- β 1 and GDF-5 are presented in Fig. 7A and B, respectively.

Unlike what we observed with the lysozyme loaded SNFs, no burst effect could be detected within the first hours of release. The release rate decreased continuously during the 21 days whatever the initial amount of growth factor adsorbed onto the SNFs. Nevertheless, for TGF- β 1, we observed a significantly higher release with the SNFs loaded with the highest amount of growth factors (4 μ g mL⁻¹).

In parallel, the Si-HPMC/growth factor loaded-SNF hydrogel was prepared as previously described¹⁷ and deposited in a 12-well plate. Cross-linking was allowed for 3 h at 37 °C and 1 mL of PBS/BSA 1% was added on the top of the hydrogel and the release was performed as described in the Experimental section. The results are presented in Fig. 8. Interestingly we observed that the Si-HPMC/growth factor loaded-SNF hydrogel led to a delayed release which lasted for 28 days.

It has been shown that Smad 1/5/8 and Smad 2/3, intracellular signaling proteins, are the main effectors activated upon GDF-5 and TGF- β 1 stimulation.²⁴ Indeed, as the members

of the TGF- β superfamily, GDF-5 and TGF- β 1 exert their biological effects *via* binding to two types of serine/threonine kinase receptors (type-I and type-II). Upon ligand binding, a tetrameric complex is formed, consisting of two type-I and two type-II receptors inducing phosphorylation of the cytoplasmic domain of the type-I receptor. Type-I receptor activation in turns activates an intracellular signaling cascade which culminates in the phosphorylation and nuclear translocation of Smad proteins. Following their nuclear translocation, Smads stimulate gene transcription and induce cell differentiation.³⁶ Herein, we were able to demonstrate the phosphorylation of both Smad 1/5/8 and Smad 2/3 after stimulation with 28-day released GDF-5 and TGF- β 1, respectively (Fig. 8C and D).

4. Discussion

The rod-shaped SNFs produced in this study were synthesized following previously published results by Rambaud *et al.*¹⁶ and presented the expected results in terms of dimensions, pore size or specific surface. We also evidenced the presence of the expected hexagonally ordered pore network as well as the helical internal structure. A schematic representation of the SNFs is shown in Fig. 1D.

Colloidal mesoporous silicas are very suitable materials for protein adsorption.^{37–39} It has been demonstrated that lysozyme can be adsorbed indiscriminately onto some mesoporous silica surface or inside the pores when the size of the protein is adapted.^{8,37,40,41} Regarding SNFs, it is expected that lysozyme would be only adsorbed on the external surface of the rod as the pore size is far below the dimensions of the lysozyme (3 $\times$ 3 $\times$ 4.5 nm).^{40–42}

It is also well known that lysozyme adsorption onto mesoporous silica is strongly influenced by the ionization of both the protein and the material. Lysozyme is positively charged when the pH is below 10,⁴³ while SNFs present an IEP of $\sim$ 3 and are negatively charged for pH higher than 3.⁴⁴ On one hand, for some silicas, it is described that when the pH increases above 7,

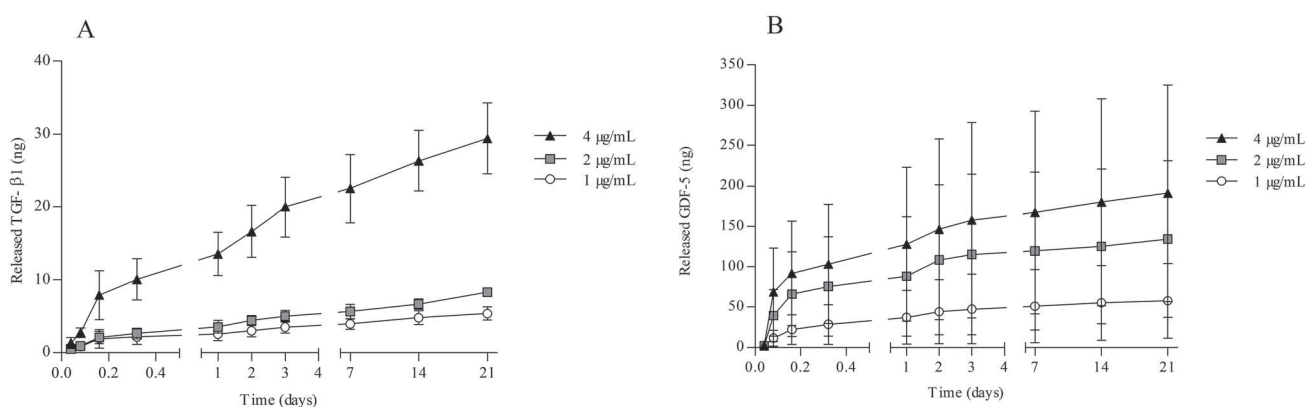


Fig. 7 Cumulative release profiles of TGF- β 1 and GDF-5 adsorbed onto the SNFs. Results are expressed as the cumulative released amount of (A) TGF- β 1 and (B) GDF-5. SNFs were incubated with the growth factors for 48 h at pH 7, 4 °C then release experiments were performed in PBS/BSA 1%, at pH 7.2 and 37 °C. Growth factors assays of the supernatant after 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 1 day, 2 days, 3 days, 7 days, 14 days and 21 days release were performed as described in the Experimental section.

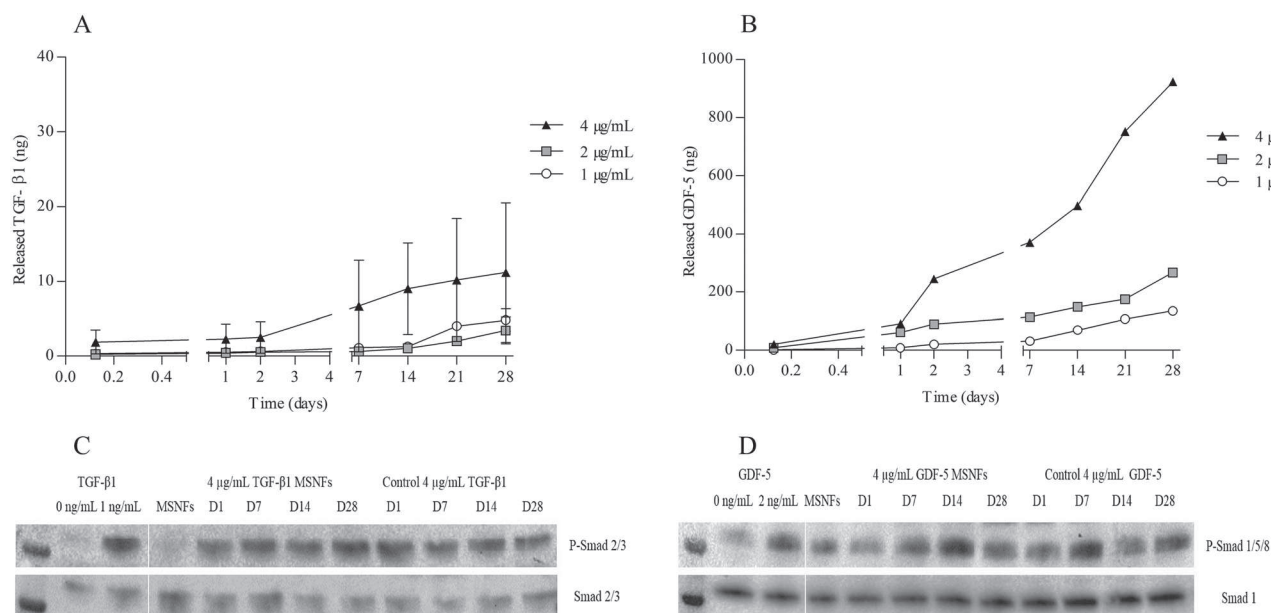


Fig. 8 (A) TGF- β 1 and (B) GDF-5 release from SNFs associated with Si-HPMC and (C and D) their bioactivity after release. Si-HPMC/SNFs association was prepared and deposited in a 12-well plate. Controls were also prepared with Si-HPMC loaded with growth factors without SNFs (data not shown). Cross-linking was performed as described in the Experimental section and the release was performed at 37 °C under mild stirring for 28 days. The bioactivity experimentations were performed using the supernatant obtained from the release as described in the Experimental section and fresh TGF- β 1 or GDF-5 at concentrations ranging one of the supernatants were used as positive controls. Negative controls were obtained using either supernatant from SNF/Si-HPMC association or PBS/BSA 1%.

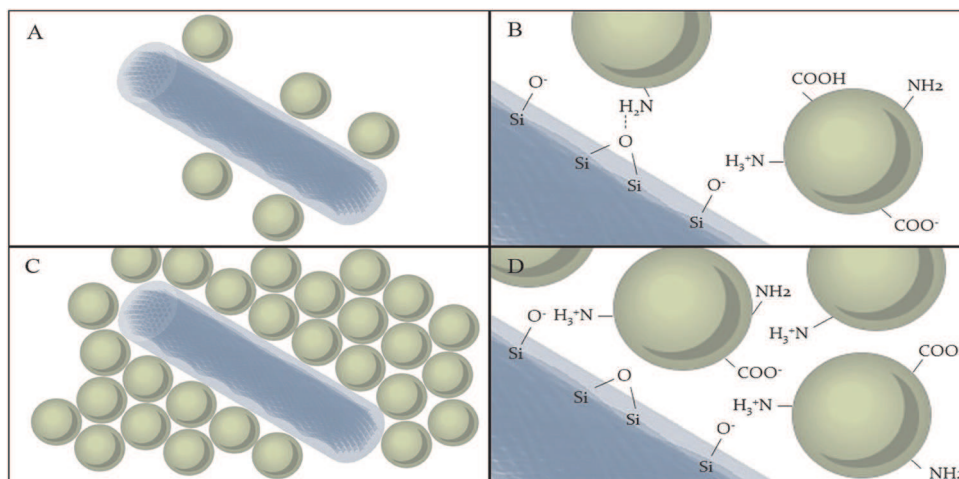
there is a decrease in the adsorbed amount of lysozyme: the protein carries less positive charge and would be less able to create electrostatic interactions with the silica surface.^{43,45} On the other hand, several studies described an increase of the adsorbed amount of lysozyme as the pH becomes closer to its IEP: conversely, at low pH, lysozyme is highly charged, implying an increase in electrostatic repulsions between the molecules and thus, a low adsorbed amount onto the given silica surface.^{37,38,42,46,47} When the pH becomes close to the lysozyme IEP, the overall charge of the protein is approximately zero and there is a small electrostatic repulsion between neighboring proteins.⁴⁶ In this context, lysozyme adsorption appears to be dominated by hydrophobic interactions and by the ability of both entities to form dipoles.³⁸ In addition, ionic strength of the medium is of particular importance: through a charge screening effect, the addition of electrolytes in the medium tends to suppress not only the electrostatic repulsion between lysozyme molecules, but also the electrostatic attraction between the protein and the mesoporous silica, thereby reducing the adsorbed amount of lysozyme on mesoporous silica particles.⁴⁴ When pH becomes closer to the IEP of the lysozyme, we evidenced an increase in the adsorbed amount of lysozyme onto mesoporous silica rod shape particles (SNFs), when the ionic strength of the medium decreases, in accordance with the hypothesis found in the literature.^{38,42,46,47}

Nevertheless, when measuring the zeta potential of the SNFs and the lysozyme in PBS, we determined that the IEP was reached at pH 4 and 10, respectively. Thus, at pH 10 SNFs are negatively charged, while lysozyme would have a net charge close to zero (titration of acidic and basic residues by Propka

software gave +3.6 $k_B T/e$ at pH 10). Moreover, and as described in the literature,^{48,49} we observed a decrease in the absolute value of the zeta potential of lysozyme when increasing the ionic strength of the medium from 10^{-3} M to 10^{-1} M. Indeed, at high ionic strength the Debye length is reduced and the electrostatic interactions are weakened.³⁴ At last, the significant shift towards a higher pH value that can be observed for the SNF IEP after the adsorption of lysozyme reveals non-electrostatic specific interactions between the protein and the silica surface. Taken altogether and under our adsorption conditions (pH 10, 10^{-2} M NaCl or 3×10^{-2} M PBS, 4 °C), these data support the hypothesis that interactions between the lysozyme and the SNFs would be mostly driven by hydrogen bonds and/or hydrophobic interaction, since electrostatic attraction could occur only with localized positive charges under these conditions (Scheme 1). This hypothesis is further supported by the work of Patwardhan *et al.* who described the creation of hydrogen bonds between mesoporous silica and protein in PBS at pH 7.5 when the latter had a low IEP of around 6–8.⁵⁰ Molecular simulation could provide clues for the identification of the functional groups involved in the hydrogen bonding between the silica and the protein.^{51,52}

The results of our experiments also showed that the incubation time was an important factor in the adsorption phenomenon of the lysozyme on SNFs. At pH 7 and 10, maximal adsorption was reached after 48 h, in agreement with the literature, where the time needed to reach the equilibrium usually ranges from few hours to several days.^{38,40,46}

Finally, we demonstrated that for concentrations ranging from 1 mg mL⁻¹ to 10 mg mL⁻¹, the adsorption efficiency was



Scheme 1 Schematic representation of the protein–silica interactions during lysozyme adsorption onto SNFs. At pH 10 for concentrations below 10 mg mL^{-1} (A and B), protein–silica interactions are mostly driven by hydrogen bonds while for concentrations above 10 mg mL^{-1} (C and D), local electrostatic interactions could be involved. For clarity lysozyme molecules (green) are drawn ten times larger than reality. SNFs are represented in blue.

close to 100% and decreased until 20% for higher concentrations. This would suggest (Scheme 1) the existence of single up to multilayer lysozyme adsorption where a first layer would be created representing an adsorption ratio of 200 mg lysozyme per g SNFs and a multilayer would then be added leading to a maximal ratio of 880 mg lysozyme per g SNFs. These results are in perfect accordance with the work of Sand *et al.* where a maximal adsorption of 900 mg lysozyme per g mesoporous silica was found.⁵³

To further analyze the lysozyme adsorption phenomenon, several physical tools were then used. While TEM data indicated that adsorbed lysozyme adopted a spherical conformation at low concentration, the EELS analysis demonstrated that, at high concentration the organic shell C/N/O ratio was the signature of lysozyme. In the IR spectra, a shift of the amide II stretching vibrational band was observed from 1531 cm^{-1} to approximately 1544 cm^{-1} for free and adsorbed lysozyme, respectively. This shift, associated with the presence of a well-defined vibrational band, indicated the presence of a strong interaction between lysozyme and SNFs. This spectral behavior of the amide II band shows probable H-bond interactions between the amide and the SNF surface. This vibrational band was less impacted by the presence of water in the sample and was thus chosen for additional analysis. The amide II band areas of SNFs prepared at different initial concentrations were calculated and we were able to demonstrate a relationship with the measured adsorbed amount of lysozyme on the SNFs. Altogether, these data suggested the existence of two-part adsorption mechanisms. Lysozyme adsorption should be mostly driven by hydrogen bonds between the amide II of the protein and the silica for the adsorbed amount lower or equivalent to 3 mg lysozyme per 25 mg SNFs (equivalent to 120 mg lysozyme per g SNFs). Higher lysozyme adsorbed amounts might be under the control of the localized electrostatic interactions between the charged functional groups of the lysozyme.

As described before, thanks to the lysozyme–SNF interaction characterization, we hypothesized that, when in contact with

SNFs, lysozyme would first be adsorbed strongly, creating a protein monolayer. Then, additional layers would be stacked onto the monolayer. In order to confirm this hypothesis, we performed release experiments with SNFs prepared at different initial concentrations of lysozyme. The released amount of lysozyme was assayed and its enzymatic activity was tested as described in the Experimental section.

At the two lowest concentrations (1 and 2.5 mg mL^{-1}), neither lysozyme release nor enzymatic activity could be detected. The absence of the detected enzymatic activity was related to the absence of the release of lysozyme. These results would be in favor of the existence of a monolayer, strongly linked to the SNFs, which cannot be removed. Moreover, thermogravimetric analysis coupled with mass spectrometry experiments under an air flow (data not shown) confirmed that lysozyme was still adsorbed onto SNFs.

Additionally, our data have undoubtedly shown that the release kinetics was strongly dependent on the initial amount of adsorbed lysozyme and allows sustained release for 20 days. Previous studies demonstrated similar or even faster release kinetics of protein adsorbed on mesoporous silica.^{10,54,55}

Finally, we studied the adsorption/release of two nucleopulmonary differentiating growth factors, TGF- β 1 and GDF-5. The adsorbed amounts were significantly lower than the one used for lysozyme as stated in a former work where the optimal conditions for human adipose stromal cell differentiation towards NP cells were investigated.²⁴ According to previous experiments with lysozyme, we expected to observe no release. Interestingly, we could demonstrate that these growth factors were released for 21 days and for up to 28 days when associated with a polymeric scaffold *e.g.* the Si-HPMC hydrogel. According to the obtained curves, we can hypothesize that this release would probably continue even after 28 days. Moreover, while for TGF- β 1 we obtained similar final released quantities with or without Si-HPMC (16 and 29 ng respectively), these quantities were significantly different for GDF-5 (924 and 190 ng respectively).

This difference could be explained by the fact that GDF-5 degrades rapidly at 37 °C. When released in PBS/BSA 1%, week assays may underestimate the real released amount of GDF-5 while, when released inside the Si-HPMC hydrogel, the GDF-5 assays highlight a stronger release that could be related to the protection of GDF-5 inside the hydrogel. Moreover, released GDF-5 and TGF- β , when used to stimulate cells in culture, were able to activate intracellular signaling cascades as evidenced by the phosphorylation of Smad proteins. Thus, by showing the ability of the released growth factors to induce the phosphorylation of the Smad 1/5/8 and Smad 2/3 pathways, we demonstrated their biological activity maintenance for up to 28 commitment days under our working conditions. This is of particular interest as it has already been shown that while 21 days can be sufficient for the differentiation of human adipose stromal cells towards NP cells, at 28 days, differentiated cells produced an aggrecan and a type II collagen-rich extracellular matrix comparable with that of the native NPs.²⁴

5. Conclusions

Herein, the data demonstrate the protein adsorption/release capacity of SNFs. It is also demonstrated that the protein-SNF interactions are mainly driven by hydrogen bonds and local electrostatic interactions. The present data thus provide a better understanding of the adsorption phenomenon involved, as well as a method to control protein adsorption and release. The maintenance of the biological activity of the released protein from SNFs at any time point is also shown. Moreover, the adsorption/release of two growth factors, TGF- β 1 and GDF-5, was studied and a sustained delivery was obtained. It is worth pointing out that the kinetic release of growth factors, up to 28 days, and their biological activity maintenance, seems to be compatible with a previously described hASC differentiation protocol towards NP cells.²⁴

These data suggest that SNFs may be a promising candidate for the development of an innovative bioactive drug delivery system. Further experiments are now in progress to determine whether growth factor loaded-SNFs associated with the Si-HPMC hydrogel could be a suitable system for an all-in-one IVD regenerative medicine.

Acknowledgements

The authors would like to thank Nicolas Stephant, Paul Pilet and Françoise Lary for their contributions. This work was supported by the Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée (FARMA "Etude ET3-683"), the région Pays de la Loire (Projet Longévité, Mobilité Autonomie and NanoFar+), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR générique REMEDIV) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM Projet DBS20131128442).

Notes and references

- Q. Liu, J. Zhang, W. Sun, Q. R. Xie, W. Xia and H. Gu, *Int. J. Nanomed.*, 2012, 7, 999–1013.

- J. Lu, M. Liong, Z. Li, J. I. Zink and F. Tamanoi, *Small*, 2010, 6, 1794–1805.
- X. Wu, M. Wu and J. X. Zhao, *Nanomedicine*, 2013, 10, 297–312.
- M. a. Abakumov, N. V. Nukolova, M. Sokolsky-Papkov, S. a. Shein, T. O. Sandalova, H. Vishwasrao, N. F. Grinenko, I. L. Gubsky, A. M. Abakumov, A. V. Kabanov and V. P. Chekhonin, *Nanomedicine*, 2015, 11, 825–833.
- C. Penna, M. G. Perrelli, J. P. Karam, C. Angotti, C. Muscari, C. N. Montero-Menei and P. Pagliaro, *J. Cell. Mol. Med.*, 2013, 17, 192–204.
- A. Mohandas, B. S. Anisha, K. P. Chennazhi and R. Jayakumar, *Colloids Surf., B*, 2015, 127, 105–113.
- M. Vallet-Regi and F. Balas, *Open Biomed. Eng. J.*, 2008, 2, 1–9.
- I. Izquierdo-Barba, M. Colilla and M. Vallet-Regi, *J. Nanomater.*, 2008, 2008, 14.
- N. Knežević and J. Durand, *Nanoscale*, 2015, 7, 2199–2209.
- A. L. Doadrio, E. M. Sousa, J. C. Doadrio, J. Perez Pariente, I. Izquierdo-Barba and M. Vallet-Regi, *J. Controlled Release*, 2004, 97, 125–132.
- I. Izquierdo-Barba, A. Martinez, A. L. Doadrio, J. Perez-Pariente and M. Vallet-Regi, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005, 26, 365–373.
- M. Vallet-Regi, F. Balas and D. Arcos, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2007, 46, 7548–7558.
- Q. He and J. Shi, *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 5845–5855.
- F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell and M. Froba, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 3216–3251.
- H. Zhang, D. R. Dunphy, X. Jiang, H. Meng, B. Sun, D. Tarn, M. Xue, X. Wang, S. Lin, Z. Ji, R. Li, F. L. Garcia, J. Yang, M. L. Kirk, T. Xia, J. I. Zink, A. Nel and C. J. Brinker, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 15790–15804.
- F. Rambaud, K. Vallé, S. Thibaud and C. Sanchez, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, 19, 2896–2905.
- N. Buchtova, G. Rethore, C. Boyer, J. Guicheux, F. Rambaud, K. Valle, P. Belleville, C. Sanchez, O. Chauvet, P. Weiss and J. Le Bideau, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2013, 24, 1875–1884.
- N. Henry, P. Colombier, L. Lescaudron, O. Hamel, J. Le Bideau, J. Guicheux and J. Clouet, *Med. Sci.*, 2014, 30, 1091–1100.
- B. R. Whatley and X. Wen, *Mater. Sci. Eng., C*, 2012, 32, 61–77.
- S. B. G. Blanquer, D. W. Grijpma and a. a. Poot, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2014, 84, 172–187.
- X. Bourges, P. Weiss, G. Daculsi and G. Legeay, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2002, 99, 215–228.
- E. Mathieu, G. Lamirault, C. Toquet, P. Lhomme, E. Rederstorff, S. Sourice, K. Biteau, P. Hulin, V. Forest, P. Weiss, J. Guicheux and P. Lemarchand, *PLoS One*, 2012, 7, e51991.
- J. C. Iatridis, S. B. Nicoll, A. J. Michalek, B. A. Walter and M. S. Gupta, *Spine J.*, 2013, 13, 243–262.
- P. Colombier, J. Clouet, C. Boyer, M. Ruel, G. Bonin, J. Lesoeur, A. Moreau, B. H. Fellah, P. Weiss, L. Lescaudron, A. Camus and J. Guicheux, *Stem Cells*, 2016, 34, 653–667.
- M. S. Bhattacharyya, P. Hiwale, M. Piras, L. Medda, D. Steri, M. Piludu, A. Salis and M. Monduzzi, *J. Phys. Chem. C*, 2010, 114, 19928–19934.
- G. Ghosh, L. Panicker and K. C. Barick, *Colloids Surf., B*, 2014, 118, 1–6.

- 27 M. Minier, M. Salmain, N. Yacoubi, L. Barbes, C. Mthivier, S. Zanna and C. Pradier, *Langmuir*, 2005, **21**, 5957–5965.
- 28 M. Piras, A. Salis, M. Piludu, D. Steri and M. Monduzzi, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7338–7340.
- 29 W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, *J. Mol. Graphics*, 1996, **14**, 33–38, 27–8.
- 30 T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon and N. A. Baker, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, W665–W667.
- 31 T. J. Dolinsky, P. Czodrowski, H. Li, J. E. Nielsen, J. H. Jensen, G. Klebe and N. A. Baker, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, W522–W525.
- 32 M. Kiristi, V. V. Singh, B. Esteban-Fernández de Ávila, M. Uygun, F. Soto, D. Aktaş Uygun and J. Wang, *ACS Nano*, 2015, **9**, 9252–9259.
- 33 L. Medda, M. F. Casula, M. Monduzzi and A. Salis, *Langmuir*, 2014, **30**, 12996–13004.
- 34 D. Steri, M. Monduzzi and A. Salis, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2013, **170**, 164–172.
- 35 F. Quilès, C. Nguyen-Trung, C. Carteret and B. Humbert, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 2811–2823.
- 36 K. Miyazono, *Bone*, 1999, **25**, 91–93.
- 37 S. Hudson, J. Cooney and E. Magner, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 8582–8594.
- 38 S. T. Moerz and P. Huber, *Langmuir*, 2014, **30**, 2729–2737.
- 39 A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz and H. Car, *Pharmacol. Rep.*, 2012, **64**, 1020–1037.
- 40 J. Liu, C. Li, Q. Yang, J. Yang and C. Li, *Langmuir*, 2007, **23**, 7255–7262.
- 41 D. M. Schlipf, S. E. Rankin and B. L. Knutson, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, **5**, 10111–10117.
- 42 A. Vinu, V. Murugesan and M. Hartmann, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 7323–7330.
- 43 H. Lei, M. Wang, Z. Tang, Y. Luan, W. Liu, B. Song and H. Chen, *Langmuir*, 2014, **30**, 501–508.
- 44 B. Bharti, J. Meissner, S. H. L. Klapp and G. H. Findenegg, *Soft Matter*, 2014, **10**, 718–728.
- 45 O. Moradi, H. Modarress and M. Norouzi, *Iran. Polym. J.*, 2003, **12**, 477–484.
- 46 B. Bharti, J. Meissner and G. H. Findenegg, *Langmuir*, 2011, **27**, 9823–9833.
- 47 S. Kumar, V. K. Aswal and P. Callow, *Langmuir*, 2014, **30**, 1588–1598.
- 48 P. McFadyen and D. Fairhurst, *Proc. Br. Ceram. Soc.*, 1993, **51**, 175–185.
- 49 J. Kim and D. F. Lawler, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2005, **26**, 1083–1089.
- 50 S. V. Patwardhan, F. S. Emami, R. J. Berry, S. E. Jones, R. R. Naik, O. Deschaume, H. Heinz and C. C. Perry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 6244–6256.
- 51 K. Kubiak-Ossowska, B. Jachimska and P. a. Mulheran, *J. Phys. Chem. B*, 2016, **120**, 10463–10468.
- 52 N. Hildebrand, S. Köppen, L. Derr, K. Li, M. Koleini, K. Rezwani and L. Colombi Ciacchi, *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**, 7295–7307.
- 53 L.-C. Sang, A. Vinu and M.-O. Coppens, *Langmuir*, 2011, **27**, 13828–13837.
- 54 T. Tamanna, J. B. Bulitta and A. Yu, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2015, **26**, 117.
- 55 S. B. Park, Y.-H. Joo, H. Kim, W. Ryu and Y. Park, *Mater. Sci. Eng., C*, 2015, **50**, 64–73.

2. Discussion

Les résultats de ces travaux ont montré les interactions en jeux lors de l'adsorption de protéines sur des nanofibres de silice. De plus, la pertinence d'utilisation des SNFs en tant que biomatériau pour la libération prolongée de facteurs de croissance, pendant 28 jours, tout en maintenant leur activité biologique *in vitro* a été démontrée.

Les SNFs synthétisées ont été caractérisées à l'aide de différentes méthodes de microscopie électronique à balayage et transmission (MEB et MET) ainsi qu'en diffraction des rayons X. Ces analyses ont mis en évidence des propriétés proches de celles précédemment décrites dans la littérature³¹⁶ (facteur de forme ≈ 10 , organisation hexagonale du réseau poreux), telles que rassemblées sur une représentation 3D schématique de ces fibres de silice. La taille des pores ($2,1 \pm 0,1$ nm) et la mésoporosité des SNFs (1110 ± 162 m²/g) correspondent aux caractéristiques des nanoparticules de silice classiquement décrites dans la littérature^{309,322}. Ces nanoparticules mésoporeuses ont notamment été étudiées quant à leur possible utilisation pour la libération de molécules. Ces mêmes études ont permis de mettre en lumière la nécessité de travailler avec des tailles de pores supérieures à la taille de la molécule d'intérêt pour pouvoir exploiter l'intérieur du réseau poreux^{311,323,324}. Dans notre cas, la taille des pores des SNFs est plus petite que le lysozyme ($3 \times 3 \times 4,5$ nm)^{310,325} et les facteurs de croissance. Bien que la possibilité de modifier la taille des pores ait été décrite dans la littérature³²⁶⁻³²⁸, la synthèse des SNFs est un procédé sensible et nous avons préféré orienter notre étude sur la recherche des conditions optimales pour l'adsorption et la libération des protéines. En conséquence, l'adsorption des molécules ne devrait intervenir qu'en surface des SNFs et nous nous sommes donc intéressés à l'influence du pH du milieu et de la force ionique. En effet, les SNFs possèdent un point isoélectrique (PI) proche de 3³²⁹ et sont donc ionisées négativement pour les pH supérieurs à 3. Le lysozyme possède lui un PI proche de 10³³⁰ et est donc ionisé positivement pour des valeurs pH inférieures. Bien que certaines études aient décrit que les interactions permettant l'adsorption des protéines en surface de nanoparticules de silice sont majoritairement guidées par les forces électrostatiques^{330,331}, d'autres à l'opposé, ont montré que l'adsorption devient maximale lorsque le pH est

proche du point isoélectrique de la molécule étudiée³³²⁻³³⁶. Ainsi, lors de l'étude de l'adsorption du lysozyme à différent pH, nos résultats ont ainsi montré une adsorption maximale à pH 10. L'hypothèse est qu'à ce pH, la charge globale de la protéine est proche de zéro et les répulsions électrostatiques sont alors limitées permettant l'adsorption d'une plus grande quantité de protéine. L'adsorption serait alors dominée par des interactions hydrophobes. De manière intéressante, la modélisation de l'état de charge en surface du lysozyme à pH 10 met en évidence la présence de zones chargées négativement et positivement. Ces charges permettent ainsi d'envisager l'existence d'interactions électrostatiques locales entre les molécules de lysozyme ou du lysozyme avec les SNFs. Dans ces conditions, la force ionique du milieu est d'une importance majeure. En effet, la présence d'électrolytes dans le milieu tend à écranter les charges de surface et limite ainsi les interactions électrostatiques. Afin de limiter cet effet, nous avons travaillé à faible force ionique lors de l'étape d'adsorption du lysozyme et des facteurs de croissance. Les résultats de l'étude de l'évolution du potentiel zêta à différent pH pour les SNFs chargées en lysozyme montre un décalage du PI vers des valeurs plus élevées, suggérant ainsi à nouveau l'existence d'interactions autres que les interactions électrostatiques.

Pour continuer l'étude des interactions protéine/silice, plusieurs analyses ont été réalisées notamment en infrarouge. Les résultats ont mis en évidence un décalage de la bande vibratoire en élongation de l'amide II de 1531 cm^{-1} à environ 1544 cm^{-1} pour le lysozyme libre et le lysozyme adsorbé en surface des SNFs, respectivement. Ce décalage, associé à la présence d'une bande vibratoire bien définie, suggère l'existence d'interactions fortes entre le lysozyme et les SNFs, telles que des liaisons hydrogènes. L'étude de l'aire de la bande vibrationnelle de l'amide II du lysozyme en fonction de la quantité adsorbée a montré l'existence probable de deux mécanismes d'adsorption consécutifs. Cette adsorption serait dans un premier temps guidée par la création de liaisons hydrogènes entre l'amide II de la protéine et les groupements -OH en surface des SNFs, jusqu'à atteindre un recouvrement total des SNFs ($\approx 120\text{ mg}$ de lysozyme / g de SNFs). Par la suite, le lysozyme toujours en solution créerait des interactions électrostatiques locales permettant l'accumulation de la protéine en multicouches.

Au cours de cette première partie de l'étude, nous avons pu confirmer l'hypothèse de la formation d'une première couche de lysozyme fortement liée aux SNFs, suivie par l'accumulation de lysozyme et la formation de multicouches plus faiblement liées.

Au cours des expérimentations de mise au point des conditions optimales pour l'adsorption de protéine en surface des SNFs, plusieurs concentrations de lysozyme ont été utilisées. Nous avons alors pu montrer que pour les concentrations les plus faibles (< 10 mg/mL) l'efficacité d'adsorption atteinte était de 100%, tandis que pour des concentrations supérieures (de 25 à 100 mg/mL), cette efficacité diminuait jusqu'à 20%. Ces résultats suggèrent que la première couche adsorbée correspondrait à un taux d'adsorption de 200 mg de lysozyme / g de SNFs, allant jusqu'à un taux maximal de 880 mg de lysozyme / g de SNFs. De manière intéressante, une précédente étude avait établi un taux d'adsorption maximale de 900 mg de lysozyme / g de silice SBA-15³³⁷. De plus, des observations en MET ont permis d'observer différentes conformations du lysozyme ; sous forme sphérique pour des quantités adsorbées inférieures à la quantité nécessaire pour former une monocouche recouvrant totalement les SNFs, et sous forme de coque organique pour des quantités supérieures. Enfin, l'étude des cinétiques de libération du lysozyme adsorbées sur les SNFs a été réalisée. Aux plus faibles quantités adsorbées, aucune libération de lysozyme n'a pu être détectée, indiquant l'existence d'une monocouche, fortement liée aux SNFs, qui ne serait jamais libérée. Cette hypothèse a été confirmée, lors de l'analyse ces mêmes SNFs chargées en lysozyme, après libération, en ATG-MS sous un flux d'air, par la détection d'un courant d'ion de 44 g/mol, correspondant à la dégradation d'une matière organique. Pour de plus fortes quantités adsorbées, nous avons montré une libération prolongée jusqu'à 20 jours tout en maintenant l'activité biologique du lysozyme libéré. De précédentes études d'adsorption/libération de molécules ont montré des cinétiques de libération plus rapides mais ont également souligné la possibilité de moduler ces vitesses de libération en faisant varier la porosité des nanoparticules ou en les associant à un autre biomatériau^{338,339}.

L'ensemble de ces résultats indique que, dans les conditions de travail choisies (pH = 10, faible force ionique du milieu), l'adsorption du lysozyme en surface des nanofibres de silice est possible grâce à la

création de liaisons hydrogènes et/ou d'interactions hydrophobes majoritairement, impliquant l'amide II de la protéine. Dans un second temps, le lysozyme continuerait à s'accumuler *via* la création d'interactions électrostatiques locales.

Dans la seconde partie de cette étude expérimentale, nous avons démontré la possibilité d'utiliser ces SNFs pour la libération prolongée de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation de cellules souches, vers des cellules présentant un phénotype proche de celui de cellules natives du DIV, le TGF- β 1 et le GDF-5¹⁷⁶. La libération de ces facteurs de croissance, chargés sur les SNFs, a tout d'abord été réalisée en dispersant ces SNFs dans un milieu de libération *in vitro* à 37°C. Dans ces conditions, une libération jusqu'à 21 jours a été observée. Par ailleurs, l'objectif global de cette étude étant de développer un système à libération prolongée pour la médecine régénératrice du DIV, l'association des SNFs chargées en facteurs de croissance à un hydrogel, capable de restaurer l'hydratation du DIV est particulièrement intéressante. Dans ce contexte, nous avons choisi d'utiliser un hydrogel de Si-HPMC au regard de sa biocompatibilité et de sa capacité de réticulation après injection *in situ*. Ainsi, après association des SNFs chargées en facteurs de croissance avec l'hydrogel de HPMC-Si et réticulation à 37°C *in vitro*, une libération des deux facteurs de croissance a été observée jusqu'à 28 jours. De plus, nous avons également pu montrer que le TGF- β 1 et le GDF-5 libérés à 28 jours étaient toujours biologiquement actifs. En effet, les facteurs de croissance libérés ont été utilisés pour la stimulation *in vitro* de hASC, activant ainsi la phosphorylation des voies de signalisation intracellulaires Smad 2/3 et 1/5/8, respectivement. Il est à noter que l'activation de ces voies de signalisation est essentielle pour la différenciation des hASC. En effet, il a été montré que la voie Smad 2/3 est impliquée dans l'engagement précoce des hASC dans la différenciation vers des nucléopulpecytes, tandis que la voie Smad 1/5/8 est requise pour la maturation des hASC en cours de différenciation¹⁷⁶.

Les résultats de cette seconde partie de l'étude sont particulièrement intéressants car ils démontrent la pertinence d'utilisation des SNFs en tant que biomatériau pour la libération de facteurs de croissance dans le cadre de la médecine régénératrice du disque intervertébral. Ces résultats sont à présent à confirmer par l'utilisation du système SNFs/HPMC-Si chargé en GDF-5 et TGF- β , pour la

différenciation *in vitro* et *in vivo* de cellules souches issues du tissu adipeux. Le système développé pourrait également être envisagé pour une injection intradiscale dans le cadre de cas de dégénérescences précoces. Ainsi, la libération *in situ* de ces deux facteurs de croissances, clés dans le développement et le maintien de l'intégrité structurelle du DIV, pourrait permettre une stimulation des cellules résidentes et ainsi un ralentissement des processus dégénératifs, voire une régénération du tissu discal.

II. MICROBILLES DE PULLULANE

1. Rationnel de l'étude

Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de biomatériaux pour la délivrance prolongée de molécules impliquées dans les processus de régénérescence discale, est une stratégie particulièrement attirante. Nous avons ainsi développé un système basé sur l'utilisation de nanoparticules de silice (article III). Ce système, bien que prometteur au regard des résultats obtenus, présente néanmoins des inconvénients. En effet, si leur cytocompatibilité a été démontrée *in vitro* sur deux types cellulaires (hASC et des cellules humaines de chondrosarcome SW1353), les SNFs ne sont pas biodégradables et nous n'avons à ce jour pas d'information sur leur devenir et leur toxicité vis-à-vis des cellules résidentes après injection *in vivo*.

Nous avons donc décidé d'étudier en parallèle des SNFs un second biomatériau présentant des caractéristiques physico-chimiques très différentes. Parmi les nombreux biomatériaux actuellement étudiés, les polysaccharides semblent particulièrement prometteurs. En effet, ce sont des polymères naturels qui présentent de nombreuses qualités intrinsèques telles que, pour certains d'entre eux, la biodégradabilité et la biocompatibilité^{340,341}. De plus, les polysaccharides peuvent être modifiés pour obtenir des propriétés physiques et biologiques adaptées à l'application visée³⁴². Parmi eux, le pullulane est un polysaccharide linéaire largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétique³⁴¹. Il est issu de la fermentation d'amidon par *Aureobasidium pullulans*³⁴³ et constitué d'unités de glucose reliées entre elles par des liaisons α -1,6 et α -1,4^{344,345}. Par ailleurs, en présence d'un agent réticulant, le pullulane est capable de former un réseau tridimensionnel par la création de liaisons phosphate intermoléculaires³⁴⁶. Cette propriété a amené plusieurs équipes à étudier ce matériau en tant que support pour la libération prolongée de molécules, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire vasculaire et osseuse *in vitro*³⁴⁷⁻³⁴⁹.

L'ensemble de ces données fait du pullulane un matériau intéressant pour le développement d'un DDS pour la médecine régénératrice du DIV. Ainsi, des microbilles de pullulane (PMBs) ont été formulées par un procédé d'émulsion/réticulation eau-dans-huile. Les facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5 ont ensuite été imprégnés dans les PMBs et leur libération a été étudiée. Par ailleurs, afin d'éviter une fuite des PMBs

après injection dans le DIV dégénéré^{350,351}, nous avons proposé de les associer avec l'hydrogel de HPMC-Si. Les propriétés mécaniques des PMBs seules et l'impact de l'ajout de ces PMBs sur les propriétés de l'hydrogel de HPMC-Si ont été étudiés. Par la suite, le système "biphasique" (PMBs / HPMC-Si) a été utilisé pour la libération prolongée du TGF- β 1 et du GDF-5. Cette libération pourrait permettre de stimuler les processus régénératif impliquant les cellules résidentes du DIV, pour des cas précoces de dégénérescence discale.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette seconde étude expérimentale a fait l'objet d'un article publié dans le journal Drug Delivery, 2017 ; **24 (1)** : 999–1010 : Article IV - **Pullulan based microbeads for the sustained delivery of growth factors: new insight for intervertebral disc regenerative medicine.**

N. Henry, J. Clouet, A. Fragale, Louise Griveau, P. Weiss, J. Le Bideau, J. Guicheux, C. Le Visage.

ARTICLE IV

Pullulan based microbeads for the sustained delivery of growth factors: new insight for intervertebral disc regenerative medicine.

N. Henry, J. Clouet, A. Fragale, Louise Griveau, P. Weiss, J. Le Bideau, J. Guicheux, C. Le Visage.

Drug Delivery, 2017 ; **24 (1)** : 999–1010

Résumé

La lombalgie discogénique est considérée comme un problème de santé public majeur et il n'existe actuellement pas de traitements étiologiques pour stopper ou inverser le processus dégénératif sous-jacent. Afin de répondre cliniquement aux stades précoces de cette maladie, une attention croissante est portée aux stratégies de stimulation des cellules résidentes du disque intervertébral (DIV) *via* l'injection *in situ* de facteurs de croissance ciblant les processus de dégénérescence discale. Néanmoins, en dépit de résultats encourageants concernant la sécurité d'utilisation et la tolérance clinique de ces facteurs de croissance, leur efficacité doit encore être améliorée. Pour cela, l'utilisation de biomatériaux permettant une libération prolongée, tout en limitant la dégradation des facteurs de croissance, présente un intérêt majeur.

Dans cet article, nous proposons un nouveau système "biphasique" injectable, basé sur l'association de microbilles de pullulane (PMBs) avec un hydrogel d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisé (HPMC-Si), pour la libération de deux facteurs de croissance, le TGF- β 1 et le GDF-5. Pour la première fois, la conception et la caractérisation mécanique des PMBs et du système "biphasique" (PMBs / HPMC-Si) sont présentées. La capacité de ces deux systèmes à délivrer les deux facteurs de croissance a été étudiée et une libération prolongée, jusqu'à 28 jours, a été observée, avec un maintien de l'activité biologique des deux facteurs de croissance. L'ensemble de ces données suggère le potentiel prometteur de ce système "biphasique" pour le développement d'une stratégie innovante pour la médecine régénératrice du DIV.



Pullulan microbeads/Si-HPMC hydrogel injectable system for the sustained delivery of GDF-5 and TGF- β 1: new insight into intervertebral disc regenerative medicine

Nina Henry, Johann Clouet, Audrey Fragale, Louise Griveau, Claire Chédeville, Joëlle Véziers, Pierre Weiss, Jean Le Bideau, Jérôme Guicheux & Catherine Le Visage

To cite this article: Nina Henry, Johann Clouet, Audrey Fragale, Louise Griveau, Claire Chédeville, Joëlle Véziers, Pierre Weiss, Jean Le Bideau, Jérôme Guicheux & Catherine Le Visage (2017) Pullulan microbeads/Si-HPMC hydrogel injectable system for the sustained delivery of GDF-5 and TGF- β 1: new insight into intervertebral disc regenerative medicine, Drug Delivery, 24:1, 999-1010, DOI: [10.1080/10717544.2017.1340362](https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1340362)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10717544.2017.1340362>



© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 23 Jun 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH ARTICLE



Pullulan microbeads/Si-HPMC hydrogel injectable system for the sustained delivery of GDF-5 and TGF- β 1: new insight into intervertebral disc regenerative medicine

Nina Henry^{a,b,c}, Johann Clouet^{a,c,d,e}, Audrey Fragale^{a,c}, Louise Griveau^a, Claire Chédeville^a, Joëlle Véziers^{a,c,f,g}, Pierre Weiss^{c,h}, Jean Le Bideau^b, Jérôme Guicheux^{a,c,g,*} and Catherine Le Visage^{a,c,*}

^aINSERM, UMRS 1229, RMeS “Regenerative Medicine and Skeleton”, Team STEP “Skeletal Physiopathology and Joint Regenerative Medicine”, Nantes, France; ^bInstitut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), Université de Nantes, CNRS, Nantes, France; ^cUFR Odontologie, Université de Nantes, Nantes, France; ^dCHU Nantes, PHU 11 Pharmacie, Pharmacie Centrale, Nantes, France; ^eUFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Université de Nantes, Nantes, France; ^fSC3M platform, UMS INSERM 016/CNRS 3556, SFR François Bonamy, Nantes, France; ^gCHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, France; ^hINSERM, UMRS 1229, RMeS “Regenerative Medicine and Skeleton”, Team REGOS “Regenerative Medicine of Bone Tissues”, Nantes, France

ABSTRACT

Discogenic low back pain is considered a major health concern and no etiological treatments are today available to tackle this disease. To clinically address this issue at early stages, there is a rising interest in the stimulation of local cells by *in situ* injection of growth factors targeting intervertebral disc (IVD) degenerative process. Despite encouraging safety and tolerability results in clinic, growth factors efficacy may be further improved. To this end, the use of a delivery system allowing a sustained release, while protecting growth factors from degradation appears of particular interest. We propose herein the design of a new injectable biphasic system, based on the association of pullulan microbeads (PMBs) into a cellulose-based hydrogel (Si-HPMC), for the TGF- β 1 and GDF-5 growth factors sustained delivery. We present for the first time the design and mechanical characterization of both the PMBs and the called biphasic system (PMBs/Si-HPMC). Their loading and release capacities were also studied and we were able to demonstrate a sustained release of both growth factors, for up to 28 days. Noteworthy, the growth factors biological activity on human cells was maintained. Altogether, these data suggest that this PMBs/Si-HPMC biphasic system may be a promising candidate for the development of an innovative bioactive delivery system for IVD regenerative medicine.

ARTICLE HISTORY

Received 3 May 2017
Revised 31 May 2017
Accepted 6 June 2017

KEYWORDS

Drug delivery; hydrogel;
IVD; microcarriers;
polysaccharide

Introduction

Intervertebral disc (IVD) is a fibrocartilaginous tissue located between each vertebrae, which plays a key role in the spine kinematics allowing trunk movement. Early after birth, this structure, and notably its central part [i.e. the *Nucleus pulposus* (NP)], initiates a degenerative process. This degenerative process is associated with a decrease of the number of resident cells, leading to an alteration of the extracellular matrix homeostasis and the emergence of a fibrosis, leading altogether to impaired IVD biomechanical functions (Colombier et al., 2014). Disc degenerative disease (DDD) is one of the leading cause of low back pain and is considered a major health concern (Manchikanti et al., 2009). Current therapies mainly aim at tackling low back pain using pharmacological treatments or surgical approaches (arthroplasty or spine fusion), notably for the most advanced debilitating DDD cases. Unfortunately, none of these strategies address the etiological cause of the disease. To clinically address this issue and reactivate the biological machinery, regenerative

medicine approaches are considered with deep interest. With respect to the limited clinical translatability of cell-based regenerative medicine approaches, the use of biological factors targeting the degenerative process of IVD has recently been contemplated, notably growth factors able to stimulate NP cells (Whatley & Wen, 2012; Blanquer et al., 2014). In this context, we recently demonstrated the synergistic role of two growth factors, the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and the growth and differentiation factor-5 (GDF-5), in driving the *in vitro* differentiation of human adipose stromal cells (hASC) towards NP cells (Colombier et al., 2016). Interestingly, the culture of hASCs in a media enriched with these growth factors has been shown to induce the production of a specific extracellular matrix, rich in glycosaminoglycans. In addition, recent clinical trials have been conducted to investigate the effectiveness of the intradiscal injection of GDF-5 in patients with early DDD (NCT01124006, NCT00813813, NCT01182337, NCT01158924 on clinicaltrials.gov). Despite promising safety and tolerability, the clinical outcomes need further improvement before GDF-5 may enter the arsenal of

CONTACT Catherine Le Visage  catherine.levisage@inserm.fr  INSERM, UMRS 1229, RMeS “Regenerative Medicine and Skeleton”, Team STEP “Skeletal Physiopathology and Joint Regenerative Medicine”, 1, Place Alexis Ricordeau, 44000 Nantes, France

*These authors contributed equally to this work.

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

routinely available therapeutics. Meanwhile, to improve the clinical efficacy of growth factors in IVD regenerative medicine and properly exploit their nucleopulpopogenic potential, specific biomaterial-assisted drug delivery systems (DDS) allowing a sustained release, while protecting them from degradation, have been considered (Blanquer et al., 2014).

Various biomaterials have been investigated, including polysaccharides, that have raised a particular interest. Polysaccharides are naturally derived polymers obtained from renewable sources such as plants, animals or produced by fungus (e.g. pullulan). In addition to their natural properties such as biodegradability, biocompatibility and nontoxicity (Autissier et al., 2010; Mishra et al., 2011), these polymers can be tuned to gain appropriate biological or physical properties (Monteiro de Paula et al., 2015). Among these polymers, pullulan is a neutral, linear, non-immunogenic polysaccharide produced from starch fermentation by *Aureobasidium pullulans* (Leathers, 2003). It consists of glucose units linked through α -1,6- and α -1,4-glycosidic bonds (Shingel, 2004; Cheng et al., 2011). Pullulan can form a crosslinked network by the formation of intermolecular phosphate bonds (Lack et al., 2007). It has been widely used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries for its functional properties including adhesiveness, film formability and enzymatically mediated degradability (Mishra et al., 2011). Of note, pullulan has also been used for the development of resorbable hydrogel-based drug delivery system (Thébaud et al., 2007; Purnama et al., 2015; Lu et al., 2017).

These converging data are likely to make pullulan a good candidate for the development of a bioactive DDS targeting IVD regenerative process. To allow sustained release of GDF-5 and TGF- β 1, we herein encapsulated these growth factors in injectable pullulan microbeads (PMBs). In addition, to increase the retention of PMBs at the injection site within the degenerated IVD (Bertram et al., 2005; Zeng et al., 2015), we proposed that they could be associated to an injectable viscous solution that will undergo *in situ* crosslinking. To this end, we selected a self-setting hydrogel consisting in silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC) (Bourges et al., 2002) which has already been used *in vivo* notably for cell-based myocardium and cartilage regeneration strategies (Vinatier et al., 2007; Mathieu et al., 2012). The association of PMBs with Si-HPMC hydrogel will be called 'biphasic system', since such systems have been previously so-called in the relevant literature (Shimomura et al., 2014; Koushki et al., 2015; Puppi et al., 2016).

The objective of this work was thus to develop and characterize a biphasic system of PMBs dispersed into Si-HPMC as an injectable hydrogel-based drug delivery system for TGF- β 1 and GDF-5, in order to stimulate cell-mediated IVD regenerative process.

Experimental section

Materials

All chemicals were used as received without any further purification. Dimethyl sulfoxide (DMSO, anhydrous $\geq 99.9\%$), pyridine (anhydrous, 99.8%), dibutyltin dilaurate (95%), Sodium

hydroxide (NaOH $\geq 98\%$, pellets), fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC $\geq 90\%$), Sodium trimetaphosphate (STMP $\geq 95\%$), sodium dodecyl sulfate (SDS $\geq 98.5\%$), potassium chloride (KCl 99.0–100.5%) and potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Ethanol absolute NORMAPUR[®] ($\geq 99.8\%$), sodium chloride (NaCl), sodium dihydrogen phosphate dihydrate (NaH_2PO_4) were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Pullulan (200 000 g/mol) was purchased from Hayashibara Inc. (Okayama, Japan). Seringe SoftJect[®] 3 mL, disposable HSW FINE-JECT[®] needles 18 G (1.2×40 mm), 22 G (0.7×30 mm) and 23 G (0.6×30 mm) were purchased from Henke-Sass, Wolf GmbH (Tuttingen, Germany). Sterican needles (0.60×60 mm) were purchased from B Braun (Melsungen, Germany). Blood Transfusion Sets (ref: VH-22-EGA) were purchased from CareFusion (San Diego, CA).

Pierce BCA[™] Protein Assay Kit, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Ham's F-12 Nutrient Mix (F12), Penicillin/Streptomycin, HEPES 1 M, Gentamicin (50 mg/mL) and phosphate buffer saline (PBS) were purchased from ThermoFisher Scientific (Saint-Aubin, France). Fetal Bovine Serum (FBS, South America origin) was purchased from Dominique Dutscher (Brumath, France). Recombinant human GDF-5 and human TGF- β 1 were obtained from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France).

Pullulan microbeads formulation

FITC-labelled pullulan

A solution of FITC was prepared in anhydrous DMSO (10% w/v). In parallel, 1 g of pullulan was dissolved into 9 mL of anhydrous DMSO in a 15 mL glass tube topped by a septum. Few drops of pyridine, 1 mL of FITC solution and 20 mg of dibutyltin dilaurate were added in a glass tube and the reaction was allowed for 2 h at 95 °C. FITC-pullulan was purified in successive baths of cold 100% ethanol. It was then dissolved into distilled water and the solution was dialyzed at 4 °C for 3 days. Finally, FITC-pullulan was freeze-dried (CRYOTEC PILPA V7.52) and stored protected from light at room temperature until use.

FITC-pullulan solution

Non-labelled pullulan (6 g), combined with FITC-pullulan (10 mg), was dissolved into 20 mL of distilled water and stirred gently upon obtaining a homogeneous, viscous solution. This solution was stored at 4 °C, protected from light and used within the five following days.

Pullulan microbeads (PMBs) formulation

In a 150 mL beaker, 75 mL of rapeseed oil were stirred at room temperature. In parallel, in three different 3 mL syringes, (1) 2.5 g of FITC-pullulan solution, (2) 250 μ L of 10 M NaOH solution and (3) 250 μ L of STMP solution (90% w/v) were measured. Syringes (1) and (2) were connected using a luer-lock and the two solutions were mixed until reaching homogeneity. Syringe (3) was then connected and solutions were mixed vigorously. The resulting mixture was then

injected in the oil phase under stirring at 450 rpm, using an 18 G needle. The water/oil emulsion was then placed at 37 °C, under constant stirring for 1 h 30 to allow crosslinking via the formation of phosphate bond between the STMP and the –OH groups on pullulan chains.

After pullulan crosslinking, PMBs were rinsed in successive baths of homemade phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4), sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and NaCl solution. PMBs were then filtered using a blood transfusion set with a mesh aperture of 200 µm, freeze-dried and stored at room temperature until use.

Microscopy

Before freeze-drying, a sample of each PMBs batch was transferred to a glass slide for direct observation with a fluorescence microscope (DM IL LED Fluo - Leica, Germany). PMBs were also examined under a confocal microscope (Eclipse TE2000-E - Nikon, 94504 Champigny sur Marne, France) using a 488-nm laser and Z-stack images with a 3-µm step were obtained. Scanning Electronic Microscopy (SEM) was carried out using a LEO 1450VP microscope (Zeiss) by detecting secondary electrons at the following settings: 5 keV–13 pA. Samples were previously allowed to slowly dry at room temperature for a week and gold/palladium coated using a Desk III metal coater (Denton).

PMBs characterization

Particle size analysis

A Mastersizer 3000 Laser (Malvern Instruments, UK) was used for particles size analysis. Approximately 30 mg of freeze-dried PMBs were re-hydrated in 5 mL PBS for 1 h. Experiments were performed in PBS and five measurements were done for each sample.

Mechanical compression

Mechanical properties of hydrated FITC-pullulan microbeads were investigated by subjecting them to a compressive force between 2 parallel plates for 30 s, in water at room temperature until reaching a deformation of 25% of their diameter (MicroSquisher®—CellScale Biomaterials Testing, Waterloo, Canada). The force (µN) and the displacement (µm) were measured using a micro-scale test system equipped with an integrated image analysis module. Results are expressed as the force applied versus the recorded displacement. The Young's modulus was calculated according to the manufacturer recommendations and the standard expression: $E = \text{stress/strain} = (F/A)/(\Delta l/l_0)$ where E is the Young's modulus; F is the force applied on a particle; A is the area through which the force is applied; Δl is the displacement and l_0 is the initial diameter of the particle.

Si-HPMC

Silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC) was prepared as previously described (Bourges et al., 2002;

Fatimi et al., 2008). Briefly, HPMC was silanized using 3-glycidioxypropyltrimethoxysilane (GPTMS). Si-HPMC was then dissolved into a basic media, at pH = 12.8 (sol). The gel of Si-HPMC was further obtained by lowering the pH with mixing it (2:1) with an acidic buffer (pH = 3.2). The final hydrogel has a pH of 7.4. For future references, 'Si-HPMC hydrogel precursor' will relate to the mix of the basic viscous solution with the acidic buffer and 'Si-HPMC hydrogel' will relate to the fully cross-linked hydrogel obtained after 10 days at 37 °C.

PMBs/si-HPMC characterization

Freeze-dried PMBs were re-hydrated in PBS for 30 min and dispersed within Si-HPMC hydrogel precursor, in line with a previously described protocol (Buchtova et al., 2013; Henry et al., 2017). These biphasic systems were prepared with PMBs concentrations ranging from 0.3 to 1.6% (w/w).

Gel point

Immediately after mixing, PMBs/Si-HPMC hydrogel precursor was deposited onto a HAAKE MARS rheometer (ThermoFisher, Saint-Aubin, France) plate and gel point was determined using a parallel plate sensor system (PP20 Ti geometry, gap size: $h = 1$ mm, temperature: 37 °C). A 20-step ramp with frequencies from 1 to 7 Hz was applied and G' and G'' were recorded at each step. Gel point was determined by calculating the point at which $\tan \delta = 1$ for each frequencies.

Homogeneity

PMBs, with concentrations ranging from 0.3 to 1.6% (w/w), were dispersed within Si-HPMC hydrogel precursor either immediately after mixing or after 10, 20, or 30 minutes of crosslinking at room temperature. For clarity sake, only results after 30 minutes are presented here. After 10 days of cross-linking at 37 °C in a 12-well plate, top and bottom slices of cross-linked PMBs/Si-HPMC hydrogels, here an after referred as 'biphasic system', were observed with a fluorescence microscope. For all the subsequent experiments, PMBs were incorporated in the hydrogel precursor after 30 min of crosslinking at room temperature.

Injectability

For these experiments, 3 mL syringes containing the PMBs/Si-HPMC hydrogel precursor were connected to a 23 G needle and settled in the texture analyzer TA.HDplus (Texture Technologies, Hamilton, MA). Two milliliters injections were performed using a 500 kg-load cell with a trigger force of 5 g, a speed test of 2 mm/s and the applied force (N) was recorded.

Shear-stress

PMBs/Si-HPMC hydrogel precursor were prepared and deposited into 12-well plates and allowed to crosslink for 10 days at 37 °C. Shear-stress tests were performed on the biphasic system into the 12-well plates, using a HAAKE MARS

rheometer (ThermoFisher, Saint-Aubin, France) and a PP20 Ti geometry covered with sandpaper at 23°C. This sandpaper was changed between each sample. A normal force of 1 N was applied and a 20 minute relaxation period was allowed. First, a frequency ramp was performed and we determined that at 1 Pa, storage modulus G' was not affected by frequencies ranging from 0.01 to 4 Hz (data not shown). Shear stress ranging from 0.1 Pa to 3000 Pa was applied on the samples with a frequency set at 1 Hz. Storage modulus G' and loss modulus G'' , as well as breaking stress, were recorded as a function of stress.

Compression

As for shear-stress experiments, biphasic systems were prepared and allowed to crosslink in 12-well plates for 10 days at 37°C. Nevertheless, for compression experiments, biphasic systems were punched and removed from the 12-well plates. The obtained samples were 12 mm diameter large and 5 mm high. Compression was performed with the texture analyzer TA. HDplus (Texture Technologies, Hamilton, MA), using a 5-kg load cell with a trigger force of 1 g and a speed test of 0.01 mm/s. Run was allowed until complete destruction of the sample. The applied force (N) as a function on the displacement (mm) was recorded. The Young's modulus was calculated as previously described in the mechanical characterization section.

Growth factors loading release and bioactivity maintenance

Growth factors loading

The same amount of freeze-dried PMBs used for preparing 1.6% (w/w) concentrated biphasic system was used for each experimental condition exposed below. PMBs were suspended in 480 μ L of 30 mM phosphate buffer pH 7. Growth factors loading was carried out by adding TGF- β 1 or GDF-5 solution with a final concentration of 1, 2 and 4 μ g/mL and a final volume of 500 μ L. Controls were also performed (growth factor solution without PMBs and PMBs without growth factors). Loading was allowed for 24 h at 4°C under rotary stirring at 24 rpm on a Mini LabRoller™ Dual Format Rotator (Labnet). Suspensions were then centrifuged for 10 min at 5000 rpm. Supernatants were removed and growth factor concentrations were determined using ELISA Duoset® assay kits (RnDSystems - DY240 and DY583 for TGF- β 1 and GDF-5, respectively). The impregnated growth factor amount and actual drug loading was calculated from the difference between initial and supernatant concentrations (data not shown).

In vitro release profiles

Centrifuged growth factor loaded PMBs were resuspended in 500 μ L of 0.20 μ m filtered PBS/BSA 1% (v/w) and stirred for 21 days at 37°C. At selected times, suspensions were centrifuged for 10 minutes at 5000 rpm. Supernatants were collected, replaced by fresh PBS/BSA 1% (v/w) and kept at -80°C for further experiments. Determination of growth

factor concentrations in the supernatant were performed using ELISA Duoset® assay kits (RnDSystems - DY240 and DY583 for TGF- β 1 and GDF-5, respectively).

Release after dispersion into si-HPMC

Growth factor loaded PMBs were used to prepare biphasic systems. Controls were prepared using hydrogels loaded with growth factors without PMBs and PMBs loaded with growth factors without Si-HPMC hydrogels. Crosslinking was allowed for 3 h at 37°C and 1 mL of PBS/BSA 1% (v/w) was added on the top of samples. Plates were then incubated at 37°C on a vibrating platform shakers (Vibramax 100 - Heidolph Instruments GmbH&Co., Schwabach, Germany) for 28 days. At selected times, supernatants were collected, replaced by fresh PBS/BSA 1% (v/w) and kept at -80°C for further experiments. Determination of growth factors concentrations in supernatants were performed using ELISA Duoset® assay kits (RnDSystems - DY240 and DY583 for TGF- β 1 and GDF-5, respectively).

Growth factors bioactivity after release

Mesenchymal stem/stromal cells isolated from human adipose tissue (hASC) were cultured using DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS (Dominique Dutscher), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S) at 37°C, 5% CO₂ as extensively described previously (Merceron et al., 2012; Colombier et al., 2016). Cells were seeded in six-well plates at 10 000 cells/cm² and allowed to proliferate until reaching approximately 80% confluence. They were then serum starved for 24 h using FBS-deprived above-described media before stimulation with released growth factors. Fresh solutions of both growth factors were prepared for control. Supernatants, with TGF- β 1 or GDF-5 concentrations allowing to reach at least 1 ng/mL and 2 ng/mL, respectively, were deposited onto hASC and incubated 1 h at 37°C. The medium was then removed and the plates were frozen with liquid nitrogen. For further western blot experiments, proteins were extracted on ice using a homemade RIPA buffer and assayed using the BCA™ Protein Assay Kit. Protein migration was performed using 4–15% Criterion™ TGX™ precast gels (Bio-Rad), and proteins were transferred onto 0.2 μ m PVDF membranes (Bio-Rad) using the Transblot® Turbo™ transfer system (Bio-Rad). As previously described (Colombier et al., 2016), P-Smad 1/5/8 (antibody 1/1000th ref: 9511 S - Cell Signaling) was analyzed for cells stimulated with GDF-5. P-Smad 2/3 (antibody 1/1000th ref: 3101 S - Cell Signaling) was analyzed for cells stimulated with TGF- β 1. B-actin (antibody 1/1000th ref: A2228 - Sigma Aldrich) was analyzed for cells stimulated with both growth factors. All primary antibodies were revealed using a secondary antibody HRP-coupled (1/2000th ref: 7074 S - Cell signaling) and the SuperSignal™ West Dura substrate (ThermoFisher Scientific) on the ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) and Image Lab software.

Statistics

All experiments were performed with replicate samples from independent conditions ($n=6$ for PMBs mechanical

characterization, $n=3$ for gel point, $n=11$ for injectability, $n=11$ for shear stress analysis and $n=3$ for compression stress analysis, $n=3$ for loading and release). Data are given as the mean of independent replicates, and error bars represent the standard error of the mean. One-way ANOVA was calculated between different conditions, followed by post hoc Dunn's multiple comparison test to determine significant differences ($*p < .05$, $**p < .01$, $***p < .001$). All statistical analyzes were performed using Graphpad software.

Results

Pullulan microbeads formulation

In a context of IVD injectable system, we aim at developing microcarriers that can be implanted through a 23 G needle (internal diameter = $318\text{ }\mu\text{m}$) for growth factors sustained delivery. For this purpose, we optimized a previously described water-in-oil emulsion/crosslinking protocol (Bonnard et al., 2014; Aydogdu et al., 2016) for the formulation of PMBs by varying three parameters one after another. The formulated PMBs were subsequently observed with fluorescence microscopy (Figure 1(A)). We first varied the stirring speed of the oil phase from 250 rpm to 650 rpm. Unlike what we observed at other stirring speed, at 450 rpm no aggregate was detected and the microparticles were spherical. Then, we varied the amount of FITC-pullulan solution dispersed in the oil phase from 0.5 to 5 g. In this case, no aggregate was observed whatever the amount of pullulan dispersed. Nevertheless, PMBs surface frequently presented bumps and hollows, except for formulations with 2.5 g of FITC-pullulan

solution dispersed. After that, the crosslinking temperature influence was studied and formulations were performed at 23°C , 37°C or 50°C . Whereas at 50°C , some bumps were observed on the PMBs, at 23°C and 37°C , spherical particles were obtained with a smooth surface. Consequently, we decided to further work at 37°C . All subsequent experiments were thus performed using these optimal parameters: stirring speed of 450 rpm, 2.5 g of FITC-pullulan solution dispersed in the oil phase, crosslinking at 37°C .

Microscopy

Samples were prepared in the selected above-mentioned conditions. Confocal analysis showed on cross-sections (data not shown) and 3D reconstructions (Figure 1(B)) that dried PMBs were solid, without cavity, with a homogeneously dispersed fluorescence in the microparticles. Finally, scanning electronic microscopy observations demonstrated that PMBs exhibited a smooth surface and that the overall particles population showed an average diameter below $100\text{ }\mu\text{m}$ (Figure 1(C)).

PMBs mechanical characterization

Particle size analysis determined that 90% of the particles population had a diameter inferior to $184\text{ }\mu\text{m}$ (data not shown). We then studied hydrated single beads stiffness using a MicroSquisher[®] (CellScale Biomaterials). The force (μN) and the displacement (μm) were measured using a micro-scale test system and a representative curve obtained

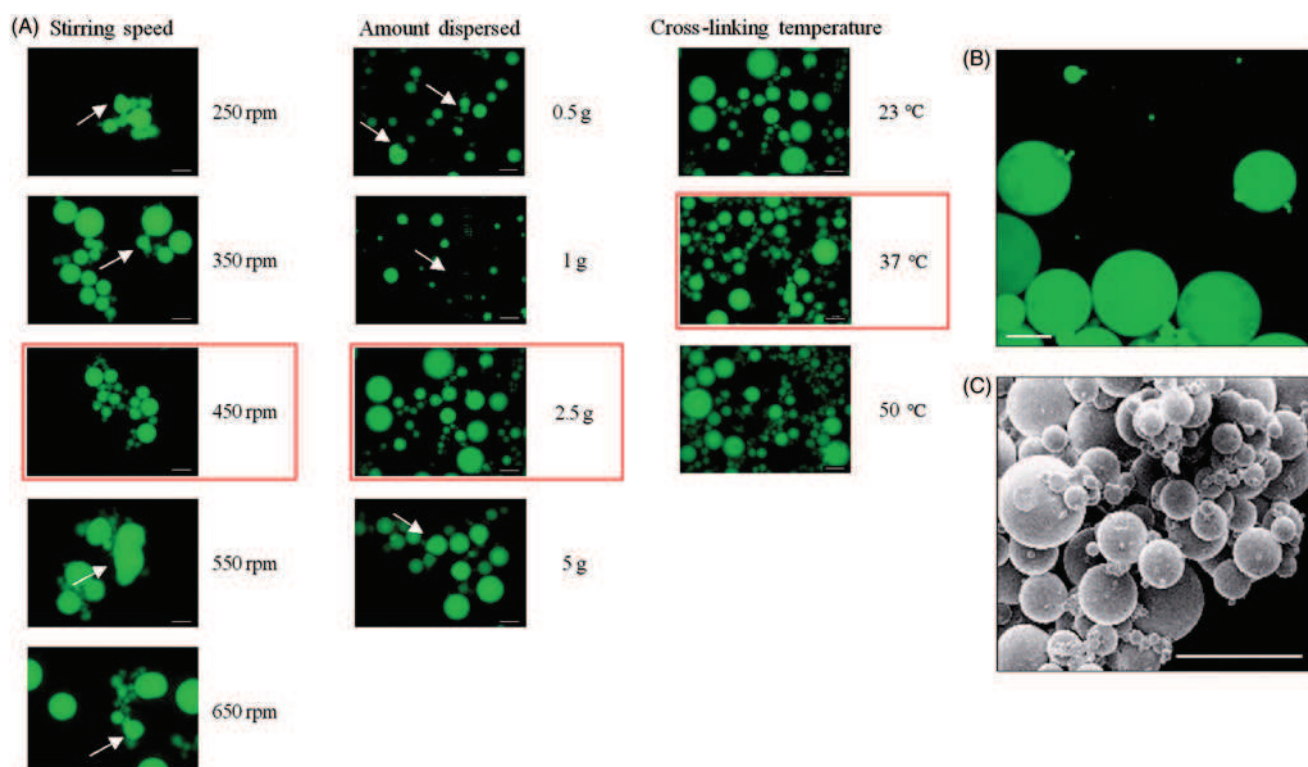


Figure 1. Pullulan microbeads optimization process and microscopy. PMBs observed with fluorescence microscopy. (A) PMBs were formulated according to a water-in-oil emulsion/crosslinking process with varying stirring speed, amount of pullulan solution dispersed in the oil phase and cross-linking temperature. Optimal conditions are highlighted in red; PMBs were then observed using (B) confocal microscopy and (C) Scanning Electronic Microscopy; Scale bar = $100\text{ }\mu\text{m}$.

with a single bead is presented Figure 2. We observed that, during compression, the applied force reached 400 μ N for a final displacement of 40 μ m. This compression phase was followed by a hysteresis loop, characteristic of a viscoelastic response of the material. Based on these data, we calculated a Young's modulus of 57 ± 6 kPa.

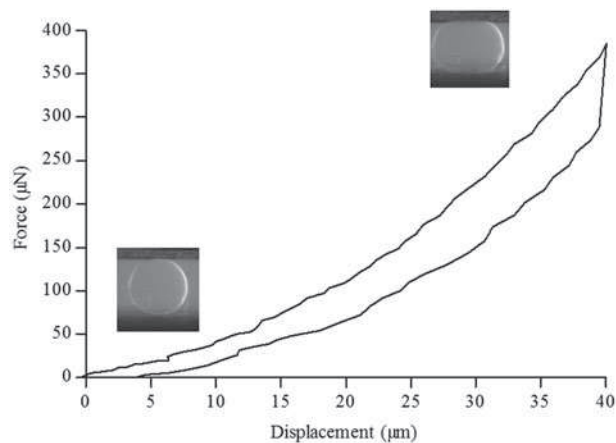


Figure 2. PMBs mechanical characterization. A hydrated single PMB was compressed between two plates using a MicroSquisher[®] (CellScale). Force and displacement were recorded and a representative curve is presented.

PMBs/si-HPMC characterization

Since we aim at injecting PMBs in patients with early degenerated lumbar disc, while avoiding leakage, we hypothesized that PMBs could be dispersed in a hydrogel scaffold which will crosslink *in situ*. We thus mixed PMBs with the Si-HPMC hydrogel precursor and characterized this biphasic system.

We first ensured that Si-HPMC hydrogel precursor was still able to crosslink when supplemented with PMBs at concentrations ranging from 0.3 to 1.6% (w/w) by studying the gel point (Figure 3(A)). G' and G'' were recorded under shear stress with frequencies from 1 to 7 Hz and the gel point was determined for $\tan \delta = 1$ at each frequencies. The results presented in Figure 3(A) showed no significant modification of the time needed to reach the gel point of the Si-HPMC hydrogel precursor, whatever the amount of PMBs added, with a gel point of 8.8 ± 0.4 min and 9.2 ± 1.5 min for Si-HPMC hydrogel precursor alone or with the highest PMBs concentration.

The PMBs/Si-HPMC hydrogel precursor injectability was also studied. Syringes containing the PMBs/Si-HPMC hydrogel precursor were connected to a 23 G needle, injection was performed in the texture analyzer TA. HDplus[®] (Texture Technologies) and the applied force necessary to expel the mixture was recorded. Figure 3(B) shows a significant

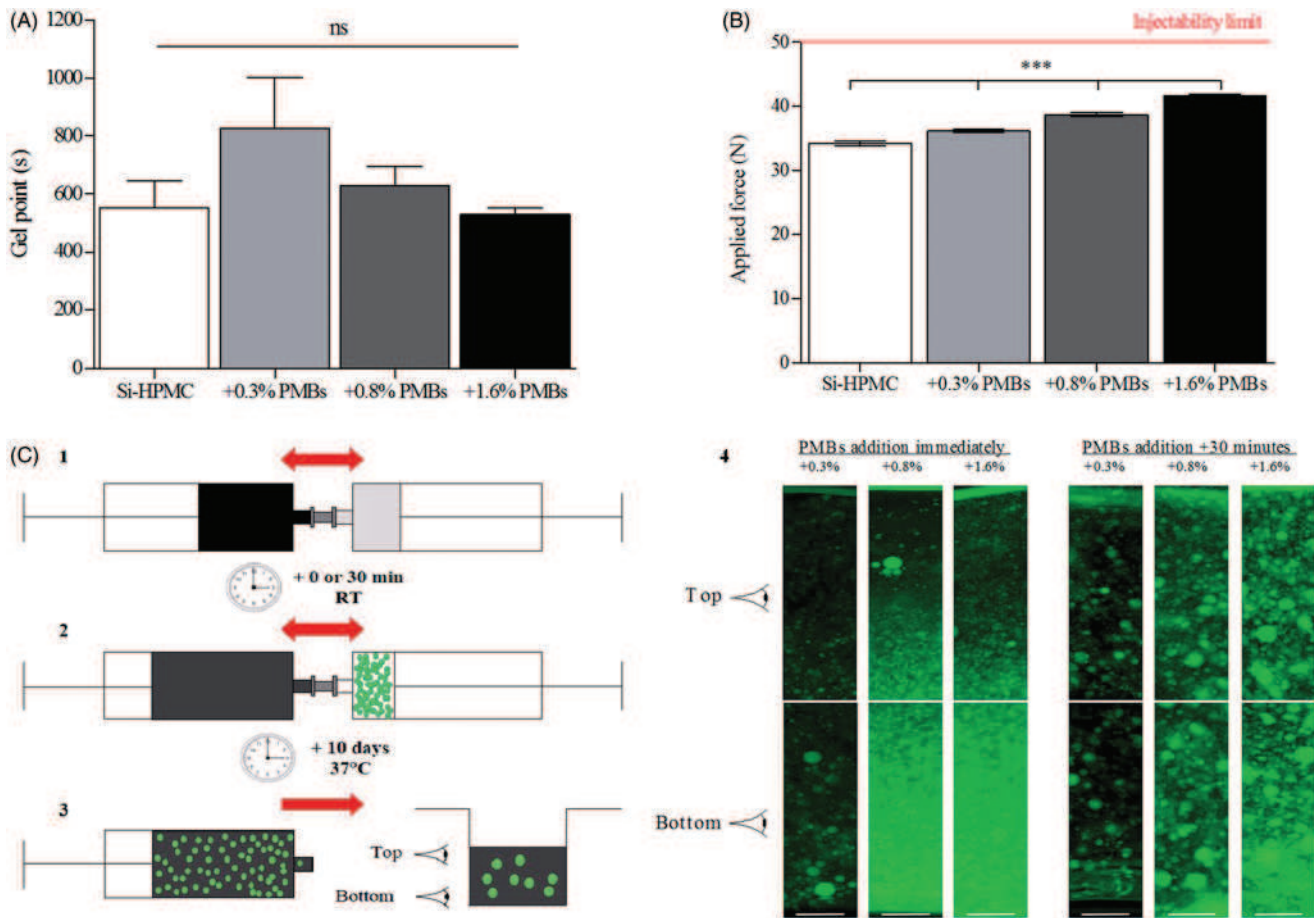


Figure 3. PMBs dispersion within Si-HPMC hydrogel precursor. PMBs were dispersed within the Si-HPMC hydrogel precursor and the influence on (A) its gel point and (B) its injectability were studied. These experiments were performed onto Si-HPMC alone or with PMBs at several concentrations ranging from 0.3 to 1.6% (w/w); (C) The PMBs dispersion in the Si-HPMC pre-hydrogel was also studied with the following steps: (1) Mix of basic viscous solution of Si-HPMC with acidic buffer, (2) Incorporation of PMBs in the pre-hydrogel immediately or after 30 min delay at room temperature. (3) PMB/Si-HPMC hydrogel was transferred into a 12-well plate. (4) After 10 days cross-linking at 37 °C top and bottom of hydrogel slices were observed; Scale bar = 250 μ m.

increase (from 34.3 N for the Si-HPMC hydrogel precursor alone to 41.6 N for the 1.6% (w/w) PMBs addition). Nevertheless, whatever the amount of PMBs added, the applied force remains under the injectability limit according to the norm ISO regulations/requirements 7886-1 which suggests a maximal injection force inferior to 50 N.

Having a system injectable and able to crosslink, we studied the distribution of the PMBs in the Si-HPMC hydrogel. Briefly, we dispersed PMBs within Si-HPMC hydrogel precursor either immediately or 30 min after mixing Si-HPMC basic viscous solution with the acidic buffer, at room temperature. After 10 days of crosslinking at 37 °C in a 12-well plate, top and bottom slices of PMBs loaded hydrogels were observed with a fluorescence microscope (Figure 3(C), step 4). We observed that when added immediately, the PMBs have a tendency to settle down at the bottom of the hydrogel, whatever the PMBs concentrations. Interestingly, for samples with a 30 minute delayed addition of PMBs, we observed a homogeneous dispersion of the PMBs in the top and the bottom part of the hydrogel, whatever the PMBs concentrations.

Finally, we studied the influence of PMBs addition on Si-HPMC mechanical properties under shear-stress and compression (Figure 4). Shear-stress analysis was performed onto biphasic systems as described in the experimental section and G' as a function of stress, as well as breaking stress were recorded. Figure 4(A) shows that increasing amount of PMBs in the Si-HPMC hydrogel led to a significant 2 fold G' increase (from 1168 ± 85 Pa for Si-HPMC alone to 2565 ± 136 Pa for Si-HPMC + 1.6% (w/w) PMBs). It is worth noting that despite the G' increase, breaking stress of the hydrogel is not significantly affected by PMBs addition (Figure 4(B)). Finally, compression analysis was performed with a texture analyzer. A slight, although not significant, increase of the Young's modulus was noted when PMBs were added (Figure 4(C)).

Growth factors loading and release

After having demonstrated our ability to manufacture and characterize PMBs either alone or embedded into Si-HPMC hydrogel, we then determined whether this biphasic system could be used for the sustained delivery of nucleopulpo-genic growth factors. We were interested in TGF- β 1 and GDF-5 loading/release profile, as we recently demonstrated (Colombier et al., 2016) the role of these two growth factors in the *in vitro* commitment and differentiation of hASC into nucleopulpo-genic cells.

Freeze-dried PMBs were thus loaded with growth factors and release experiments were then performed in PBS/BSA 1% (v/w), at pH 7.2, 37 °C. Growth factors assays on supernatants after up to 21 days release were performed as described in the experimental section. The loading efficiency of both growth factors was 100% as we were not able to detect them in the supernatants collected after loading (data not shown). Release profiles of TGF- β 1 and GDF-5 are presented on Figure 5(A) and (B), respectively. The release rate decreased during the 21 days, whatever the initial amount of

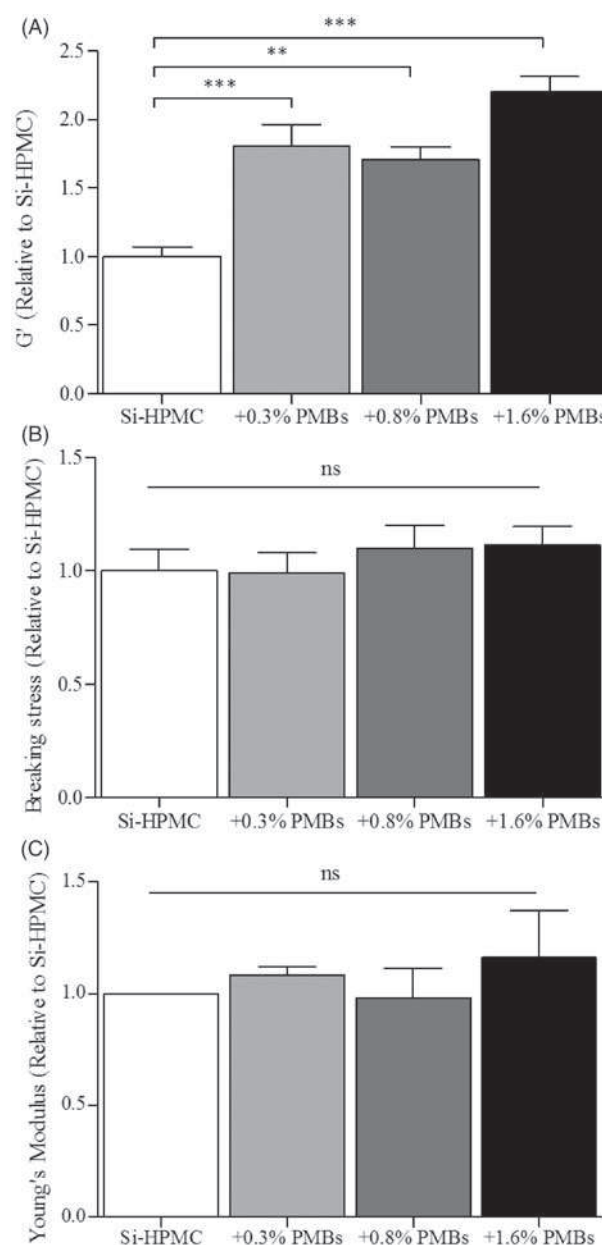


Figure 4. PMBs/Si-HPMC biphasic system mechanical characterization. Biphasic system was characterized after 10 days cross-linking at 37 °C, under (A-B) shear stress and (C) compression stress. Characterization was performed on control Si-HPMC or with adding concentration of PMBs ranging from 0.3% to 1.6% (w/w).

growth factor loaded in PMBs, from 50 ng/h to 0.15 ng/h and from 604 ng/h to 0.6 ng/h during the first hour and the last 7 days, for TGF- β 1 and GDF-5, respectively (experiments performed with growth factors initial concentrations of 4 μ g/mL). In addition, we observed that, while released TGF- β 1 reached approximately 40% of the initially loaded amount, GDF-5 was entirely released from the PMBs, whatever the initial impregnated amount.

In parallel, growth factor loaded biphasic systems (PMBs/Si-HPMC) were prepared as described in the experimental section. Crosslinking was allowed for 3 h at 37 °C and 1 mL of PBS/BSA 1% (v/w) was added on the top of the hydrogel and the release was performed for 28 days (Figure 6(A and B)). Interestingly, we observed a delayed release of the growth

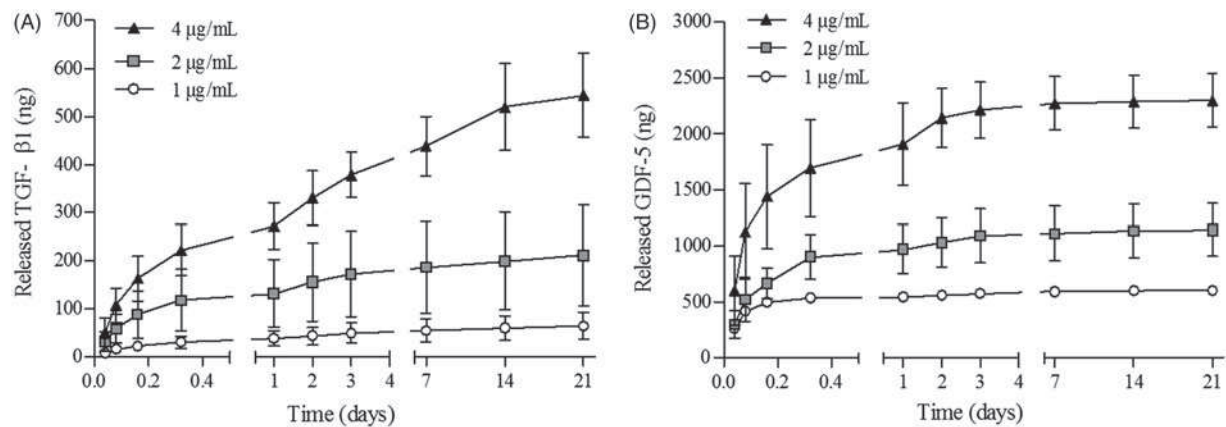


Figure 5. TGF-β1 and GDF-5 release kinetics from PMBs in PBS/BSA 1%. PMBs were loaded either with TGF-β1 or GDF-5 at 3 concentrations (1, 2 or 4 μg/mL). Release was performed in PBS/BSA 1% at 37 °C. At specific time point, supernatants were retrieved and analyzed with ELISA. Results are expressed as the cumulative amount of (A) released TGF-β1 and (B) released GDF-5 as a function of time.

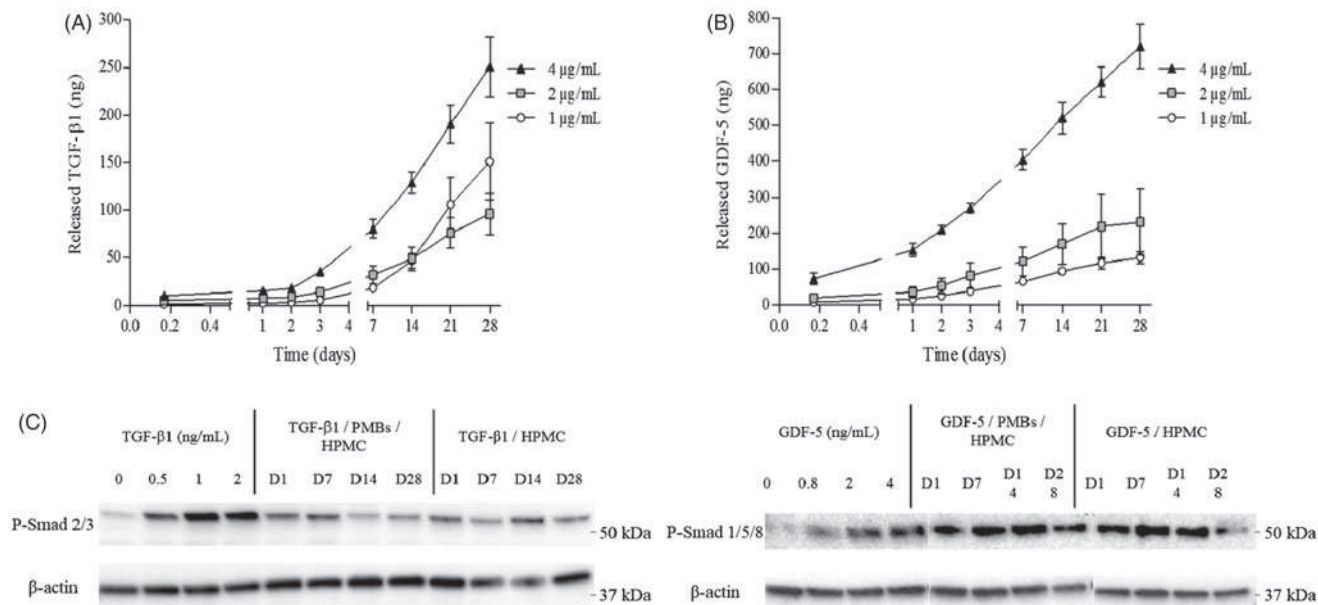


Figure 6. TGF-β1 and GDF-5 release kinetics from PMBs/Si-HPMC biphasic system and biological activity. PMBs were loaded either with TGF-β1 or GDF-5 at 3 concentrations (1, 2 or 4 μg/mL). PMBs were associated with Si-HPMC hydrogel precursor and after 3 h of crosslinking at 37 °C, release was performed by adding PBS/BSA 1% on the top of hydrogels. At specific time points supernatants were retrieved and analyzed with ELISA. Results are expressed as the cumulative amount of (A) released TGF-β1 and (B) released GDF-5 as a function of time. (C) Supernatants were further deposited onto hASC during 1 h for exploring the released TGF-β1 and GDF-5 bioactivity maintenance by western blot.

factors in these working conditions. Indeed, while the maximal release rates were observed within the first 24 h for PMBs in PBS/BSA 1% (v/w), when the PMBs were dispersed within Si-HPMC hydrogel, only small amounts of growth factors were released in this time period (0.64 and 6.36 ng/h for TGF-β1 and GDF-5, respectively). Released amount increased continuously until 28 days, although release rates did not increase in this period of time (0.35 and 0.59 ng/h for TGF-β1 and GDF-5, respectively).

Finally, the maintenance of growth factors bioactivity after release was studied. It has been shown that Smad 1/5/8 and Smad 2/3, intracellular signaling proteins, are the main effectors activated upon GDF-5 and TGF-β1 stimulation (Colombier et al., 2016). Herein, we were able to demonstrate the phosphorylation of both Smad 1/5/8 and Smad 2/3 after stimulation of hASC with early (1-day) as well as later

released (up to 28 days) TGF-β1 and GDF-5, respectively (Figure 6(C)), confirming that growth factors released from PMBs through Si-HPMC hydrogel network were still bioactive.

Discussion

The objective of the present work was to develop an injectable hydrogel-based biphasic delivery system able to sustainably deliver TGF-β1 and GDF-5 in a damaged IVD, with the ultimate goal of stimulating cell-mediated IVD regenerative process. Therefore, we hypothesized that TGF-β1 and GDF-5 loaded PMBs, dispersed into Si-HPMC hydrogel, would provide appropriate injectability, release and biological properties.

Since its first discovery in 1938 by Bauer, pullulan has been widely studied and its properties such as high water

solubility, lack of toxicity, lack of immunogenicity, biocompatibility and biodegradability were highlighted (Autissier et al., 2010; Mishra et al., 2011). In addition, its physicochemical properties can be tuned to lower its solubility, introduce charges or add functionalities (Masuda et al., 2001; Prajapati et al., 2013). Synthetic polymers can also be grafted to pullulan to form stimuli-sensitive particles (Fundueanu et al., 2008; Morimoto et al., 2013; Nishimura et al., 2015), or bioconjugates (Suginoshita et al., 2002). In line with these advantages, pullulan have raised growing interest for biomedical applications and its use as a drug carrier for controlled release has been investigated (Leathers, 2003). To this end, pullulan can be formulated in micro- or nanoparticles either by self-assembling (Jeong et al., 2006; Wang et al., 2014) or with using a crosslinker (Lack et al., 2004). Herein, pullulan microbeads were formulated using a water-in-oil emulsion/reticulation process involving sodium trimetaphosphate (STMP) as a crosslinker. This crosslinker is of particular interest as it is nontoxic and commonly used in food industries (Woo & Seib, 1997). Noteworthy, surfactants are commonly used for improving emulsion stability (Kim et al., 2010; Aydogdu et al., 2016). Owing to their known potential toxicity (Yang et al., 2015), our formulation process was achieved without any surfactant addition.

With the aim of developing a new strategy for the IVD regenerative medicine, we considered the formulation of an intradiscal injectable biphasic system for the delivery of nucleopulpopogenic growth factors, TGF- β 1 and GDF-5 (Colombier et al., 2016). To increase PMBs retention after intradiscal injection, we hypothesized that they could be dispersed within an injectable hydrogel solution able to crosslink *in situ*. Si-HPMC is of particular interest, as it is a self-setting polymer whose crosslinking is triggered by pH (Bourges et al., 2002), unlike some other polymers which requires external or internal stimuli for crosslinking (Qiu & Park, 2012; Heo et al., 2016). Considering this specific property, Si-HPMC hydrogel has already been demonstrated to be a relevant scaffold in tissue engineering for cell-based myocardium or joint cartilage regeneration (Vinatier et al., 2009; Mathieu et al., 2012; Portron et al., 2013). Our data demonstrated that it was possible to disperse PMBs within Si-HPMC hydrogel precursor without impairing its gelation capacity neither than its injectability through a 23 G needle (Figure 3). Interestingly, it has been established *in vivo*, that a needle puncture in IVD may cause its degeneration *via* a direct mechanical degradation (*Annulus fibrosus* damage or *Nucleus pulposus* depressurization), and/or through not yet clearly defined biological mechanisms (Michalek et al., 2010; Martin et al., 2013). Elliott et al. (2008) conducted a literature review of animal models and showed that these alterations depend of the needle diameter to disc height ratio, with significant changes observed for ratios over 40% (Elliott et al., 2008). However, it is worth noting that needles as large as 18 G are used for patient disc injections for diagnosis or treatment, corresponding to a needle diameter to disc height ratio of less than 10% (Peh, 2005). Injecting PMBs/Si-HPMC through a 23 G needle should thus allow to target the degenerative process of NP while avoiding deleterious effects on IVD integrity. This undoubtedly strengthens the transferable

aspect of our IVD bioactive delivery system towards clinical application. In addition, whether the intradiscal injection of a hydrogel in a degenerated IVD may contribute to restore hydration of the altered tissue, deserves to be further addressed in preclinical experiments, as it could create a 3D micro-environment that could favor cell invasion and proliferation (Balkovec et al., 2016).

In a first set of experiments, we demonstrated the homogeneous dispersion of PMBs in Si-HPMC hydrogel precursor and their injectability. Then, for the first time, compressive mechanical properties of PMBs alone was studied using a MicroSquisher[®] and PMBs Young's Modulus was determined at 57 ± 6 kPa. Of note, Si-HPMC hydrogel alone exhibits a Young's Modulus of approximately 1 kPa. Hence, biphasic systems containing homogeneously dispersed PMBs at concentrations ranging from 0.3% to 1.6% (w/w) were prepared and their mechanical properties were studied to determine whether PMBs addition would alter Si-HPMC hydrogel properties or not. Results obtained from the frequency ramp highlighted that G' storage modulus of Si-HPMC hydrogel was not affected at frequencies ranging from 0.01 to 4 Hz (data not shown). In addition, the G' values superior to the G'' values and the behavior of both moduli being frequency-independent indicates the gel-like behavior of Si-HPMC hydrogel. During shear-stress experiments we observed that, while the storage modulus (G') was significantly increased whatever the amount of PMBs added (Figure 4(A)), we did not observe any significant modification of either the breaking stress or the Young's modulus (Figure 4(B and C)). Within shear stress experiments, the storage modulus evolution reflects an increase in the elastic portion of the biphasic system. To further explain these observations, our hypothesis is that Si-HPMC hydrogel would benefit from the adding effect of the PMBs. At the studied concentrations, PMBs would not form a percolating network, since to reach this threshold for spherical particles, a volumic fraction of 0.3 is needed (Brandon & Kaplan, 2008) and we reach only 0.14 with the highest PMBs concentration. Thus, PMBs would rather create local concentrations of Si-HPMC thereby increasing its resistance towards shear stress at small deformations. Nevertheless, for larger deformations (e.g. breaking stress Figure 4(B)), the adding effect and interactions of the PMBs with the Si-HPMC hydrogel network were not sufficient to increase the breaking stress. Finally, the absence of Young's modulus modifications can be explained by the polymer chains and PMBs reorganization during the slow compression (0.01 mm/s), leading to the gel rupture before any detectable effect of the PMBs. Altogether these results indicate that PMBs addition in the Si-HPMC hydrogel precursor has little impact on the fully crosslinked hydrogel mechanical properties, in our working conditions.

In the last part of this study, we explored the PMBs and PMBs/Si-HPMC capacity to sustainably deliver two growth factors, TGF- β 1 and GDF-5. The loaded amounts were chosen according to a previously conducted work, where the optimal conditions for hASC differentiation towards NP cells were investigated (Colombier et al., 2016). Interestingly, we could demonstrate that these growth factors were released from PMBs alone for 21 days (Figure 5) and for up to 28 days when

PMBs were dispersed within Si-HPMC hydrogel (Figure 6(A and B)). We can hypothesize that this release would probably continue even after 28 days. Regarding PMBs alone, release kinetics showed a fast growth factor release during the first 3 days, up to 50 and 604 ng/h, representing over 75% and 95% for TGF- β 1 and GDF-5, respectively. This difference may be explained by a faster diffusion rate of the GDF-5 as compared to the TGF- β 1. These growth factors are typically presented with molecular weights of 13 and 25 kDa, respectively. Interestingly, we obtained from our shear stress measurements a pullulan network mesh size in the PMBs in the range of 5 nm, calculated from the following Flory equation,

$$\xi = \sqrt[3]{\frac{k_B T}{G'}}$$

where ξ is the mesh size, G' the storage modulus, k_B the Boltzman constant and T the temperature (K) (Flory, 1953). This mesh size appears similar to the GDF-5 size, allowing its faster diffusion than that of TGF- β 1. The observed release rates were much lower in the following days, especially for GDF-5. Interestingly, Kim et al. (2010), demonstrated that release rates of a loaded protein from microparticles can be easily modulated with surface coating. Indeed, they coated alginate microparticles with increasing chitosan amounts, from 1 to 3% (w/v) (Kim et al., 2010). Accordingly, they observed reduced release rates with increasing the chitosan coating amount and related these observations to a densification of the polymeric network that would impede molecules from diffusing. In our study, when the PMBs were dispersed within Si-HPMC, the release was delayed and almost no growth factor could be detected in the supernatant during the first 24 h, with release rates of 0.64 and 6.36 ng/h for TGF- β 1 and GDF-5, respectively. Thereafter, the released amount continuously increased until day 28. In all conditions, we observed that an increased amount of loaded growth factors led to a higher released amount. These results are in accordance with otherwise published studies that demonstrated a slower growth factor release when using a biphasic system (Holland et al., 2004) with a reduced initial burst and an overall prolonged release for up to 14 days (Nath et al., 2013). Additionally, Holland et al. (2005) performed release experiments using a biphasic system where they loaded two growth factors either in microparticles embedded in a hydrogel matrix and/or in the matrix itself. They thus demonstrated that it is possible to modulate the release profiles by creating a dual delivery system that could be applicable to ours (Holland et al., 2005).

In parallel, Wenk et al. (2009) demonstrated that bioactivity of the released molecule from a biphasic system was maintained for a longer period of time (Wenk et al., 2009). With our biphasic system, released GDF-5 and TGF- β 1 were used to stimulate hASC in culture. We were able to demonstrate that 28-days released GDF-5 and TGF- β 1 could activate intracellular signaling cascades as evidenced by the phosphorylation of Smad proteins. Interestingly, we previously showed that Smad 1/5/8 and Smad 2/3 pathways are essential to the differentiation of hASC. Indeed, Smad 2/3 pathway was demonstrated to be involved in the early commitment of the cells whereas the Smad 1/5/8 pathway was required

for the maturation of differentiating cells (Colombier et al., 2016). Thus, by showing the ability of the released growth factors to induce the phosphorylation of the Smad 1/5/8 and Smad 2/3 pathways, we demonstrated their biological activity maintenance for up to 28 days, in our working conditions. These findings suggest that this hydrogel-based biphasic system allows the delivery of bioactive growth factors that, in turns, could stimulate cell-mediated IVD regenerative process. With regards to IVD regenerative medicine, this delivery system could also be used to tackle inflammation, notably triggered by TNF- α and some interleukins *via* the up regulation of MMPs and aggrecanases (Kepler et al., 2013; Wang et al., 2015). Indeed, TGF- β contributes to maintaining the expression levels of connective tissue growth factor (CCN2), which was demonstrated to suppress the inductive effect of IL-1 β on catabolic genes (Tran et al., 2014). Additionally, GDF-5, down-regulated by IL-1 β and TNF- α , has been shown to favor cell proliferation and stimulate the synthesis of proteoglycan and type II collagen, thus demonstrating its anabolic activity (Chujo et al., 2006).

Additionally, it has been described that stem/progenitor cell chemo-attraction from surrounding tissues occur in degenerated IVD (Illien-Jünger et al., 2012; Pattappa et al., 2014). This is of particular interest since, under GDF-5 and TGF- β 1 treatment for 28 days, stem cells are able to differentiate towards NP cells, while producing an extracellular matrix comparable with that of the native NP (Colombier et al., 2016).

Conclusions

Herein, we demonstrated the capacity of both PMBs alone and PMBs/Si-HPMC biphasic system to deliver growth factors *in vitro* for a sustained period of time. PMBs mechanical properties and their addition impact onto Si-HPMC hydrogel were explored. We observed that it was possible to disperse PMBs within Si-HPMC hydrogel precursor without impairing its gelation capacity neither than its injectability through a 23 G needle. Additionally, PMBs/Si-HPMC biphasic system showed a gel-like behavior and only little impact of PMBs addition on mechanical properties were highlighted. This finding suggests that PMBs would probably not create strong interactions with Si-HPMC hydrogel network, neither by crosslinking effect nor PMBs percolation. Additionally, the adsorption/release of two growth factors, TGF- β 1 and GDF-5, was studied and a sustained delivery for up to 28 days was obtained. The maintenance of the biological activity of the released growth factors from PMBs was also shown. It is worth pointing out that the kinetic release of growth factors, up to 28 days, and their biological activity maintenance, appears to be compatible with a previously described hASC differentiation protocol towards NP cells (Colombier et al., 2016). These data suggest that PMBs/Si-HPMC biphasic system may be a promising candidate for the development of an innovative bioactive drug delivery system. Further experiments will determine whether growth factor loaded-PMBs/Si-HPMC biphasic system could be a suitable system for IVD regenerative medicine. In this view, we recently developed

animal models of degenerative disc disease (Fusellier et al., 2016) in which preclinical relevance of our biphasic system could be assessed. If successful, our data may offer new therapeutic window in the treatment of degenerative disc disease, which remains a huge unmet medical need.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée (FARMA "AP-RMA-2015-018"), the Région Pays de la Loire (Projet Longévité, Mobilité Autonomie, Paris Scientifique "BIO2"), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR générique "REMEDIIV", ANR Jeune Chercheur/Jeune Chercheuse "STIMUDISC") and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM Projet DBS20131128442).

References

- Autissier A, Le Visage C, Pouzet C et al. (2010). Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomaterialia* 6:3640–8.
- Aydogdu H, Keskin D, Baran ET et al. (2016). Pullulan microcarriers for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C* 63:439–49.
- Balkovec C, Vernengo AJ, McGill SM. (2016). Disc height loss and restoration via injectable hydrogel influences adjacent segment mechanics in-vitro. *Clin Biomech* 36:1–7.
- Bertram H, Kroeber M, Wang H et al. (2005). Matrix-assisted cell transfer for intervertebral disc cell therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 331:1185–92.
- Blanquer SGB, Grijpma DW, Poot A. (2014). Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs. *Adv Drug Deliv Rev* 84:172–87.
- Bonnard T, Yang G, Petiet A et al. (2014). Abdominal aortic aneurysms targeted by functionalized polysaccharide microparticles: a new tool for SPECT imaging. *Theranostics* 4:592–603. Available at: <http://doi.org/10.7150/thno.7757>
- Bourges X, Weiss P, Daculsi G et al. (2002). Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* 99:215–28.
- Brandon D, Kaplan WD. (2008). *Microstructural characterization of materials*. 2nd ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons.
- Buchtova N, Rethore G, Boyer C et al. (2013). Nanocomposite hydrogels for cartilage tissue engineering: mesoporous silica nanofibers interlinked with siloxane derived polysaccharide. *J Mater Sci Mater Med* 24:1875–84.
- Célia Monteiro de Paula R, Andrade Feitosa J, Beserra Paula H. (2015). Polysaccharide based copolymers as supramolecular systems in biomedical applications. *CDTTTargets* 16:1591–605.
- Cheng K-C, Demirci A, Catchmark JM. (2011). Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:29–44.
- Chujo T, An HS, Akeda K. (2006). Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral Disc in vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study. *Spine (Phila Pa 1976)* 31:2909–17.
- Colombier P, Camus A, Lescaudron L et al. (2014). Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissue engineers. *Trends Biotechnol* 32:433–5.
- Colombier P, Clouet J, Boyer C et al. (2016). TGF- β 1 and GDF5 act synergistically to drive the differentiation of human adipose stromal cells toward nucleus pulposus-like cells. *Stem Cells* 34:653–67.
- Elliott DM, Yerramalli CS, Beckstein JC et al. (2008). The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine* 33:588–96.
- Fatimi A, Tassin JF, Quillard S et al. (2008). The rheological properties of silylated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* 29:533–43.
- Flory PJ. (1953). *Principles of polymer chemistry*. Cornell University Press: Ithaca.
- Fundueanu G, Constantin M, Ascenzi P. (2008). Preparation and characterization of pH- and temperature-sensitive pullulan microspheres for controlled release of drugs. *Biomaterials* 29:2767–75.
- Fusellier M, Colombier P, Lesoeur J et al. (2016). Longitudinal comparison of enzyme- and laser-treated intervertebral disc by MRI, X-ray, and histological analyses reveals discrepancies in the progression of disc degeneration: a rabbit study. *BioMed Res Int* 2016:5498271.
- Henry N, Clouet J, Le Visage C et al. (2017). Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of protein-silica interactions. *J Mater Chem B* 5:2908–20.
- Heo J, Koh RH, Shim W et al. (2016). Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res* 6:148–58.
- Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. (2005). Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Control Release* 101(1–3 SPEC. ISS):111–25.
- Holland TA, Tessmar JKV, Tabata Y et al. (2004). Transforming growth factor- β 1 release from oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment. *J Control Release* 94:101–14.
- Illien-Jünger S, Pattappa G, Peroglio M et al. (2012). Homing of mesenchymal stem cells in induced degenerative intervertebral discs in a whole organ culture system. *Spine* 37:1865–73.
- Jeong YI, Na HS, Oh JS et al. (2006). Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(dl-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan. *Int J Pharm* 322:154–60.
- Kepler CK, Ponnappan RK, Tannoury C et al. (2013). The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J* 13:318–30.
- Kim K, Cheng J, Liu Q et al. (2010). Investigation of mechanical properties of soft hydrogel microcapsules in relation to protein delivery using a MEMS force sensor. *J Biomed Mater Res A* 92:103–13.
- Koushki N, Tavassoli H, Katbab AA et al. (2015). A new injectable biphasic hydrogel based on partially hydrolyzed polyacrylamide and nano hydroxyapatite, crosslinked with chromium acetate, as scaffold for cartilage regeneration. *AIP Confer Proc* 1664:9089–96.
- Lack S, Dulong V, Cerf DL et al. (2004). Hydrogels based on pullulan crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): rheological study. *Polym Bull* 436:429–36.
- Lack S, Dulong V, Picton L et al. (2007). High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydrate Res* 342:943–53.
- Leathers TD. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:468–73.
- Lu K-Y, Li R, Hsu C-H et al. (2017). Development of a new type of multifunctional fucoidan-based nanoparticles for anticancer drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 165:410–20.
- Manchikanti L, Singh V, Datta S et al. (2009). Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain. *Pain Phys* 12:E35–70.
- Martin JT, Gorth DJ, Beattie EE et al. (2013). Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res* 31:1276–82.
- Masuda K, Sakagami M, Horie K et al. (2001). Evaluation of carboxymethylpullulan as a novel carrier for targeting immune tissues. *Pharm Res* 18:217–23.
- Mathieu E, Lamirault G, Toquet C et al. (2012). Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS One* 7:e51991.
- Merceron C, Portron S, Vignes-Colombeix C et al. (2012). Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: potential application to cartilage regenerative medicine. *Stem Cells* 30:471–80.

- Michalek AJ, Funabashi KL, Iatridis JC. (2010). Needle puncture injury of the rat intervertebral disc affects torsional and compressive biomechanics differently. *Eur Spine J* 19:2110–16.
- Mishra B, Vuppu S, Rath K. (2011). The role of microbial pullulan, a biopolymer in pharmaceutical approaches: a review. *J Appl Pharm Sci* 1:45–50.
- Morimoto N, Hirano S, Takahashi H et al. (2013). Self-assembled pH-sensitive cholesteryl pullulan nanogel as a protein delivery vehicle. *Biomacromolecules* 14:56–63.
- Nath SD, Linh NT, Sadiasa A et al. (2013). Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bone tissue regeneration. *J Biomater Appl* 28:1151–63.
- Nishimura T, Takara M, Mukai S et al. (2015). A light sensitive self-assembled nanogel as a tecton for protein patterning materials. *Chem Commun (Camb)* 52:1222–5.
- Pattappa G, Peroglio M, Sakai D et al. (2014). Ccl5/Rantes is a key chemo-attractant released by degenerative intervertebral discs in organ culture. *eCMMater* 1:124–136.
- Peh WCG. (2005). Provocative discography: current status. *Biomed Imag Interv J* 1:e2–7.
- Portron S, Merceron C, Gauthier O et al. (2013). Effects of in vitro low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their in vivo chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair. *PLoS One* 8:e62368.
- Prajapati VD, Jani GK, Khanda SM. (2013). Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydr Polym* 95:540–9.
- Puppi D, Migone C, Grassi L et al. (2016). Integrated three-dimensional fiber/hydrogel biphasic scaffolds for periodontal bone tissue engineering. *Polym Int* 65:631–40.
- Purnama A, Aid-Launais R, Haddad O et al. (2015). Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv Transl Res* 5:187–97.
- Qiu Y, Park K. (2012). Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Deliv Rev* 64(SUPPL):49–60.
- Shimomura K, Moriguchi Y, Murawski CD et al. (2014). Osteochondral tissue engineering with biphasic scaffold: current strategies and techniques. *Tissue Eng B Rev* 20:468–76.
- Shingel KI. (2004). Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Res* 339:447–60.
- Suginoshita Y, Tabata Y, Matsumura T, Toda Y. (2002). Liver targeting of human interferon- β with pullulan based on metal coordination. *J Control Release* 83:75–88.
- Thébaud N, Pierron D, Bareille R et al. (2007). Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite. *J Mater Sci: Mater Med* 18:339–45.
- Tran CM, Schoepflin ZR, Markova DZ et al. (2014). CCN2 suppresses catabolic effects of interleukin-1 β through $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ integrins in nucleus pulposus cells. *J Biol Chem* 289:7374–87.
- Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A et al. (2009). An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng* 102:1259–67.
- Vinatier C, Magne D, Moreau A et al. (2007). Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 80:66–74.
- Wang J, Cui S, Bao Y et al. (2014). Tocopheryl pullulan-based self assembling nanomicelles for anti-cancer drug delivery. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 43:614–21.
- Wang W-J, Yu X-H, Wang C et al. (2015). MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin Chim Acta Chem* 448:238–46.
- Wenk E, Meinel AJ, Wildy S et al. (2009). Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering. *Biomaterials* 30:2571–81.
- Whatley BR, Wen X. (2012). Intervertebral disc (IVD): structure, degeneration, repair and regeneration. *Mater Sci Eng C* 32:61–77.
- Woo K, Seib PA. (1997). Cross-linking of wheat starch and hydroxypropylated wheat starch in alkaline slurry with sodium trimetaphosphate. *Carbohydr Poly* 33:263–71.
- Yang R, Lao QC, Yu HP et al. (2015). Tween-80 and impurity induce anaphylactoid reaction in zebrafish. *J Appl Toxicol* 35:295–301.
- Zeng Y, Chen C, Liu W et al. (2015). Injectable microcryogels reinforced alginate encapsulation of mesenchymal stromal cells for leak-proof delivery and alleviation of canine disc degeneration. *Biomaterials* 59:53–65.

2. Discussion

L'article présenté ci-dessus s'inscrit dans un contexte de médecine régénératrice pour le traitement de la dégénérescence discale précoce. L'objectif a ainsi été de développer un système injectable capable de libérer de manière prolongée les facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5, afin de pouvoir stimuler *in situ* les processus régénératif impliquant les cellules résidentes du DIV.

Comme nous l'avons vu précédemment, le pullulane est un polysaccharide linéaire largement utilisé dans l'industrie au regard de ses nombreuses propriétés intrinsèques (haute solubilité dans l'eau, absence de toxicité et d'immunogénicité, biocompatibilité et biodégradabilité)^{340,341} et de la possibilité de modifier ses propriétés physicochimiques, notamment pour ajouter de nouvelles fonctionnalités³⁵²⁻³⁵⁶. Ce biomatériau a donc été utilisé dans notre étude pour la formulation de microbilles de pullulane (PMBs) *via* un procédé d'émulsion/réticulation eau-dans-huile. Contrairement à ce qui est classiquement décrit dans la littérature^{357,358}, nous n'avons pas utilisé de surfactants pour assurer la stabilité de notre émulsion étant donné leur potentielle toxicité³⁵⁹. La réticulation des gouttelettes formées a été réalisée grâce à la présence d'un agent réticulant utilisé en industrie agro-alimentaire³⁶⁰, le triméthaphosphate de sodium (STMP)³⁶¹. Ce protocole a permis l'obtention de microbilles présentant un diamètre inférieur à 200 μ m.

Ces PMBs ont pour but d'être injectées dans le DIV et une des inquiétudes lors des stratégies impliquant l'injection de microparticules intradiscale est la fuite du biomatériau par la lésion créée à travers l'AF par l'aiguille. Pour limiter cet effet, la possibilité d'associer ces microparticules à une matrice d'hydrogel a été suggérée³⁵¹. Dans notre étude nous avons choisi de travailler avec l'hydrogel de HPMC-Si, décrit précédemment dans ce manuscrit, et qui possède les avantages majeurs d'être biocompatible et capable de réticuler après injection *in situ*. En effet, contrairement à d'autres polymères nécessitant un stimuli externe ou interne pour amorcer leur réticulation^{362,363}, celle de l'hydrogel de HPMC-Si est déclenchée par une modification de pH³¹⁸. Les résultats expérimentaux obtenus ont ainsi montré qu'il est possible de disperser de manière homogène les PMBs au sein de l'hydrogel de HPMC-Si avec une concentration allant jusqu'à 1,6% (m/m), sans modifier sa capacité de réticulation ou son injectabilité à travers une aiguille de 23G

(diamètre externe = 0,6 mm ; diamètre interne = 318 μm). Ce dernier point est particulièrement important puisqu'il a été montré que l'utilisation d'une aiguille présentant un diamètre externe supérieur à 40% de la hauteur discale, lors d'une injection dans le DIV par la voie trans-annulaire, pouvait accentuer sa dégénérescence selon des processus encore mal connus³⁶⁴⁻³⁶⁶. Cependant, il est important de souligner que les injections à visée diagnostique par la voie trans-annulaire sont largement pratiquées et utilisent des aiguilles de 18G (diamètre externe = 1,2 mm). Ce diamètre représente moins de 10% de la hauteur d'un disque sain (Figure 16)³⁶⁷. Or, le présent système "biphasique", ainsi nommé suivant un usage courant dans la littérature afférente et formé par l'association des PMBs avec l'hydrogel de HPMC-Si, est développé pour le traitement des phases précoces de dégénérescence, au cours desquelles la hauteur discale est encore quasiment normale (Figure 16). Ainsi, le système développé dans notre étude est adapté à l'application clinique visée.

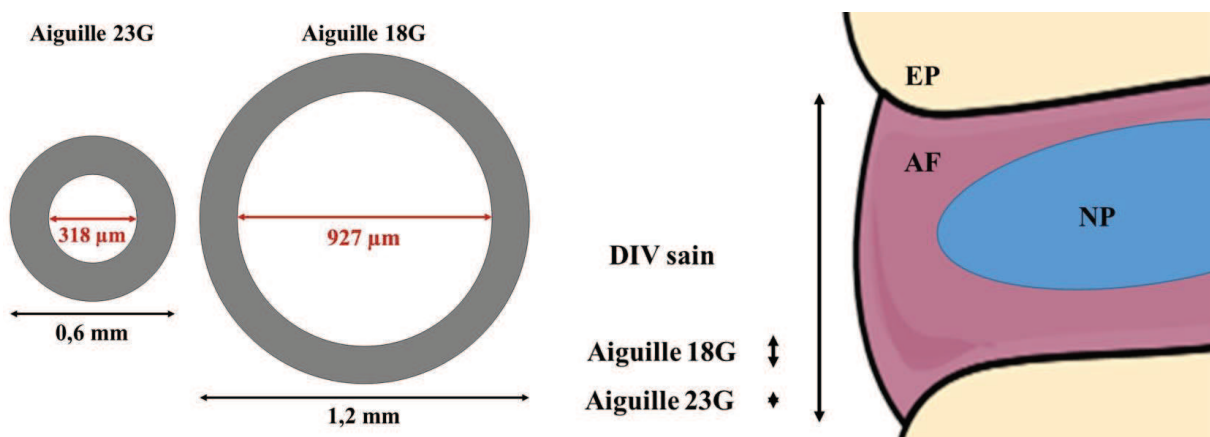


Figure 16 : Comparaison de la taille d'aiguilles de 18 et 23G vis-à-vis de la hauteur d'un DIV sain.

**Dans le contexte du traitement de dégénérescence précoce, la hauteur discale est encore quasiment équivalente à celle d'un DIV sain.*

Au cours de cette étude expérimentale nous avons étudié pour la première fois les propriétés mécaniques en compression des PMBs, qui présentent un module d'Young plus de 50 fois supérieur à celui de l'hydrogel de HPMC-Si seul. En dépit de cette différence majeure, nous avons observé que les propriétés mécaniques de l'hydrogel de HPMC-Si n'étaient que partiellement modifiées lors de l'ajout de 0,3% à 1,6% (m/m) de PMBs, dans les conditions étudiées. En effet, si le module de conservation en cisaillement G' est plus que

doublé, la contrainte à la rupture ainsi que le module d'Young de l'hydrogel de HPMC-Si ne sont pas affectés par cet ajout. Ces observations peuvent être associées à un "effet d'addition" des PMBs. En effet, aux concentrations étudiées, le seuil de percolation, déterminé comme correspondant à une fraction volumique de 0,3 pour des particules sphériques³⁶⁸, n'est pas atteint. Lors de l'ajout de 1,6% (m/m) de PMBs, leur fraction volumique n'est que de 0,14. Ainsi, la présence de PMBs au sein de l'hydrogel de HPMC-Si provoquerait une déformation du réseau avec des zones où le polymère silanisé serait localement plus concentré, permettant une augmentation de la résistance au cisaillement aux petites déformations. Néanmoins, cet "effet d'addition" des PMBs et les interactions créées ne seraient pas suffisants pour entraîner une augmentation de la contrainte nécessaire pour modifier la contrainte à la rupture. Concernant le module d'Young, la vitesse de compression utilisée lors des expérimentations étant faible (0,01 mm/s), un réarrangement des chaînes de polymère de HPMC-Si et des PMBs est suggéré. Ce réarrangement limiterait ainsi la possibilité d'observer l'effet des PMBs. **L'ensemble de ces données nous a permis de valider la possibilité de former un système biphasique *via* la dispersion de PMBs au sein de l'hydrogel de HPMC-Si. Ce système biphasique est par ailleurs injectable et il est intéressant de noter que l'ajout des PMBs n'as pas entraîné de modifications majeures des propriétés mécaniques de l'hydrogel de HPMC-Si.**

Dans une deuxième partie de cette étude, nous nous sommes intéressés à la capacité d'adsorption et de libération des facteurs de croissance TGF- β 1 et GDF-5 par les PMBs, seules d'une part, et au sein du système "biphasique" d'autre part. Nous avons pu montrer la capacité des PMBs à libérer ces facteurs de croissance pendant 21 jours pour les PMBs seules, et pendant 28 jours pour les PMBs au sein du système "biphasique". De manière intéressante, nous avons observé, pour les expérimentations réalisées sur les PMBs seules, que les cinétiques de libération étaient différentes pour les deux facteurs de croissance. Au cours des trois premiers jours, la vitesse de libération du GDF-5 était plus rapide et a conduit à une libération représentant 95% de la quantité totale libérée, pour seulement 75% pour le TGF- β 1, au cours de cette même période. Cette observation pourrait s'expliquer par une différence de masse molaire entre les deux facteurs

de croissance, respectivement 13 kDa et 25 kDa pour le GDF-5 et TGF- β 1. Or, la taille de maille du réseau de pullulane (≈ 5 nm), calculée à l'aide de l'équation de Flory³⁶⁹, est proche du diamètre estimé du GDF-5. Ce paramètre suggère ainsi une diffusion facilitée du GDF-5, par rapport à celle du TGF- β 1, au travers du réseau polymérique des PMBs. Une revue récente décrit très bien les problématiques liées de diffusion de molécules au sein de réseaux³⁷⁰. Il y est établi que le rapport "taille de la molécule"/"taille de maille" est particulièrement important vis-à-vis de la vitesse de diffusion de la molécule au sein de la matrice d'hydrogel. Pour un rapport inférieur à 1, la diffusion de la molécule sera rapide tandis qu'elle sera plus lente pour un rapport ≈ 1 . Ainsi, pour une molécule donnée, la vitesse de libération peut être modulée en réduisant ou augmentant la taille de maille de l'hydrogel. De manière intéressante, au sein du système "biphasique", nous avons observé une libération retardée des deux facteurs de croissance. Ces résultats sont en accord avec d'autres études utilisant également des systèmes "biphasiques", qui ont montré une réduction de l'effet de libération massif initial dit "burst" et une libération totale plus longue^{371,372}. Par ailleurs, plusieurs méthodes permettant de moduler la vitesse de libération des facteurs d'intérêt ont été décrites. Les microparticules peuvent notamment être recouvertes d'un autre polymère afin de ralentir la libération³⁵⁷. Dans le cas de l'utilisation d'un système "biphasique", l'hydrogel peut être chargé en molécules d'intérêt en plus des microparticules, chargées également, afin d'obtenir une libération en deux temps³⁷³. En parallèle, une autre étude a renforcé l'intérêt d'utilisation de ces systèmes "biphasiques" vis-à-vis de microparticules seules. Elle a montré que les facteurs ainsi libérés voyaient leur activité biologique maintenue plus longtemps³⁷⁴. Lors de nos expérimentations, nous avons pu démontrer un maintien de l'activité biologique des deux facteurs de croissance libérés depuis le système "biphasique" jusqu'à 28 jours. Cette activité biologique a été évaluée par le dépôt des facteurs de croissance libérés sur des hASC cultivées *in vitro*. Nous avons ainsi observé une phosphorylation des protéines constituant les voies de signalisation intracellulaires Smad 2/3 et Smad 1/5/8. Comme nous l'avons exposé précédemment, ces voies de signalisation sont essentielles dans la différenciation des hASC vers des nucléopulpecytes. En effet, la voie Smad 2/3 est impliquée dans l'engagement précoce des hASC dans la différenciation, tandis que la voie Smad 1/5/8 est requise pour la maturation des hASC en cours de différenciation¹⁷⁶. Il est à noter que la différenciation *in*

vitro d'hASC vers des nucléopulocytes nécessite un traitement impliquant le TGF- β 1 et le GDF-5 pendant 28 jours¹⁷⁶. Les résultats de notre étude sont d'autant plus intéressants que de récentes études ont montré la possibilité d'attirer des cellules souches progénitrices depuis les tissus environnants du DIV^{375,376}. **Les résultats de cette seconde étude expérimentale montrent que le système "biphasique" développé est capable de libérer les facteurs de croissance TGF- β 1 et le GDF-5 jusqu'à 28 jours, tout en maintenant leur activité biologique. L'utilisation de ce système semble donc tout à fait adaptée dans une stratégie globale de réparation endogène de cas précoces de DIV dégénéré.**

PARTIE III - CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La dégénérescence des disques intervertébraux est un processus à l'origine d'environ 40% des lombalgies et représente ainsi un problème de santé majeur. La prise en charge des patients lombalgiques repose aujourd'hui sur deux approches : les traitements pharmacologiques de la douleur et la chirurgie. Ces deux approches, bien que généralement efficaces, n'apportent que des réponses symptomatiques et ne s'attaquent pas aux causes réelles de la dégénérescence discale. Pour pallier ce manque, l'amélioration récente de nos connaissances de la physiopathologie discale permet d'envisager le développement de thérapies innovantes. En effet, il existe au sein du *Nucleus pulposus* un dialogue entre les deux types cellulaires présents, les cellules notochordales matures et les nucléopulpocytes. Chez l'homme, la disparition des cellules notochordales à la maturité squelettique entraîne une rupture de ce dialogue. De manière intéressante, cette rupture coïncide avec l'apparition des premiers signes de dégénérescence discale. Ainsi, l'idée de restaurer ce dialogue au sein du DIV par l'injection de cellules ou de facteurs capables de stimuler les cellules encore présentes semble particulièrement adaptée. Dans ce contexte et afin de promouvoir les mécanismes de régénérescence, il a tout d'abord été proposé de développer une stratégie basée sur l'injection de cellules notochordales et de nucléopulpocytes dérivés de cellules souches humaines (Thèse de Pauline Colombier, INSERM UMR 791 - LIOAD, 2011-2016). Cette thèse a notamment permis *in vitro* le développement de protocoles expérimentaux permettant de générer ces deux types cellulaires à partir de cellules iPS et de hASC. Par ailleurs, la découverte du rôle de certaines molécules dans l'anabolisme de la MEC du NP a suggéré que leur injection intradiscale pourrait stimuler les processus régénératifs. Ainsi, l'injection intradiscale de facteurs de croissance, comme le GDF-5, a fait l'objet d'essais cliniques de phase I et II. La sécurité et la tolérance de tels traitements ont pu être montrées, validant ainsi une première étape. Néanmoins, leur efficacité clinique demeure encore limitée. Une hypothèse avancée pour expliquer cette efficacité limitée est le temps de demi-vie très court des molécules injectées, qui ne persisteraient pas plus de quelques jours dans le DIV. Dans ce contexte, le développement de biomatériaux permettant de prolonger leur temps de résidence après injection, tout en assurant leur protection contre leur dégradation protéolytique, semble particulièrement intéressant.

Aussi, dans le but de proposer de nouvelles approches thérapeutiques de la dégénérescence discale, l'objectif principal de ce travail de thèse a été de développer un système basé sur un ou plusieurs biomatériaux, permettant la libération prolongée de molécules qui pourraient activer les processus anaboliques de la MEC du NP. Les molécules choisies dans cette étude ont été les facteurs de croissance GDF-5 et TGF- β 1. En effet, le GDF-5 joue un rôle clé dans le développement et le maintien de l'intégrité structurelle post-natal du DIV et permet de réduire la dégradation de la MEC par la stimulation de la prolifération et de l'anabolisme des cellules du DIV. Le TGF- β est lui impliqué dans le dialogue cellulaire entre les cellules notochordales et les nucléopulpocytes. Il a de plus un effet anabolique qui stimule la production de protéoglycanes et de collagène et inhibe la néo-vascularisation du DIV.

Afin de proposer un système à libération prolongée de ces facteurs de croissance, deux biomatériaux ont été étudiés, les nanofibres de silice et les microbilles de pullulane. Les nanofibres de silice sont des nanoparticules dont la synthèse a été mise au point pour la première fois en 2009. Elles ont par la suite été proposées par Nela Buchtová au cours de sa thèse portant sur les hydrogels nanocomposites (UMR CNRS 6502 - IMN, 2009-2012), comme des nano-renforts pour un hydrogel d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisé (HPMC-Si), conçu au laboratoire RMeS. La formation de cet hydrogel repose sur la capacité de réticulation des chaînes de polymère d'HPMC, préalablement silanisée, lors de la neutralisation du pH du milieu. Au cours de la thèse de Nela Buchtová, une propriété très intéressante associée à ces nanofibres de silice a été mise en évidence. Lorsqu'elles sont associées à l'hydrogel de HPMC-Si à une concentration suffisante pour atteindre le seuil de percolation, elles renforcent significativement les propriétés mécaniques de l'hydrogel. Les nanofibres possédant un facteur de forme de 10 ($d \times L \approx 50 \times 500 \text{ nm}$), le seuil de percolation est rapidement atteint et le renfort mécanique est observé dès 3% (m/v) de nanofibres dans l'hydrogel. Par ailleurs, cette thèse a démontré *in vitro* l'absence de cytotoxicité des nanofibres sur des hASC. L'ensemble de ces données a orienté le choix de ces nanofibres de silice pour le développement d'un nouveau DDS. Ces nanofibres avaient initialement été envisagées en tant que réservoir pour les facteurs de croissance vis-à-vis de leur réseau poreux important. Néanmoins, au regard du protocole de synthèse et du diamètre

des pores après formulation, l'effet de réservoir ne pourrait agir que par un effet de surface externe des nanofibres. De manière surprenante, nous avons obtenu une libération des facteurs de croissance pendant 28 jours, tout en maintenant leur activité biologique *in vitro* en exploitant la surface des nanofibres. Si cette durée de libération est déjà suffisante pour la différenciation de cellules souches *in vitro*, au regard des cinétiques obtenues expérimentalement, il semble probable que cette libération perdure plus longtemps. De plus, il est possible que les facteurs de croissance toujours liés aux nanofibres de silice aient également une action sur les cellules présentes dans le milieu. Ce biomatériau semble donc être un candidat prometteur pour la médecine régénératrice du DIV. Néanmoins, des études complémentaires seront nécessaires avant d'envisager une transposition à la préclinique et la clinique. En effet, si l'absence de cytotoxicité des SNFs associées à l'hydrogel de HPMC-Si a pu être montrée *in vitro*, les SNFs ne sont pas dégradables et l'effet de leur présence à long terme dans le DIV n'est actuellement pas connu.

En parallèle des nanofibres de silice, nous avons souhaité étudier un second biomatériau et le pullulane a été choisi. En effet, le pullulane est un polysaccharide linéaire largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Il est capable de former un réseau tridimensionnel en présence d'un agent réticulant, ce qui nous a permis de former des microbilles non poreuses par un procédé d'émulsion/réticulation. Le pullulane possède par ailleurs de nombreuses qualités intrinsèques, telles que la biodégradabilité et la biocompatibilité. Dans ce contexte, les microbilles de pullulane ont été associées avec l'hydrogel de HPMC-Si dans le but d'être injectées *in vivo*, pour stimuler la néo-synthèse de MEC par les cellules présente dans le DIV. Leur biocompatibilité est alors primordiale. De plus, lors de leur dégradation, les microbilles de pullulane libéreront de l'espace dans la matrice de HPMC-Si, qui pourrait à terme être rempli par de la MEC néoformée. Ce remplacement progressif des biomatériaux injectés permettrait de tendre vers une régénération *ad integrum* du tissu discal. Au cours de nos expérimentations avec ce matériau, nous avons également obtenu une libération des facteurs de croissance pendant 28 jours avec un maintien de leur activité biologique *in vitro*. Contrairement à ce que nous avons observé avec les SNFs, la totalité des facteurs de croissance imprégnés dans les PMBs a été libérée au cours des 28 jours. Sur ce point, ce biomatériau semble

plus intéressant que les SNFs car il est plus facile de contrôler la quantité de facteur de croissance délivrée *in situ*, en agissant sur la quantité imprégnée dans les PMBs. De plus, si nous avons observé qu'en absence de l'hydrogel de HPMC-Si, la libération des facteurs de croissance est principalement concentrée sur les 3 premiers jours des expérimentations, la cinétique de libération associée aux PMBs est facilement modifiable. En effet, la modulation des vitesses de libération et de réticulation peut être obtenue en augmentant la concentration du polymère au sein des PMBs afin de réduire la taille de maille et ainsi ralentir la diffusion des facteurs de croissance. Dans ce même objectif, un recouvrement ou une combinaison des PMBs avec un autre biomatériau peut être envisagé. Il est tout de même à noter que si l'ajout des microbilles de pullulane ne modifie pas la capacité de réticulation du HPMC-Si, elles ne permettent pas d'apporter un renfort mécanique de ses propriétés, contrairement aux nanofibres de silice. Une association des deux matériaux développés, SNFs et PMBs pourrait alors être envisagée.

Les deux biomatériaux présentés ci-dessus semblent être des candidats prometteurs pour notre application. Néanmoins, la reproductibilité de leur protocole de synthèse devra être améliorée avant d'envisager une utilisation en clinique. Par ailleurs, une optimisation de ces protocoles vers la production de plus grandes quantités pourrait être intéressante. En effet, pour les deux biomatériaux, la production à chaque synthèse est de l'ordre de quelques milligrammes. Or, nous avons estimé qu'environ 25 mg de nanofibres de silice ou de microbilles de pullulane seront nécessaires pour une injection intradiscale du système développé, par patient. Enfin, il faudra s'attacher à étudier les méthodes de stérilisation du/des système(s) à libération prolongée choisi(s).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse sont très encourageants quant au développement d'une stratégie globale de médecine régénératrice du DIV et la poursuite de ce projet peut être envisagée selon différentes approches. La première et la plus évidente est l'étude, notamment *in vivo*, des DDS développés, en association ou non avec des hASC, afin d'observer s'ils sont capables d'induire une régénération discale. Par ailleurs, les systèmes développés pourront être utilisés pour la libération prolongée d'autres molécules. C'est le cas notamment des microbilles de pullulane qui sont actuellement étudiées pour

la libération de chimiokines dans le cadre d'une thèse portant sur le développement d'un système à libération contrôlée pour le recrutement de cellules souches endogènes au sein du DIV (Leslie Frapin, RMeS, INSERM UMR 1229, 2016-2019).

L'administration de ces DDS reste néanmoins une problématique irrésolue à ce jour. En effet, alors que le geste chirurgical de ponction de l'AF a été décrit comme une méthode efficace pour générer un modèle animal de dégénérescence discale, l'injection trans-annulaire reste la méthode la plus employée pour les injections intradiscales. Au regard des interrogations persistantes quant au potentiel dégénératif de cette approche, la communauté scientifique se penche actuellement sur le développement de nouvelles voies d'abord, notamment la voie transpédiculaire³⁷⁷⁻³⁸⁰. Néanmoins, à l'opposé de ces travaux pionniers dont les résultats semblent encourageants, une étude initiée au laboratoire RMeS montre que les débris osseux générés lors du passage de l'aiguille au travers de la vertèbre accentueraient la dégénérescence discale (M2 Luc Le Fournier et Cyrille Decante - Interne Chirurgie orthopédique, 2016 et 2017)³⁸¹. Ainsi, une optimisation de la voie d'abord trans-annulaire est à envisager, impliquant par exemple une dissection de l'AF pour limiter les lésions ou le développement d'un patch pour aider à la reconstruction de l'AF après ponction. Cette dernière stratégie fait actuellement l'objet d'une thèse (Maude Gluais, RMeS, INSERM UMR 1229, 2015-2018).

Pour conclure, le développement d'une stratégie pour traiter les causes sous-jacentes de la lombalgie associée à la dégénérescence discale n'est pas simple. Cette maladie possède une origine multifactorielle et repose sur le dérèglement de l'homéostasie de la MEC du NP. Les découvertes concernant la physiopathologie discale ont mis en lumière les multiples aspects de cette maladie et les cibles thérapeutiques potentielles, tout aussi nombreuses. Ainsi, de très nombreux systèmes pour la libération prolongée de biomolécules ou de cellules ont été développés, et il en apparaît toujours de nouveaux. Parmi ces systèmes, les deux biomatériaux présentés dans cette thèse sont autant de candidats à l'établissement de stratégies de médecine régénératrice du DIV et doivent être étudiés avec attention. Néanmoins, le développement de systèmes de plus en plus complexes pour la régénération discale n'est peut-être pas la

solution au regard des contraintes réglementaires actuelles et une simplification des réponses apportées par la communauté scientifique apparaît nécessaire pour permettre un passage à la clinique plus rapide.

PARTIE IV - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kassebaum, N. J. *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388**, 1603–1658 (2016).
2. Kamina, P. *Anatomie - Introduction à la clinique (Dos et Thorax)*. (1997).
3. Colombini, A., Lombardi, G., Corsi, M. M. & Banfi, G. Pathophysiology of the human intervertebral disc. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 837–842 (2008).
4. Urban, J. P. G. & Roberts, S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res. Ther.* **5**, 120–130 (2003).
5. Hansen, J. T. *Anatomie Netter - Tronc*. (2015).
6. Marchand, F. & Ahmed, A. M. Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **15**, 402–10 (1990).
7. Sivakamasundari, V. & Lufkin, T. Bridging the Gap Understanding Embryonic Intervertebral Disc Development. *cell Dev Biol* **1**, 103 (2012).
8. Pradal, G. *Embryologie humain élémentaire - L'individu de sa naissance à sa mise au monde*. (2005).
9. Chan, W. C. W., Au, T. Y. K., Tam, V., Cheah, K. S. E. & Chan, D. Coming together is a beginning: The making of an intervertebral disc. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* **102**, 83–100 (2014).
10. Alman, B. a. The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **1**, 1–9 (2015).
11. Colombier, P., Clouet, J., Hamel, O., Lescaudron, L. & Guicheux, J. The lumbar intervertebral disc: From embryonic development to degeneration. *Jt. Bone Spine* **81**, 125–9 (2013).
12. McCann, M. R. & Séguin, C. A. Notochord Cells in Intervertebral Disc Development and Degeneration. *J. Dev. Biol.* **4**, 1–18 (2016).
13. Choi, K. S., Cohn, M. J. & Harfe, B. D. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: Implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev. Dyn.* **237**, 3953–3958 (2008).
14. Kosher, R. A. & Lash, J. W. Notochordal stimulation of in vitro somite chondrogenesis before and after enzymatic removal of perinotochordal materials. *Dev. Biol.* **42**, 362–378 (1975).
15. Peters, H. *et al.* Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development* **126**, 5399–5408 (1999).
16. Aszódi, A., Chan, D., Hunziker, E., Bateman, J. F. & Fässler, R. Collagen II is essential for the removal of the notochord and the formation of intervertebral discs. *J. Cell Biol.* **143**, 1399–1412 (1998).

17. Bachiller, D. *et al.* The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* **403**, 658–661 (2000).
18. Maier, J. A., Lo, Y. T. & Harfe, B. D. Foxa1 and Foxa2 Are Required for Formation of the Intervertebral Discs. *PLoS One* **8**, (2013).
19. Uetzmann, L., Burtscher, I. & Lickert, H. A mouse line expressing Foxa2-driven Cre recombinase in Node, notochord, floorplate, and endoderm. *Genesis* **46**, 515–522 (2008).
20. Urban, J. P. G., Smith, S. & Fairbank, J. C. T. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **29**, 2700–2709 (2004).
21. Malandrino, A. *et al.* The role of endplate poromechanical properties on the nutrient availability in the intervertebral disc. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 1053–1060 (2014).
22. Gu, W., Zhu, Q., Gao, X. & Brown, M. D. Simulation of the Progression of Intervertebral Disc Degeneration due to Decreased Nutrition Supply. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. (2014). doi:10.1097/BRS.0000000000000560
23. Maroudas, A., Stockwell, R. A., Nachemson, A. & Urban, J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J. Anat.* **120**, 113–30 (1975).
24. Antoniou, J. *et al.* The human lumbar intervertebral disc: Evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J. Clin. Invest.* **98**, 996–1003 (1996).
25. Hickey, D. S. & Hukins, D. W. X-ray diffraction studies of the arrangement of collagenous fibres in human fetal intervertebral disc. *J. Anat.* **131**, 81–90 (1980).
26. Rodrigues-Pinto, R., Richardson, S. M. & Hoyland, J. A. An understanding of intervertebral disc development, maturation and cell phenotype provides clues to direct cell-based tissue regeneration therapies for disc degeneration. *Eur. Spine J.* **23**, 1803–14 (2014).
27. Hunter, C. J., Matyas, J. R. & Duncan, N. A. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: A species comparison. *J. Anat.* **205**, 357–362 (2004).
28. Risbud, M. V, Schear, T. P. & Shapiro, I. M. Towards an Understanding of the Role of notochordal cells in the adult intervertebral disc - From discord to accord. *Dev Dyn* **239**, 2141–2148 (2010).
29. McCann, M. R., Tamplin, O. J., Rossant, J. & Seguin, C. A. Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse: implications for intervertebral disc development. *Dis Model Mech* **5**, 73–82 (2012).
30. Minogue, B. M., Richardson, S. M., Zeef, L. A., Freemont, A. J. & Hoyland, J. A. Transcriptional profiling of bovine intervertebral disc cells: implications for identification of normal and degenerate human intervertebral disc cell phenotypes. *Arthritis Res Ther* **12**, R22 (2010).

31. Quintin, A. *et al.* Isolation and in vitro chondrogenic potential of human foetal spine cells. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 2559–2569 (2009).
32. Purmessur, D. *et al.* Dynamic pressurization induces transition of notochordal cells to a mature phenotype while retaining production of important patterning ligands from development. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R122 (2013).
33. Erwin, W. M. *et al.* Intervertebral Disc-Derived Stem Cells. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **38**, 211–216 (2013).
34. Bedore, J. *et al.* Impaired intervertebral disc development and premature disc degeneration in mice with notochord-specific deletion of CCN2. *Arthritis Rheum.* **65**, 2634–2644 (2013).
35. Tran, C. M. *et al.* TGF β Controls CCN3 Expression in Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc. *Arthritis Rheum.* **63**, 3022–3031 (2011).
36. Tran, C. M., Shapiro, I. M. & Risbud, M. V. Molecular Regulation of CCN2 in the Intervertebral Disc: Lessons Learned from Other Connective Tissues. *Matrix Biol.* **32**, 298–306 (2013).
37. Erwin, W. M. The Notochord, Notochordal cell and CTGF/CCN-2: Ongoing activity from development through maturation. *J. Cell Commun. Signal.* **2**, 59–65 (2008).
38. Moore, R. J. The vertebral endplate: Disc degeneration, disc regeneration. *Eur. Spine J.* **15**, 333–337 (2006).
39. Junhui, L. *et al.* Anchorage of annulus fibrosus within the vertebral endplate with reference to disc herniation. *Microsc. Res. Tech.* **78**, 754–760 (2015).
40. Han, W. M. *et al.* Multi-scale Structural and Tensile Mechanical Response of Annulus Fibrosus to Osmotic Loading. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 1610–1621 (2012).
41. Driscoll, T. P., Nerurkar, N. L., Jacobs, N. T., Elliott, D. M. & Mauck, R. L. Fiber angle and aspect ratio influence the shear mechanics of oriented electrospun nanofibrous scaffolds. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **4**, 1627–1636 (2011).
42. Eyre, D. R. & Muir, H. Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *Biochem. J.* **157**, 267–270 (1976).
43. Sivan, S. S. *et al.* Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur. Spine J.* **23**, 344–353 (2014).
44. Johnstone, B., Urban, J. P., Roberts, S. & Menage, J. 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 (Phila. Pa. 1976)*. **17**, 412–6 (1992).
45. Lee, C. R. *et al.* A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J* **16**, 2174–2185 (2007).

46. Benneker, L. M. *et al.* Cell therapy for intervertebral disc repair: Advancing cell therapy from bench to clinics. *Eur. Cells Mater.* **27**, 5–11 (2014).
47. Molinos, M., Almeida, C. R., Gonçalves, R. M. & Barbosa, M. a. Improvement of Bovine Nucleus Pulposus Cells Isolation Leads to Identification of Three Phenotypically Distinct Cell Subpopulations. *Tissue Eng. Part A* **21**, 2216–2227 (2015).
48. Shine, K. M., Simson, J. A. & Spector, M. Lubricin Distribution in the Human Intervertebral Disc. *J. Bone Jt. Surgery-American Vol.* **91**, 2205–2212 (2009).
49. Tavakoli, J., Elliott, D. M. & Costi, J. J. Structure and mechanical function of the inter-lamellar matrix of the annulus fibrosus in the disc. *J. Orthop. Res.* **34**, 1307–1315 (2016).
50. Raj, P. P. Intervertebral disc: Anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract.* **8**, 18–44 (2008).
51. Zhang, Y., Chee, A., Thonar, E. J.-M. a & An, H. S. Intervertebral disk repair by protein, gene, or cell injection: a framework for rehabilitation-focused biologics in the spine. *PM R* **3**, S88–94 (2011).
52. Molinos, M. *et al.* Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration. *J R Soc Interface* **12**, 20141191 (2015).
53. Aguiar, D. J., Johnson, S. L. & Oegema, T. R. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis. *Exp Cell Res* **246**, 129–137 (1999).
54. Clouet, J. *et al.* Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes. *Rheumatology* **48**, 1447–1450 (2009).
55. Sakai, D., Nakai, T., Mochida, J., Alini, M. & Grad, S. Differential phenotype of intervertebral disc cells: microarray and immunohistochemical analysis of canine nucleus pulposus and anulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)* **34**, 1448–1456 (2009).
56. Minogue, B. M., Richardson, S. M., Zeef, L. A., Freemont, A. J. & Hoyland, J. A. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum* **62**, 3695–3705 (2010).
57. Kregar Velikonja, N. *et al.* Cell sources for nucleus pulposus regeneration. *Eur Spine J* (2013). doi:10.1007/s00586-013-3106-9
58. Kepler, C. K., Ponnappan, R. K., Tannoury, C. a, Risbud, M. V & Anderson, D. G. The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J.* **13**, 318–30 (2013).
59. Portron, S. *et al.* Effects of in vitro low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their in vivo chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair. *PLoS One* **8**, e62368 (2013).
60. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* **7**, 345–350 (2001).

61. Bartels, E. M., Fairbank, J. C., Winlove, C. P. & Urban, J. P. Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **23**, 1–7; discussion 8 (1998).
62. Merceron, C. *et al.* Loss of HIF-1 α in the Notochord Results in Cell Death and Complete Disappearance of the Nucleus Pulposus. *PLoS One* **9**, e110768 (2014).
63. Li, H., Liang, C. Z. & Chen, Q. X. Regulatory role of hypoxia inducible factor in the biological behavior of nucleus pulposus cells. *Yonsei Med. J.* **54**, 807–812 (2013).
64. Mokhbi Soukane, D., Shirazi-Adl, A. & Urban, J. P. G. Computation of coupled diffusion of oxygen, glucose and lactic acid in an intervertebral disc. *J. Biomech.* **40**, 2645–2654 (2007).
65. Semenza, G. L. & Wang, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5447–5454 (1992).
66. Kaufman, B. *et al.* Proceedings of the Oxygen Homeostasis / Hypoxia Meeting. *J. Biol. Chem.* 3350–3356 (2004). doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2611
67. Semenza, G. L. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 993–998 (2002).
68. Risbud, M. V. *et al.* Nucleus pulposus cells express HIF-1 α under normoxic culture conditions: A metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment. *J. Cell. Biochem.* **98**, 152–159 (2006).
69. Engelhardt, B., Vajkoczy, P. & Weller, R. O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat. Immunol.* **18**, 123–131 (2017).
70. Sabatino, F., Di Zazzo, A., De Simone, L. & Bonini, S. The intriguing role of neuropeptides at the ocular surface. *Ocul. Surf.* **15**, 2–14 (2016).
71. Chen, Q., Deng, T. & Han, D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **59**, 157–165 (2015).
72. Zhang, J., Dunk, C., Croy, A. B. & Lye, S. J. To serve and to protect: the role of decidual innate immune cells on human pregnancy. *Cell Tissue Res.* **363**, 249–265 (2016).
73. Bobechko, W. & Hirsch, C. Autoimmune response to nucleus pulposus in the rabbit. *J. bone Jt. Surg.* **47**, 574–580 (1965).
74. Gertzbein, S. D., Tile, M., Gross, A. & Falk, R. Autoimmunity in degenerative disc disease of the lumbar spine. *Orthop. Clin. North Am.* **6**, 67–73 (1975).
75. Murai, K. *et al.* Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. *Eur. Cell. Mater.* **19**, 13–21 (2010).

76. Di Martino, A., Merlini, L. & Faldini, C. Autoimmunity in intervertebral disc herniation: from bench to bedside. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 1461–70 (2013).
77. Liu, Z. H. *et al.* FasL expression on human nucleus pulposus cells contributes to the immune privilege of intervertebral disc by interacting with immunocytes. *Int. J. Med. Sci.* **10**, 1053–1060 (2013).
78. Hiyama, A. *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J. Orthop. Res.* **26**, 589–600 (2008).
79. Sakai, D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease. *Eur Spine J* **17 Suppl 4**, 452–458 (2008).
80. Lee, H. O. & Ferguson, T. a. Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 325–335 (2003).
81. Geiss, A., Larsson, K., Rydevik, B., Takahashi, I. & Olmarker, K. Autoimmune properties of nucleus pulposus: an experimental study in pigs. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **32**, 168–73 (2007).
82. Nishida, K. *et al.* Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **24**, 2419–2425 (1999).
83. Nishida, K. *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **23**, 2437–42 (1998).
84. Iatridis, J. C., Weidenbaum, M., Setton, L. a & Mow, V. C. Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **21**, 1174–1184 (1996).
85. Sivan, S. S. *et al.* Aggrecan turnover in human intervertebral disc as determined by the racemization of aspartic acid. *J. Biol. Chem.* **281**, 13009–13014 (2006).
86. Vergroesen, P. P. a *et al.* Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: A vicious circle. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 1057–1070 (2015).
87. Hirsch, C. & Nachemson, a. New observations on the mechanical behavior of lumbar discs. *Acta Orthop. Scand.* **23**, 254–283 (1954).
88. Tsai, T. L., Nelson, B. C., Anderson, P. A., Zdeblick, T. A. & Li, W. J. Intervertebral Disc and Stem Cells Co-cultured in Biomimetic Extracellular Matrix Stimulated by Cyclic Compression in Perfusion Bioreactor. *Spine J.* (2014). doi:10.1016/j.spinee.2013.11.062
89. Neidlinger-Wilke, C. *et al.* Mechanical loading of the intervertebral disc: From the macroscopic to the cellular level. *Eur. Spine J.* **23**, (2014).
90. Manchikanti, L., Singh, V., Datta, S., Cohen, S. P. & Hirsch, J. a. Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain. *Pain Physician* **12**, E35–E70 (2009).

91. Deyo, R., Mirza, S. & Martin. Back Pain Prevalence and Visit Rates: Estimates From U.S. National Surveys, 2002. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **31**, 2724–2727 (2006).
92. De Schepper, E. I. T. *et al.* Prevalence of spinal pathology in patients presenting for lumbar MRI as referred from general practice. *Fam. Pract.* **33**, 51–56 (2016).
93. Harkness, E. F., Macfarlane, G. J., Silman, A. J. & McBeth, J. Is musculoskeletal pain more common now than 40 years ago?: Two population-based cross-sectional studies. *Rheumatology* **44**, 890–895 (2005).
94. Freburger, J. K. *et al.* The rising prevalence of chronic low back pain. *Arch Intern Med* **169**, 251–258 (2009).
95. Kalichman, L. & Hunter, D. J. The genetics of intervertebral disc degeneration. Associated genes. *Jt. Bone Spine* **75**, 388–396 (2008).
96. Wang, W.-J. *et al.* MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin. Chim. Acta.* (2015). doi:10.1016/j.cca.2015.06.023
97. Andersson, G. B. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet* **354**, 581–585 (1999).
98. Elliott, A. M., Smith, B. H., Penny, K. I., Smith, W. C. & Chambers, W. A. The epidemiology of chronic pain in the community. *Lancet* **354**, 1248–52 (1999).
99. Hoy, D., Brooks, P., Blyth, F. & Buchbinder, R. The Epidemiology of low back pain. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **24**, 769–781 (2010).
100. Pellisé, F. *et al.* Prevalence of low back pain and its effect on health-related quality of life in adolescents. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **163**, 65–71 (2009).
101. Ochsmann, E. B. *et al.* Prevalence of diagnosis and direct treatment costs of back disorders in 644,773 children and youths in Germany. *BMC Musculoskelet. Disord.* **11**, 193 (2010).
102. Katz, J. N. Lumbar Disc Disorders and Low-Back Pain: Socioeconomic Factors and Consequences. *J Bone Jt. Surg Am.* **88**, 21–24 (2006).
103. Luoma, K. *et al.* Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **25**, 487–92 (2000).
104. Petit, A. & Roquelaure, Y. Phatologies discales et maladies professionnelles. *Rev. Rhum.* **81**, 52–56 (2014).
105. Martirosyan, N. L. *et al.* Genetic Alterations in Intervertebral Disc Disease. *Front. Surg.* **3**, 59 (2016).
106. Watanabe, H., Nakata, K., Kimata, K., Nakanishi, I. & Yamada, Y. Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective in aggrecan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6943–7 (1997).

107. Gu, J. *et al.* AggreCan Variable Number of Tandem Repeat Polymorphism and Lumbar Disc Degeneration: A Meta-analysis. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **38**, E1600–7 (2013).
108. Li, S., Darwin, J. P., Helminen, H., Lui, H. & Khillan, J. S. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2a1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev.* **9**, 2821–2830 (1995).
109. Toktaş, Z. O. *et al.* Association of collagen I, IX and vitamin D receptor gene polymorphisms with radiological severity of intervertebral disc degeneration in Southern European Ancestor. *Eur. Spine J.* **24**, 2432–2441 (2015).
110. Kimura, T. *et al.* Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation. *Int. Orthop.* **20**, 177–81 (1996).
111. Mayer, J. E. *et al.* Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration. *Spine J.* **13**, 299–317 (2013).
112. Wang, Z. *et al.* Interleukin 1 polymorphisms contribute to intervertebral disc degeneration risk: A meta-analysis. *PLoS One* **11**, 1–12 (2016).
113. Noponen-Hietala, N. *et al.* Genetic variations in IL6 associate with intervertebral disc disease characterized by sciatica. *Pain* **114**, 186–194 (2005).
114. Aulisa, L. *et al.* Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **32**, 2700–2702 (2007).
115. Nong, L., Huang, Y., Zhao, S. & Xu, N. Vitamin D Receptor Gene, Matrix Metalloproteinase 3 Polymorphisms and the Risk of Intervertebral Disc Degeneration Susceptibility: Meta-Analysis. *Asian Spine J.* **10**, 964–971 (2016).
116. Eser, B. *et al.* Effects of MMP-1 and MMP-3 gene polymorphisms on gene expression and protein level in lumbar disc herniation. *Genet. Mol. Res.* **15**, 1–10 (2016).
117. Sun, Z., Miao, L., Zhang, Y. & Ming, L. Association between the -1562 C/T Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-9 Gene and Lumbar Disc Disease in the Young Adult Population in North China. *Connect. Tissue Res.* **50**, 181–185 (2009).
118. Zhang, Y., Gu, Z. & Qiu, G. Association of the polymorphism of MMP2 with the risk and severity of lumbar disc degeneration in the Chinese Han population. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 1830–1834 (2013).
119. Kalb, S., Martirosyan, N. L., Kalani, M. Y. S., Broc, G. G. & Theodore, N. Genetics of the degenerated intervertebral disc. *World Neurosurg.* **77**, 491–501 (2012).
120. Bell, G. K., Kidd, D. & North, R. B. Cost-effectiveness analysis of spinal cord stimulation in treatment of failed back surgery syndrome. *J. Pain Symptom Manage.* **13**, 286–295 (1997).

121. Whatley, B. R. & Wen, X. Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 61–77 (2012).
122. Silva-Correia, J., Correia, S. I., Oliveira, J. M. & Reis, R. L. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disc. *Biotechnol Adv* **31**, 1514–1531 (2013).
123. Henry, N. *et al.* Médecine régénératrice du disque intervertébral: De la physiopathologie à l'application clinique régénératrice du disque intervertébral. *Med. Sci.* **30**, 1091–1100 (2014).
124. Clouet, J. *et al.* The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering. *Jt. Bone Spine* **76**, 614–618 (2009).
125. Adams, M. A. & Roughley, P. J. What is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It? *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **31**, 2151–2161 (2006).
126. Maus, T. Imaging the Back Pain Patient. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* **21**, 725–766 (2010).
127. Dudli, S., Fields, A. J., Samartzis, D., Karppinen, J. & Lotz, J. C. Pathobiology of Modic changes. *Eur. Spine J.* **25**, 3723–3734 (2016).
128. Boden, S. D., Davis, D. O., Dina, T. S., Patronas, N. J. & Wiesel, S. W. Abnormal magnetic-resonance scans of the lumbar spine in asymptomatic subjects. A prospective investigation. *J. Bone Joint Surg. Am.* **72**, 403–8 (1990).
129. Kim, S. J., Lee, T. H. & Yi, S. Prevalence of disc degeneration in asymptomatic Korean subjects. Part 3: Cervical and lumbar relationship. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **53**, 167–173 (2013).
130. Urrutia, J., Zamora, T. & Prada, C. The prevalence of degenerative or incidental findings in the lumbar spine of pediatric patients: a study using magnetic resonance imaging as a screening tool. *Eur. Spine J.* **25**, 596–601 (2016).
131. Jensen, M. C. *et al.* Magnetic Resonance Imaging of the Lumbar Spine in People Without Back Pain. *N. Engl. J. Med.* **331**, 842–845 (1994).
132. Pfirrmann, C. W. a., Metzdorf, A., Zanetti, M., Hodler, J. & Boos, N. Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **26**, 1873–1878 (2001).
133. Videman, A. T., Battié, M. C., Gibbons, L. E. & Gill, K. A new quantitative measure of disc degeneration using T1rho MRI. *Proc. North Am. Spine Soc.* (2005). doi:10.1016/j.spinee.2017.02.002
134. Ogon, I. *et al.* Analysis of chronic low back pain with magnetic resonance imaging T2 mapping of lumbar intervertebral disc. *J. Orthop. Sci.* **20**, 295–301 (2015).
135. Thompson, J. P. *et al.* Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **15**, 411–5 (1990).

136. Deng, B. *et al.* Expression profiles of MMP-1 and TIMP-1 in lumbar intervertebral disc degeneration. *Genet. Mol. Res.* **14**, 19080–19086 (2015).
137. Xu, H. *et al.* Correlation of Matrix Metalloproteinases-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 with Patient Age and Grade of Lumbar Disk Herniation. *Cell Biochem. Biophys.* **69**, 439–444 (2014).
138. Pockert, A. J. *et al.* Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Rheum.* **60**, 482–491 (2009).
139. Li, Y. *et al.* The imbalance between TIMP3 and matrix-degrading enzymes plays an important role in intervertebral disc degeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, 507–514 (2016).
140. Wallach, C. J. *et al.* Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **28**, 2331–2337 (2003).
141. Lee, J. M. *et al.* Interleukin-1 β induces angiogenesis and innervation in human intervertebral disc degeneration. *J. Orthop. Res.* **29**, 265–269 (2011).
142. Freemont, A. J. *et al.* Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet* **350**, 178–181 (1997).
143. Coppes, M., Marani, E., Thomeer, R. & Groen, G. Innervation of Painful Lumbar Discs. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **22**, 2342–2350 (1997).
144. Binch, A. L. A. *et al.* Nerves are more abundant than blood vessels in the degenerate human intervertebral disc. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 370 (2015).
145. Kepler, C. K., Ponnappan, R. K., Tannoury, C. A., Risbud, M. V & Anderson, D. G. The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J.* **13**, 318–330 (2013).
146. Erwin, W. M., Islam, D., Inman, R. D., Fehlings, M. G. & Tsui, F. W. Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* **13**, R215 (2011).
147. Vo, N. V. *et al.* Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine J.* **13**, 331–341 (2013).
148. Goupille, P., Jayson, M. I., Valat, J. P. & Freemont, A. J. Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration? *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **23**, 1612–26 (1998).
149. Arpino, V., Brock, M. & Gill, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* **44–46**, 247–254 (2015).
150. Cornejo, M. C., Cho, S. K., Giannarelli, C., Iatridis, J. C. & Purmessur, D. Soluble factors from the notochordal-rich intervertebral disc inhibit endothelial cell invasion and vessel formation in the presence and absence of pro-inflammatory cytokines. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 487–496 (2015).

151. Purmessur, D. *et al.* Intact glycosaminoglycans from intervertebral disc-derived notochordal cell-conditioned media inhibit neurite growth while maintaining neuronal cell viability. *Spine J.* **15**, 1060–1069 (2015).
152. Piszczatowski, R. T. & Lents, N. H. Regulation of the CCN genes by vitamin D: A possible adjuvant therapy in the treatment of cancer and fibrosis. *Cell. Signal.* **28**, 1604–1613 (2016).
153. Brigstock, D. R. Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: Lessons from transgenic animals. *J. Cell Commun. Signal.* **4**, 1–4 (2010).
154. Peng, B. *et al.* Expression and role of connective tissue growth factor in painful disc fibrosis and degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **34**, E178–E182 (2009).
155. Erwin, W. M., Ashman, K., O'Donnel, P. & Inman, R. D. Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes. *Arthritis Rheum* **54**, 3859–3867 (2006).
156. Kubota, S. & Takigawa, M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci* **128**, 181–196 (2015).
157. El Kader, T. A. *et al.* The regenerative effects of CCN2 independent modules on chondrocytes in vitro and osteoarthritis models in vivo. *Bone* (2013). doi:10.1016/j.bone.2013.11.010
158. Nishida, T., Kubota, S. & Takigawa, M. in *Methods Mol. Biol.* **1489**, 273–282 (2017).
159. Abbott, R. *et al.* Degenerative grade affects the responses of human nucleus pulposus cells to link-N, CTGF, and TGF β 3. *J Spinal Disord Tech* **26**, E86–E94 (2013).
160. Yoon, S. T. & Patel, N. M. Molecular therapy of the intervertebral disc. *Eur. Spine J.* **15**, 280–286 (2006).
161. Tran, C. M. *et al.* Regulation of CCN2/connective tissue growth factor expression in the nucleus pulposus of the intervertebral disc: Role of smad and activator protein 1 signaling. *Arthritis Rheum.* **62**, 1983–1992 (2010).
162. Wan, Z. Y. *et al.* Downregulated interleukin 37 expression associated with aggravation of intervertebral disc degeneration. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 656–662 (2014).
163. Tian, Y. *et al.* TGF- β regulates Galectin-3 expression through canonical Smad3 signaling pathway in nucleus pulposus cells: Implications in intervertebral disc degeneration. *Matrix Biol.* **50**, 39–52 (2016).
164. Dahia, C. L., Mahoney, E. & Wylie, C. Shh signaling from the nucleus pulposus is required for the postnatal growth and differentiation of the mouse intervertebral disc. *PLoS One* **7**, (2012).
165. Dahia, C. L., Mahoney, E. J., Durrani, A. A. & Wylie, C. Intercellular Signaling Pathways Active During Intervertebral Disc Growth, Differentiation, and Aging. *Spine (Phila Pa 1976)* **34**, 456–462 (2009).

166. Chhabra, A. *et al.* GDF-5 deficiency in mice delays Achilles tendon healing. *J. Orthop. Res.* **21**, 826–835 (2003).
167. Mikic, B. Multiple effects of GDF-5 deficiency on skeletal tissues: Implications for therapeutic bioengineering. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 466–476 (2004).
168. Kadomatsu, H. *et al.* Injectable growth/differentiation factor-5-recombinant human collagen composite induces endochondral ossification via Sry-related HMG box 9 (Sox9) expression and angiogenesis in murine calvariae. *J. Periodontal Res.* **43**, 483–489 (2008).
169. Li, X., Leo, B. M., Beck, G., Balian, G. & Anderson, G. D. Collagen and proteoglycan abnormalities in the GDF-5-deficient mice and molecular changes when treating disk cells with recombinant growth factor. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **29**, 2229–34 (2004).
170. Feng, C., Liu, H., Yang, Y., Huang, B. & Zhou, Y. Growth and Differentiation Factor-5 Contributes to the Structural and Functional Maintenance of the Intervertebral Disc. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 1–16 (2015).
171. Chujo, T., An, H. S. & Akeda, K. Effects of Growth Differentiation Factor-5 on the Intervertebral Disc In Vitro Bovine Study and In Vivo Rabbit Disc Degeneration Model Study. *Spine (Phila Pa 1976)* **31**, 2909–2917 (2006).
172. Gruber, H. E., Hoelscher, G. L., Ingram, J. A., Bethea, S. & Hanley, E. N. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) in the human intervertebral annulus cells and its modulation by IL-1b and TNF-b in vitro. *Exp. Mol. Pathol.* **96**, 225–229 (2014).
173. Enochson, L., Stenberg, J., Brittberg, M. & Lindahl, a. GDF5 reduces MMP13 expression in human chondrocytes via DKK1 mediated canonical Wnt signaling inhibition. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 566–77 (2014).
174. Walsh, A. J. L., Bradford, D. S. & Lotz, J. C. In Vivo Growth Factor Treatment of Degenerated Intervertebral Discs. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **29**, 156–163 (2004).
175. Stoyanov, J. V *et al.* Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *Eur Cell Mater* **21**, 533–547 (2011).
176. Colombier, P. *et al.* TGF- b 1 and GDF5 Act Synergistically to Drive the Differentiation of Human Adipose Stromal Cells toward Nucleus Pulposus -like Cells. *Stem Cells* **34**, 653–667 (2016).
177. Lee, R. S., Kayser, M. V. & Ali, S. Y. Calcium phosphate microcrystal deposition in the human intervertebral disc. *J. Anat.* **208**, 13–19 (2006).
178. Hristova, G. I. *et al.* Calcification in human intervertebral disc degeneration and scoliosis. *J. Orthop. Res.* **29**, 1888–1895 (2011).
179. Rutges, J. P. H. J. *et al.* Hypertrophic differentiation and calcification during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 1487–1495 (2010).

180. Jin, L. *et al.* Annulus fibrosus cell characteristics are a potential source of intervertebral disc pathogenesis. *PLoS One* **9**, (2014).
181. Rodriguez, A. G. *et al.* Morphology of the human vertebral endplate. *J Orthop Res* **32**, 280–287 (2012).
182. Tang, P. *et al.* The NLRP3/Caspase-1/Interleukin-1 β Axis Is Active in Human Lumbar Cartilaginous Endplate Degeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **474**, 1818–1826 (2016).
183. Neidlinger-Wilke, C. *et al.* Molecular interactions between human cartilaginous endplates and nucleus pulposus cells: a preliminary investigation. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **39**, 1355–64 (2014).
184. Nosikova, Y., Santerre, J. P., Gryn timer, M. D. & Kandel, R. a. Annulus fibrosus cells can induce mineralization: An in vitro study. *Spine J.* **13**, 443–453 (2013).
185. Gawri, R. *et al.* High mechanical strain of primary intervertebral disc cells promotes secretion of inflammatory factors associated with disc degeneration and pain. *Arthritis Res Ther* **16**, R21 (2014).
186. Moon, H. J. *et al.* Annulus fibrosus cells interact with neuron-like cells to modulate production of growth factors and cytokines in symptomatic disc degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **37**, 2–9 (2012).
187. Freemont, a J. *et al.* Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J Pathol* **197**, 286–292 (2002).
188. Zhang, F., Zhao, X., Shen, H. & Zhang, C. Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration (Review). *Int. J. Mol. Med.* **37**, 1439–1448 (2016).
189. Chen, J.-W. *et al.* The responses of autophagy and apoptosis to oxidative stress in nucleus pulposus cells: implications for disc degeneration. *Cell. Physiol. Biochem.* **34**, 1175–89 (2014).
190. Ding, F., Shao, Z. & Xiong, L. Cell death in intervertebral disc degeneration. *Apoptosis* **18**, 777–85 (2013).
191. He, Z., Pu, L., Yuan, C., Jia, M. & Wang, J. Nutrition deficiency promotes apoptosis of cartilage endplate stem cells in a caspase-independent manner partially through upregulating BNIP3. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **49**, 25–32 (2017).
192. Park, J.-B., Lee, J.-K., Park, S.-J., Kim, K.-W. & Riew, K. D. Mitochondrial involvement in fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells. *J. Bone Joint Surg. Am.* **87**, 1338–42 (2005).
193. Korsmeyer, S. J. *et al.* Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**, 886–891 (1999).
194. Freemont, A. J. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology* **48**, 5–10 (2009).
195. Dierick, J. F. *et al.* Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 1011–1017 (2002).

196. Freund, A., Orjalo, A., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* **16**, 238–246 (2010).
197. Wang, F., Cai, F., Shi, R., Wang, X. H. & Wu, X. T. Aging and age related stresses: A senescence mechanism of intervertebral disc degeneration. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 398–408 (2016).
198. Feng, C. *et al.* Disc cell senescence in intervertebral disc degeneration: Causes and molecular pathways. *Cell Cycle* **15**, 1674–1684 (2016).
199. Jeon, O. H. *et al.* Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.* (2017). doi:10.1038/nm.4324
200. O’Connell, G. D., Vresilovic, E. J. & Elliott, D. M. Human intervertebral disc internal strain in compression: the effect of disc region, loading position, and degeneration. *J Orthop Res* **29**, 547–555 (2011).
201. Adams, M. A., McNally, D. S. & Dolan, P. “Stress” distributions inside intervertebral discs. The effects of age and degeneration. *J. Bone Joint Surg. Br.* **78**, 965–972 (1996).
202. Yong-Hing, K. & Kirkaldy-Willis, W. H. The pathophysiology of degenerative disease of the lumbar spine. *Orthop. Clin. North Am.* **14**, 491–504 (1983).
203. Stokes, I. A. F. & Iatridis, J. C. Mechanical Conditions That Accelerate Intervertebral Disc Degeneration: Overload Versus Immobilization Competing Hypotheses Concerning Which Mechanical Environments Accelerate Disc Degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **29**, 2724–2732 (2004).
204. Fujiwara, a *et al.* The effect of disc degeneration and facet joint osteoarthritis on the segmental flexibility of the lumbar spine. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **25**, 3036–3044 (2000).
205. Passias, P. G. *et al.* Segmental lumbar rotation in patients with discogenic low back pain during functional weight-bearing activities. *J. Bone Joint Surg. Am.* **93**, 29–37 (2011).
206. Iatridis, J. C. *et al.* Degeneration affects the anisotropic and nonlinear behaviors of human annulus fibrosus in compression. *J. Biomech.* **31**, 535–544 (1998).
207. Gu, W. Y. *et al.* The anisotropic hydraulic permeability of human lumbar annulus fibrosus. Influence of age, degeneration, direction, and water content. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **24**, 2449–2455 (1999).
208. Acaroglu, E. R. *et al.* Degeneration and aging affect the tensile behavior of human lumbar annulus fibrosus. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **20**, 2690–2701 (1995).
209. Gruber, H. E., Johnson, T., Norton, H. J. & Hanley, E. N. The sand rat model for disc degeneration: radiologic characterization of age-related changes: cross-sectional and prospective analyses. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **27**, 230–4 (2002).
210. Bach, F., Willems, N., Penning, L., Meij, B. & Ito, K. Potencial regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration in dogs. *BMC Vet. Res.* **10**, 1–12 (2014).

211. Alini, M. *et al.* Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur. Spine J.* **17**, 2–19 (2008).
212. Gullbrand, S. E. *et al.* A large animal model that recapitulates the spectrum of human intervertebral disc degeneration. *Osteoarthr. Cartil.* **25**, 146–156 (2017).
213. Ohtori, S., Inoue, G., Miyagi, M. & Takahashi, K. Pathomechanisms of discogenic low back pain in humans and animal models. *Spine J.* **15**, 1347–1355 (2015).
214. Daly, C., Ghosh, P., Jenkin, G., Oehme, D. & Goldschlager, T. A Review of Animal Models of Intervertebral Disc Degeneration: Pathophysiology, Regeneration, and Translation to the Clinic. *Biomed Res. Int.* **2016**, (2016).
215. Kroeber, M. W. *et al.* New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **27**, 2684–2690 (2002).
216. Iatridis, J. C., Mente, P. L., Stokes, I. A. F., Aronsson, D. D. & Alini, M. Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail mode. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **24**, 996–1002 (1999).
217. Growney Kalaf, E. A., Sell, S. A. & Bledsoe, J. G. Developing a mechanical and chemical model of degeneration in young bovine lumbar intervertebral disks and reversing loss in mechanical function. *J. Spinal Disord. Tech.* **27**, E168–75 (2014).
218. Yamada, K. *et al.* Investigation of the short-term effect of chemonucleolysis with chondroitinase ABC. *J. Vet. Med. Sci.* **63**, 521–525 (2001).
219. Chan, S. C. W., Bürki, A., Bonél, H. M., Benneker, L. M. & Gantenbein-Ritter, B. Papain-induced in vitro disc degeneration model for the study of injectable nucleus pulposus therapy. *Spine J.* **13**, 273–283 (2013).
220. Lotz, J. C. Animal Models of Intervertebral Disc Degeneration Lessons Learned. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **29**, 2742–2750 (2004).
221. Lucas, O. *et al.* Laser-treated Nucleus pulposus as an innovative model of intervertebral disc degeneration. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **237**, 1359–67 (2012).
222. Fusellier, M. *et al.* Longitudinal comparison of enzyme- and laser-treated intervertebral disc by MRI, X-ray, and histological analyses reveals discrepancies in the progression of disc degeneration: A rabbit study. *Biomed Res. Int.* **2016**, 5498271 (2016).
223. Sainoh, T. *et al.* Interleukin-6 and interleukin-6 receptor expression, localization, and involvement in pain-sensing neuron activation in a mouse intervertebral disc injury model. *J. Orthop. Res.* **33**, 1508–1514 (2015).
224. Luan, S. *et al.* Running exercise alleviates pain and promotes cell proliferation in a rat model of intervertebral disc degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 2130–2144 (2015).

225. James, G. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Treatment of Intervertebral Disc Lesion Prevents Fatty Infiltration and Fibrosis of the Multifidus Muscle, but not Cytokine and Muscle Fiber Changes. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **41**, 1 (2016).
226. Yue, B., Lin, Y., Ma, X., Zhang, G. & Chen, B. Effect of Survivin gene therapy via lentivirus vector on the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model. *Mol. Med. Rep.* **14**, 4593–4598 (2016).
227. Geldhof, E., Cardon, G., De Bourdeaudhuij, I. & De Clercq, D. Effects of a two-school-year multifactorial back education program in elementary schoolchildren. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **31**, 1965–1973 (2006).
228. Cardon, G. M., De Clercq, D. L. R. & De Bourdeaudhuij, I. M. M. Back education efficacy in elementary schoolchildren: a 1-year follow-up study. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **27**, 299–305 (2002).
229. Geldhof, E., Cardon, G., De Bourdeaudhuij, I. & De Clercq, D. Back posture education in elementary schoolchildren: A 2-year follow-up study. *Eur. Spine J.* **16**, 841–850 (2007).
230. Dolphens, M. *et al.* Long-term effectiveness of a back education programme in elementary schoolchildren: An 8-year follow-up study. *Eur. Spine J.* **20**, 2134–2142 (2011).
231. Durocher, A. & Laversin, S. Diagnostique, prise en charge et suivi des malades atteints de lombalgie chronique. *www.has-sante.fr* (2000). doi:10.1016/S1169-8330(02)00303-4
232. Lazary, A. *et al.* Primary prevention of disc degeneration-related symptoms. *Eur. Spine J.* **23**, (2014).
233. Williams, M. M., Hawley, J. A., McKenzie, R. A. & van Wijmen, P. M. A comparison of the effects of two sitting postures on back and referred pain. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **16**, 1185–91 (1991).
234. Ahlqvist, A., Hagman, M., Kjellby-Wendt, G. & Beckung, E. Physical Therapy Treatment of Back Complaints on Children and Adolescents. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **33**, E721–E727 (2008).
235. Belavý, D. L., Albracht, K., Bruggemann, G. P., Vergroesen, P. P. A. & van Dieën, J. H. Can Exercise Positively Influence the Intervertebral Disc? *Sport. Med.* **46**, 473–485 (2016).
236. Malko, J. a, Hutton, W. C. & Fajman, W. a. An in vivo magnetic resonance imaging study of changes in the volume (and fluid content) of the lumbar intervertebral discs during a simulated diurnal load cycle. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **24**, 1015–1022 (1999).
237. Dimitriadis, a T. *et al.* Intervertebral disc changes after 1 h of running: a study on athletes. *J. Int. Med. Res.* **39**, 569–579 (2011).
238. Kingsley, M. I. *et al.* Moderate-intensity running causes intervertebral disc compression in young adults. *Med. Sci. Sports Exerc.* **44**, 2199–2204 (2012).
239. Maher, C., Underwood, M. & Buchbinder, R. Non-specific low back pain. *Lancet* **389**, 736–47 (2017).

240. Andronis, L. *et al.* Cost-Effectiveness of Non-Invasive and Non-Pharmacological Interventions for Low Back Pain: a Systematic Literature Review. *Appl. Health Econ. Health Policy* **15**, 173–201 (2017).
241. Müller-Schwefe, G. *et al.* Treatment for chronic low back pain: the focus should change to multimodal management that reflects the underlying pain mechanisms. *Curr. Med. Res. Opin.* 1–12 (2017). doi:10.1080/03007995.2017.1298521
242. Abdel Shaheed, C., Maher, C. G., Williams, K. a & McLachlan, a J. Efficacy and tolerability of muscle relaxants for low back pain: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Pain* **21**, 1–10 (2016).
243. Bernstein, E., Carey, T. S. & Garrett, J. M. The use of muscle relaxant medications in acute low back pain. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **29**, 1346–1351 (2004).
244. Valat, J. P. & Rozenberg, S. Local corticosteroid injections for low back pain and sciatica. *Jt. Bone Spine* **75**, 403–407 (2008).
245. Sonne, M., Christensen, K., Hansen, S. E. & Jensen, E. M. Injection of steroids and local anaesthetics as therapy for low-back pain. *Scand. J. Rheumatol.* **14**, 343–5 (1985).
246. Hadra, B. E. Wiring the spinus processes in Pott’s disease. *J. Bone Jt. Surg.* **s1-4**, (1891).
247. Atkinson, L. & Zacest, A. Surgical management of low back pain. *Med. J. Aust.* **204** (8), 299–300 (2016).
248. Deyo, R. a, Gray, D. T., Kreuter, W., Mirza, S. & Martin, B. I. United States trends in lumbar fusion surgery for degenerative conditions. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **30**, 1441–1445; discussion 1446–1447 (2005).
249. Theodore, N. & Sonntag, V. K. Spinal surgery: the past century and the next. *Neurosurgery* **46**, 767–77 (2000).
250. Galbusera, F. *et al.* Design concepts in lumbar total disc arthroplasty. *Eur. Spine J.* **17**, 1635–1650 (2008).
251. Mobbs, R. J., Phan, K., Malham, G., Seex, K. & Rao, P. J. Lumbar interbody fusion: techniques, indications and comparison of interbody fusion options including PLIF, TLIF, MI-TLIF, OLIF/ATP, LLIF and ALIF. *J. Spine Surg.* **3**, 2–18 (2015).
252. Tropiano, P., Giorgi, H., Faure, A. & Blondel, B. Surgical techniques for lumbo-sacral fusion. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **103**, S151–S159 (2016).
253. DiPaola, C. P. & Molinari, R. W. Posterior lumbar interbody fusion. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **16**, 130–139 (2008).
254. Lee, N. *et al.* Comparison of outcomes of anterior-, posterior- and transforaminal lumbar interbody fusion surgery at a single lumbar level with degenerative spinal disease. *World Neurosurg.* **S1878-8750**, 30140–7 (2017).

255. Piazzolla, A. *et al.* Cotrel-Dubousset instrumentation in neuromuscular scoliosis. *Eur. Spine J.* **20**, (2011).
256. De Giorgi, G., Stella, G., Becchetti, S., Martucci, G. & Miscioscia, D. Cotrel-Dubousset instrumentation for the treatment of severe scoliosis. *Eur. Spine J.* **8**, 8–15 (1999).
257. Videbaek, T. S. *et al.* Circumferential fusion improves outcome in comparison with instrumented posterolateral fusion: long-term results of a randomized clinical trial. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **31**, 2875–2880 (2006).
258. Deyo, R. A. & Mirza, S. K. Trends and variations in the use of spine surgery. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 139–46 (2006). doi:10.1097/01.blo.0000198726.62514.75
259. Martin, B. I. *et al.* Are lumbar spine reoperation rates falling with greater use of fusion surgery and new surgical technology? *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **32**, 2119–2126 (2007).
260. Fan, G. *et al.* Clinical Outcomes of Posterior Lumbar Interbody Fusion versus Minimally Invasive Transforaminal Lumbar Interbody Fusion in Three-Level Degenerative Lumbar Spinal Stenosis. *Biomed Res. Int.* (2016). doi:10.1155/2016/9540298
261. Keorochana, G., Setrkraising, K., Woratanarat, P., Arirachakaran, A. & Kongtharvonskul, J. Clinical outcomes after minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion and lateral lumbar interbody fusion for treatment of degenerative lumbar disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurg. Rev.* 1–16 (2016). doi:10.1007/s10143-016-0806-8
262. Nardi, A. *et al.* Domino Effect : mechanic factors role. *Clin Cases Min. Bone Metab* **8**, 38–42 (2011).
263. Harrop, J. S. *et al.* Lumbar adjacent segment degeneration and disease after arthrodesis and total disc arthroplasty. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **33**, 1701–1707 (2008).
264. Zigler, J. & Delamarter, R. Five-year results of the prospective, randomized, multicenter, Food and Drug Administration investigational device exemption study of the ProDisc-L total disc replacement versus circumferential arthrodesis for the treatment of single-level degenerative di. *J. Neurosurg. Spine* **17**, 493–501 (2012).
265. Shin, S. R. & Tornetta, P. Donor Site Morbidity After Anterior Iliac Bone Graft Harvesting. *J. Orthop. Trauma* **30**, 340–343 (2016).
266. Younger, E. M. & Chapman, M. W. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Traum* **3**, 192–195 (1989).
267. Pollock, R. *et al.* Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: A comparison between minimally invasive and open techniques. *Eur. Spine J.* **17**, 845–852 (2008).
268. Silber, J. S. *et al.* Donor Site Morbidity After Minimally Invasive Anterior Iliac Crest Bone Graft Harvest. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **28**, 134–139 (2003).
269. France, J. C., Schuster, J. M., Moran, K. & Dettori, J. R. Iliac Crest Bone Graft in Lumbar Fusion: The Effectiveness and Safety Compared with Local Bone Graft, and Graft Site Morbidity Comparing

- a Single-Incision Midline Approach with a Two-Incision Traditional Approach. *Glob. spine J.* **5**, 195–206 (2015).
270. Carlisle, E. & Fischgrund, J. S. Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *Spine J.* **5**, 240S–249S (2005).
271. Whang, P. G. & Wang, J. C. Bone graft substitutes for spinal fusion. *Spine J.* **3**, 155–165 (2003).
272. Vaccaro, A. R. *et al.* Bone grafting alternatives in spinal surgery. *Spine J.* **2**, 206–215 (2002).
273. Liao, Z. Q. G., Lam, R. W., Hu, T. M. & Wong, H. K. Dose-dependent Nerve Inflammatory Response to rhBMP-2 in a Rodent Spinal Nerve Model. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **1** (2016). doi:10.1097/BRS.0000000000002044
274. Bae, H. W. *et al.* Transient Local Bone Remodeling Effects of rhBMP-2 in an Ovine Interbody Spine Fusion Model. *J. Bone Jt. Surg.* **98**, 2061–2070 (2016).
275. Brower, R. S. & Vickroy, N. M. A case of psoas ossification from the use of BMP-2 for posterolateral fusion at L4-L5. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **33**, E653–5 (2008).
276. Wong, D. A., Kumar, A., Jatana, S., Ghiselli, G. & Wong, K. Neurologic impairment from ectopic bone in the lumbar canal: a potential complication of off-label PLIF/TLIF use of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Spine J.* **8**, 1011–1018 (2008).
277. Mannion, A. F., Brox, J.-I. & Fairbank, J. C. Consensus at last! Long-term results of all randomized controlled trials show that fusion is no better than non-operative care in improving pain and disability in chronic low back pain. *Spine J.* **16**, 588–90 (2016).
278. Malham, G. M. *et al.* Anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2: a prospective study of complications. *J Neurosurg Spine* **21**, 851–860 (2014).
279. Crandall, D. G. *et al.* Transforaminal Lumbar Interbody Fusion With rhBMP-2 in Spinal Deformity, Spondylolisthesis, and Degenerative Disease—Part 1. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **38**, 1128–1136 (2013).
280. Behrbalk, E. *et al.* Fusion and subsidence rate of stand alone anterior lumbar interbody fusion using PEEK cage with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Eur. Spine J.* **22**, 2869–2875 (2013).
281. Cortesi, P. A. *et al.* Epidemiologic and Economic Burden Attributable to First Spinal Fusion Surgery. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **1** (2017). doi:10.1097/BRS.0000000000002118
282. Lykissas, M. G. & Aichmair, A. Current concepts on spinal arthrodesis in degenerative disorders of the lumbar spine. *World J. Clin. Cases* **1**, 4–12 (2013).
283. Eliasberg, C. D., Kelly, M., Ajiboye, R. & Soohoo, N. Complications and Rates of Subsequent Lumbar Surgery Following Lumbar Total Disc Arthroplasty and Lumbar Fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* **41**, 173–181 (2016).

284. Basho, R. & Hood, K. a. Cervical total disc arthroplasty. *Glob. spine J.* **2**, 105–8 (2012).
285. Lin, E. L. & Wang, J. C. Total disk arthroplasty. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **14**, 705–14 (2006).
286. Szpalski, M., Gunzburg, R. & Mayer, M. Spine arthroplasty: a historical review. *Eur. Spine J.* **11 Suppl 2**, S65–84 (2002).
287. Yue, J. J., Garcia, R. & Miller, L. E. The activL Artificial Disc: A next-generation motion-preserving implant for chronic lumbar discogenic pain. *Med. Devices Evid. Res.* **9**, 75–84 (2016).
288. Mróz, A., Skalski, K. & Walczyk, W. New lumbar disc endoprosthesis applied to the patient's anatomic features. *Acta Bioeng. Biomech.* **17**, 25–34 (2015).
289. Delécrin, J. *et al.* Effects of lumbar artificial disc design on intervertebral mobility: In vivo comparison between mobile-core and fixed-core. *Eur. Spine J.* **21**, 630–640 (2012).
290. Zeh, A., Becker, C., Planert, M., Lattke, P. & Wohlrab, D. Time-dependent release of cobalt and chromium ions into the serum following implantation of the metal-on-metal Maverick™ type artificial lumbar disc (Medtronic Sofamor Danek). *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **129**, 741–746 (2009).
291. Guyer, R. D. *et al.* Five-Year Follow-Up of a Prospective, Randomized Trial Comparing Two Lumbar Total Disc Replacements. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **41**, 3–8 (2016).
292. Bisseling, P. *et al.* Metal ion levels in patients with a lumbar metal-on-metal total disc replacement: should we be concerned? *J. bone Jt. Surg.* **93**, 949–54 (2011).
293. Van Ooij, A., Oner, F. & Verbout, A. Complications of artificial disc replacement: a report of 27 patients with the SB Charité disc. *J. Spinal Disord. Tech.* **16**, 369–383 (2003).
294. Murtagh, R. D., Quencer, R. M., Cohen, D. S., Yue, J. J. & Sklar, E. L. Normal and Abnormal Imaging Findings in Lumbar Total Disk Replacement: Devices and Complications. *RadioGraphics* **29**, 105–118 (2009).
295. Punt, I. M. *et al.* Complications and reoperations of the SB Charité lumbar disc prosthesis: Experience in 75 patients. *Eur. Spine J.* **17**, 36–43 (2008).
296. Shim, C. S. *et al.* Partial disc replacement with the PDN prosthetic disc nucleus device: early clinical results. *J. Spinal Disord. Tech.* **16**, 324–30 (2003).
297. Bertagnoli, R. & Schönmayr, R. Surgical and clinical results with the PDN prosthetic disc-nucleus device. *Eur. Spine J.* **11 Suppl 2**, S143–S148 (2002).
298. Katsimihas, M. *et al.* Prospective clinical and radiographic results of Charité III artificial total disc arthroplasty at 2- to 7-year follow-up: A Canadian experience. *Can. J. Surg.* **53**, 408–414 (2010).
299. Park, S.-J. *et al.* Long-term Outcomes Following Lumbar Total Disc Replacement Using ProDisc-II Average 10-year follow-up at a single institute. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **41**, 971–977 (2016).

300. Trincat, S., Edgard-Rosa, G., Geneste, G. & Marnay, T. Two-level lumbar total disc replacement: Functional outcomes and segmental motion after 4 years. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **101**, 17–21 (2015).
301. Quirno, M. *et al.* Biomechanical analysis of a disc prosthesis distal to a scoliosis model. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **34**, 1470–1475 (2009).
302. Van De Kelft, E. & Verguts, L. Clinical outcome of monosegmental total disc replacement for lumbar disc disease with ball-and-socket prosthesis (maverick): Prospective study with four-year follow-up. *World Neurosurg.* **78**, 355–363 (2012).
303. Assaker, R. *et al.* Maverick total disc replacement in a real-world patient population: a prospective, multicentre, observational study. *Eur. Spine J.* **24**, 2047–2055 (2015).
304. Meir, A. R., Freeman, B. J. C., Fraser, R. D. & Fowler, S. M. Ten-year survival and clinical outcome of the AcroFlex lumbar disc replacement for the treatment of symptomatic disc degeneration. *Spine J.* **13**, 13–21 (2013).
305. Fisahn, C. *et al.* Ulf Fernström (1915–1985) and his Contributions to the Development of Artificial Disc Replacements. *World Neurosurg.* **98**, 278–280 (2017).
306. Zhang, Z., Zhao, L., Qu, D. & Jin, D. Artificial nucleus replacement: surgical and clinical experience. *Orthop. Surg.* **1**, 52–57 (2009).
307. Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J. & Froba, M. Silica based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angew Chem Int Ed* **45**, 3216–51 (2006).
308. Song, S.-W., Hidajat, K. & Kawi, S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. *Langmuir* **21**, 9568–75 (2005).
309. Medda, L., Casula, M. F., Monduzzi, M. & Salis, A. Adsorption of Lysozyme on Hyaluronic Acid Functionalized SBA-15 Mesoporous Silica : A Possible Bioadhesive Depot System. *Langmuir* **30**, 12996–13004 (2014).
310. Vinu, A., Murugesan, V. & Hartmann, M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *J. Phys. Chem. B* **108**, 7323–7330 (2004).
311. Horcajada P, A. Ramila, Pérez-Pariente, J. & Vallet-Regi, M. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Microporous Mesoporous Mater.* **68**, 105–109 (2004).
312. Xue, M. & Findenegg, G. H. Lysozyme as a pH-responsive valve for the controlled release of guest molecules from mesoporous silica. *Langmuir* **28**, 17578–84 (2012).
313. Slowing II, Trewyn, B. G. & Lin, V. S. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. *J Am Chem Soc* **129**, 8845–8849 (2007).
314. Tourne-Peteilh, C. *et al.* Sol-gel one-pot synthesis in soft conditions of mesoporous silica materials ready for drug delivery system. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **61**, 455–462 (2012).

315. Zhang, H. *et al.* Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: Colloidal vs pyrolytic. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 15790–15804 (2012).
316. Rambaud, F., Vallé, K., Thibaud, S. & Sanchez, C. One-Pot Synthesis of Functional Helicoidal Hybrid Organic–Inorganic Nanofibers with Periodically Organized Mesoporosity. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 2896–2905 (2009).
317. Buchtova, N. *et al.* Nanocomposite hydrogels for cartilage tissue engineering: mesoporous silica nanofibers interlinked with siloxane derived polysaccharide. *J Mater Sci Mater Med* **24**, 1875–1884 (2013).
318. Bourges, X., Weiss, P., Daculsi, G. & Legeay, G. Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* **99**, 215–228 (2002).
319. Mathieu, E. *et al.* Intramyocardial Delivery of Mesenchymal Stem Cell-Seeded Hydrogel Preserves Cardiac Function and Attenuates Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *PLoS One* **7**, e51991 (2012).
320. Vinatier, C. *et al.* Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. A* **80**, 66–74 (2007).
321. Iatridis, J. C., Nicoll, S. B., Michalek, A. J., Walter, B. A. & Gupta, M. S. Role of biomechanics in intervertebral disc degeneration and regenerative therapies: what needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair? *Spine J.* **13**, 243–262 (2013).
322. Charnay, C. *et al.* Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *Eur J Pharm Biopharm* **57**, 533–540 (2004).
323. Ma, Z., Bai, J., Wang, Y. & Jiang, X. Impact of Shape and Pore Size of Mesoporous Silica Nanoparticles on Serum Protein Adsorption and RBCs Hemolysis. *ACS Appl Mater Interfaces* **6**, 2431–2438 (2014).
324. Schlipf, D. M., Rankin, S. E. & Knutson, B. L. Pore-Size Dependent Protein Adsorption and Protection from Proteolytic Hydrolysis in Tailored Mesoporous Silica Particles. *ACS Appl Mater Interfaces* **5**, 10111–7 (2013).
325. Liu, J., Li, C., Yang, Q., Yang, J. & Li, C. Morphological and Structural Evolution of Mesoporous Silicas in a Mild Buffer Solution and Lysozyme Adsorption. *Langmuir* **23**, 7255–7262 (2007).
326. Gai, S. *et al.* Uniform and size-tunable mesoporous silica with fibrous morphology for drug delivery. *Dalt. Trans* **41**, 4511–4516 (2012).
327. Tang, F., Li, L. & Chen, D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv. Mater.* **24**, 1504–1534 (2012).
328. Gascón, V., Díaz, I., Márquez-Álvarez, C. & Blanco, R. M. Mesoporous silicas with tunable morphology for the immobilization of laccase. *Molecules* **19**, 7057–7071 (2014).

329. Bharti, B., Meissner, J., Klapp, S. H. L. & Findenegg, G. H. Bridging interactions of proteins with silica nanoparticles: The influence of pH, ionic strength and protein concentration. *Soft Matter* **10**, 718–728 (2014).
330. Lei, H. *et al.* Control of lysozyme adsorption by pH on surfaces modified with polyampholyte brushes. *Langmuir* **30**, 501–508 (2014).
331. Moradi, O., Modarress, H. & Norouzi, M. The Effects of Concentration, pH, and Ionic Strength on Lysozyme Adsorption onto AA and HEMA Contact Lenses. *Iran. Polym. J.* **12**, 477–484 (2003).
332. Hudson, S., Cooney, J. & Magner, E. Proteins in mesoporous silicates. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 8582–8594 (2008).
333. Moerz, S. T. & Huber, P. Protein adsorption into mesopores: a combination of electrostatic interaction, counterion release, and van der waals forces. *Langmuir* **30**, 2729–2737 (2014).
334. Moerz, S. T. & Huber, P. PH-Dependent Selective Protein Adsorption into Mesoporous Silica. *J. Phys. Chem. C* **119**, 27072–27079 (2015).
335. Kumar, S., Aswal, V. K. & Callow, P. pH-Dependent Interaction and Resultant Structures of Silica Nanoparticles and Lysozyme Protein. *Langmuir* **30**, 1588–1598 (2014).
336. Meissner, J., Prause, A., Bharti, B. & Findenegg, G. H. Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: influence of pH and ionic strength. *Colloid Polym. Sci.* **293**, 3381–3391 (2015).
337. Sang, L.-C., Vinu, A. & Coppens, M.-O. General description of the adsorption of proteins at their iso-electric point in nanoporous materials. *Langmuir* **27**, 13828–37 (2011).
338. Tamanna, T., Bulitta, J. B. & Yu, A. Controlling antibiotic release from mesoporous silica nano drug carriers via self-assembled polyelectrolyte coating. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **26**, 117 (2015).
339. Park, S. B., Joo, Y.-H., Kim, H., Ryu, W. & Park, Y. Biodegradation-tunable mesoporous silica nanorods for controlled drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **50**, 64–73 (2015).
340. Autissier, A., Le Visage, C., Pouzet, C., Chaubet, F. & Letourneur, D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater.* **6**, 3640–8 (2010).
341. Mishra, B., Vuppu, S. & Rath, K. The role of microbial pullulan, a biopolymer in pharmaceutical approaches: A review. *J. Appl. Pharm. Sci.* **1**, 45–50 (2011).
342. Célia Monteiro de Paula, R., Andrade Feitosa, J. & Beserra Paula, H. Polysaccharide based Copolymers as Supramolecular Systems in Biomedical Applications. *Curr. Drug Targets* **16**, 1591–1605 (2015).
343. Leathers, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 468–473 (2003).

344. Shingel, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydr. Res.* **339**, 447–460 (2004).
345. Cheng, K.-C., Demirci, A. & Catchmark, J. M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 29–44 (2011).
346. Lack, S., Dulong, V., Picton, L., Le Cerf, D. & Condamine, E. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate : a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydr. Res.* **342**, 943–953 (2007).
347. Thébaud, N. *et al.* Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels : A pre-requisite. *J Mater Sci Mater Med* **18**, 339–345 (2007).
348. Purnama, A. *et al.* Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* (2013). doi:10.1007/s13346-013-0177-4
349. Lu, K.-Y. *et al.* Development of a new type of multifunctional fucoidan-based nanoparticles for anticancer drug delivery. *Carbohydr. Polym.* **165**, 410–420 (2017).
350. Bertram, H. *et al.* Matrix-assisted cell transfer for intervertebral disc cell therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1185–1192 (2005).
351. Zeng, Y. *et al.* Injectable microcryogels reinforced alginate encapsulation of mesenchymal stromal cells for leak-proof delivery and alleviation of canine disc degeneration. *Biomaterials* **59**, 53–65 (2015).
352. Masuda, K. *et al.* Evaluation of carboxymethylpullulan as a novel carrier for targeting immune tissues. *Pharm. Res.* **18**, 217–223 (2001).
353. Prajapati, V. D., Jani, G. K. & Khanda, S. M. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydr. Polym.* **95**, 540–549 (2013).
354. Morimoto, N. *et al.* Self-assembled pH-sensitive cholesteryl pullulan nanogel as a protein delivery vehicle. *Biomacromolecules* **14**, 56–63 (2013).
355. Nishimura, T. *et al.* A Light Sensitive Self-Assembled Nanogel as a Tecton for Protein Patterning Materials. *Chem. Commun.* **52**, 1222–1225 (2015).
356. Sugino, Y., Tabata, Y., Matsumura, T. & Toda, Y. Liver targeting of human interferon- β with pullulan based on metal coordination. *J. Control. Release* **83**, 75–88 (2002).
357. Kim, K., Cheng, J., Liu, Q., Wu, X. Y. & Sun, Y. Investigation of mechanical properties of soft hydrogel microcapsules in relation to protein delivery using a MEMS force sensor. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **92**, 103–113 (2010).
358. Aydogdu, H., Keskin, D., Baran, E. T. & Tezcaner, A. Pullulan microcarriers for bone tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **63**, 439–449 (2016).

359. Yang, R. *et al.* Tween-80 and impurity induce anaphylactoid reaction in zebrafish. *J. Appl. Toxicol.* **35**, 295–301 (2015).
360. Woo, K. & Seib, P. A. Cross-linking of wheat starch and hydroxypropylated wheat starch in alkaline slurry with sodium trimetaphosphate. *Carbohydr. Polym.* **33**, 263–271 (1997).
361. Lack, S. *et al.* Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study. *Polym. Bull.* **436**, 429–436 (2004).
362. Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 49–60 (2012).
363. Heo, J. *et al.* Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug Deliv. Transl. Res.* **6**, 148–158 (2016).
364. Michalek, A. J., Funabashi, K. L. & Iatridis, J. C. Needle puncture injury of the rat intervertebral disc affects torsional and compressive biomechanics differently. *Eur. Spine J.* **19**, 2110–2116 (2010).
365. Martin, J. T. *et al.* Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration. *J. Orthop. Res.* **31**, 1276–1282 (2013).
366. Elliott, D. M. *et al.* The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **33**, 588–596 (2008).
367. Peh, W. C. G. Provocative discography: Current status. *Biomed. Imaging Interv. J.* **1**, 1–7 (2005).
368. Brandon, D. & Kaplan, W. D. *Microstructural Characterization of Materials*. (2008).
369. Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*. (Ithaca, 1953).
370. Li, J. & Mooney, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 16071 (2016).
371. Holland, T. A., Tessmar, J. K. V, Tabata, Y. & Mikos, A. G. Transforming growth factor- β 1 release from oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment. *J. Control. Release* **94**, 101–114 (2004).
372. Nath, S. D., Linh, N. T., Sadiasa, A. & Lee, B. T. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bonetissue regeneration. *J. Biomater. Appl.* **28**, 1151–1163 (2013).
373. Holland, T. A., Tabata, Y. & Mikos, A. G. Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Control. Release* **101**, 111–125 (2005).
374. Wenk, E., Meinel, A. J., Wildy, S., Merkle, H. P. & Meinel, L. Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering. *Biomaterials* **30**, 2571–2581 (2009).

375. Illien-Jünger, S. *et al.* Homing of Mesenchymal Stem Cells in Induced Degenerative Intervertebral Discs in a Whole Organ Culture System. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **37**, 1865–1873 (2012).
376. Pattappa, G. *et al.* Ccl5 / Rantes Is a Key Chemoattractant Released By Degenerative Intervertebral Discs in Organ Culture. *Eur Cell Mater* **1**, 124–136 (2014).
377. Vadalà, G. *et al.* The transpedicular approach for the study of intervertebral disc regeneration strategies: in vivo characterization. *Eur. Spine J.* **22 Suppl 6**, S972–8 (2013).
378. Vadalà, G. *et al.* A Nucleotomy Model with Intact Annulus Fibrosus to Test Intervertebral Disc Regeneration Strategies. *Tissue Eng. Part C Methods* **21**, 150708114614002 (2015).
379. Russo, F. *et al.* Biomechanical Evaluation of Transpedicular Nucleotomy with Intact Annulus Fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)* (2016).
380. Russo, F. *et al.* Biomechanical Evaluation of Transpedicular Nucleotomy with Intact Annulus Fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)* **42**, E193–E201 (2016).
381. Le Fournier, L. *et al.* The Transpedicular surgical approach for the development of intervertebral disc targeting regenerative strategies in an ovine model. *Eur Spine J* **Accepted**, (2017).
382. Shimoda, L. A. *et al.* 55th Bowditch Lecture: Effects of chronic hypoxia on the pulmonary circulation: role of HIF-1. *J. Appl. Physiol.* **113**, 1343–52 (2012).
383. Nachemson, A. L. Disc pressure measurements. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **6**, 93–7 (1981).
384. Wilmink, J. . in *Lumbar Spinal Imaging Radicular Pain Relat. Cond.* 9–30 (Springer Berlin Heidelberg, 2010). doi:10.1007/978-3-540-93830-9
385. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 49–63 (2014).

Thèse de Doctorat

Nina HENRY

Médecine régénératrice du disque intervertébral : Développement de biomatériaux pour la libération prolongée de facteurs de croissance

Intervertebral disc regenerative medicine: Biomaterials design for growth factors sustained delivery

Résumé

La lombalgie liée à la dégénérescence du disque intervertébral (DIV) est un problème majeur de santé publique touchant une large proportion de nos populations vieillissantes. Actuellement, la prise en charge de cette maladie est essentiellement symptomatique mais grâce à de récentes découvertes, les processus de dégénérescence discale sont aujourd'hui mieux compris. Ces nouvelles connaissances permettent d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi ces stratégies et afin de répondre aux stades précoces de cette maladie, une attention particulière est portée sur les stratégies impliquant l'injection intradiscale de facteurs de croissance tels que le GDF-5 ou le TGF- β 1, ciblant les processus de dégénérescence du DIV. En dépit de résultats encourageants concernant la sécurité d'utilisation et la tolérance clinique de ces facteurs de croissance, leur efficacité clinique doit encore être améliorée. Pour cela, l'utilisation de biomatériaux permettant une libération prolongée et la protection des facteurs de croissance, présente un intérêt majeur. Ce travail de thèse a donc pour objectif le développement de systèmes à libération prolongée de ces deux facteurs de croissance. Pour ce faire, deux biomatériaux ont été étudiés : les nanofibres de silice et les microbilles de pullulane. Pour ces deux matériaux, leurs synthèses et caractérisations ont été réalisées avant de s'intéresser à leur potentiel d'adsorption et de libération des facteurs de croissance. Les résultats obtenus sont très encourageants puisqu'ils montrent une libération prolongée jusqu'à 28 jours in vitro avec un maintien de l'activité biologique des facteurs de croissance libérés. L'ensemble des données de cette thèse suggère le potentiel prometteur des systèmes présentés pour le développement de stratégies innovantes pour la médecine régénératrice DIV.

Mots clés

Biomatériaux, Libération prolongée, TGF- β , GDF-5, Médecine régénératrice, Disque intervertébral

Abstract

Low back pain caused by the intervertebral disc (IVD) degeneration is a major health concern affecting a large proportion of our aging populations. While current treatments of this disease are mainly symptomatic, recent discoveries have allowed a better understanding of the degenerative processes and new therapeutic strategies have been envisioned. Among these strategies, there is a growing interest for approaches aiming at tackling early stages of this disease, involving the intradiscal injection of growth factors such as GDF-5 or TGF- β 1, able to target IVD degenerative processes. However, despite encouraging results regarding the safety and clinical tolerance of these growth factors, their clinical efficacy has to be further improved. To this end, the use of biomaterials allowing the sustained release and the protection of growth factors is of particular interest.

The objective of this thesis is thus to develop systems able to deliver these two growth factors in a long period of time. Therefore, two biomaterials were studied: silica nanofibers and pullulan microbeads. For both materials, their syntheses and characterizations were studied, as well as their potential use for growth factors adsorption and release. Promising results were obtained demonstrating a sustained release for up to 28 days in vitro, while maintaining the released growth factors biological activity. Altogether, these data suggest that these newly designed systems may be promising candidates for the development of innovative strategies for the IVD regenerative medicine.

Keywords

Biomaterials, Sustained Release, TGF- β , GDF-5, Regenerative medicine, Intervertebral disc