

Conception et caractérisation d'un hydrogel bioactif pour la
régénération du disque intervertébral

par

Gbéïté Atma-Luseck ADOUNGOTCHODO

THÈSE PAR ARTICLES PRÉSENTÉE À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE
SUPÉRIEURE COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION
DU DOCTORAT EN GÉNIE
Ph. D.

MONTRÉAL, LE 26 AOÛT 2022

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC



Gbéïté Atma-Luseck Adoungotchodo, 2022



Cette licence [Creative Commons](#) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY

CETTE THÈSE A ÉTÉ ÉVALUÉE

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

Mme Sophie Lerouge, directrice de thèse
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

M. Jackson Mwale, codirecteur de thèse
Département de Chirurgie à l'Université McGill

M. Rachid Aissaoui, président du jury
Département de génie des systèmes à l'École de technologie supérieure

M. Éric Wagnac, membre du jury
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

M. Simon Mattoori, examinateur externe
Faculté de Pharmacie à l'Université de Montréal

ELLE A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 10 AOÛT 2022

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

À mon grand-père Guendéhou

REMERCIEMENTS

Cette thèse était une succession d'expériences autant scientifiques que personnelles qui m'ont permis de me former sur le plan professionnel mais surtout de me découvrir et de grandir en tant que personne. Les succès, les obstacles et tous les défis que j'y ai rencontrés ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. J'éprouve une profonde reconnaissance pour toutes les personnes qui, à travers un mot, un encouragement, de courtes ou de longues discussions m'ont consciemment ou inconsciemment aidé à persévérer et aller au bout de cette belle aventure.

J'aimerais remercier du fond de mon cœur ma directrice de thèse Sophie Lerouge. Elle m'a accueillie dans son laboratoire à cœur et bras ouverts après quelques minutes de discussion. Sophie merci pour ta bienveillance, ton humanisme, ta disponibilité et ton souci du bien-être de l'autre. Merci de m'avoir communiqué ta rigueur scientifique et ta passion pour la recherche qui m'ont incité à donner le meilleur de moi-même et à persévérer malgré les obstacles.

Je remercie aussi mon co-directeur Fackson Mwale pour sa disponibilité, ses mots d'encouragement et toutes les opportunités qu'il m'a présenté pour mieux faire connaître mes travaux. Fackson, à travers nos discussions et expériences vécues ensemble, tu m'as permis de me redécouvrir et de mettre des mots sur mes valeurs en tant que scientifique et en tant que personne. Merci infiniment de m'avoir donné l'occasion de grandir en tant que personne.

J'avais commencé ce projet avec Yasaman Alinejad que je tiens à remercier sincèrement. Merci de m'avoir formé, de m'avoir pris sous tes ailes, de m'avoir appris à mettre de l'eau dans mon vin et d'avoir toujours cru en moi.

J'aimerais remercier aussi Laura Epure et Michael Grant pour leurs contributions et leur expertise dans la réalisation de ces travaux. J'ai beaucoup appris à vos côtés autant sur la recherche que sur moi-même. Merci énormément.

VIII

Merci à Éric Wagnac et à Élisabeth Laroche pour leur implication dans le projet. C'était un plaisir pour moi d'avoir collaboré avec vous sur une partie du projet.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté évaluer ma thèse. Merci pour votre disponibilité, votre passion et toutes vos critiques constructives pour l'amélioration de cette thèse.

Je tiens également à remercier le CRSNG, le FRQNT, l'ÉTS et ma directrice pour m'avoir fourni un support financier durant ces années de thèse et me permettre ainsi de me consacrer entièrement à mes travaux de recherche. Merci au CRCHUM, aux laboratoires des professeures Hébert et Arbour pour m'avoir permis d'utiliser certains de leurs équipements durant cette thèse.

J'aimerais remercier aussi Prasum Lala du SARA à L'ÉTS pour m'avoir initié et donné le goût de la vulgarisation scientifique.

Merci à mes collègues du LBeV notamment Francesco, Maedeh, Nick, Capucine, Fatima, Tommy, Thierry, Werner, Ève, Roja et Inès pour ces beaux moments de partage. Capucine et Maedeh merci de m'avoir permis de travailler avec vous sur vos projets respectifs. Merci Francesco pour toutes ces belles discussions scientifiques et personnelles, elles vont beaucoup me manquer. C'était moins lourd de partager mes galères de thésard avec vous tous. Je suis extrêmement reconnaissante de vous avoir eu comme collègues durant ces dernières années.

Pour commencer et persévérer jusqu'à la fin de ce thème, j'ai eu besoin de ma famille et de mes amis que je tiens à remercier aussi.

D'abord je tiens à remercier mes parents. Merci à vous de m'avoir instruite et d'avoir mis à mes dispositions tout ce dont j'avais besoin pour réussir. Merci papa, de m'avoir toujours encouragé, j'ai commencé cette thème un peu à cause de toi. Merci de m'avoir transmis ta rigueur et ton intégrité qui m'ont bien servi durant cette thème. Merci d'avoir lu et corrigé cette

thèse aussi. Merci maman, de m'avoir appris à lire, j'en ai eu bien besoin durant cette thèse. Merci d'avoir consacré ta vie à nous tes enfants. Je ne pourrai jamais te remercier suffisamment. Merci infiniment à vous deux.

Merci à mes frères Amdivi, Ecklusion et ma sœur Libérale pour leur présence, leurs mots d'encouragement. Vos réussites sont une source d'inspiration et de persévérance pour moi. Je suis extrêmement fière de vous. Merci à toi Martial de compléter aussi bien notre famille. Merci de permettre à ma sœur d'être là pour moi. Merci également à mes tantes Cathérine et Victoire ainsi que mes cousines et cousins pour leur soutien inconditionnel.

Merci à mes beaux-parents pour leur soutien inconditionnel, leur amour et leur joie de vivre. Merci Mme Godonou pour tout ce que tu fais pour moi. Je t'en suis extrêmement reconnaissante. Merci aussi à mon beau-frère, mes belles sœurs et leurs conjoints respectifs d'avoir toujours été présents pour m'écouter quand j'en ai eu besoin. Merci infiniment pour votre amour.

Je remercie également mes amis en dehors du labo qui ont été un support moral important pour moi durant ces années. Merci à vous pour votre présence et tout votre amour envers moi et ma famille. Je suis contente de vous avoir comme deuxième famille. Rénia, merci d'avoir toujours été là et de ne m'avoir jamais laissé tomber. Je me sens encore plus forte quand je sais que tu es là. Merci pour tout.

Merci également à la Fondation Inspire de me permettre d'utiliser mes compétences pour une cause aussi noble. J'apprends beaucoup à vos côtés Prévost, Gaétan et tous les autres membres.

Je réserve quelques mots aussi à ma fille Sènami que j'ai eu durant cette thèse. Ma belle Sènami, ton humeur enjouée, ton sourire, ton insouciance ont été une source intarissable de réconfort et de légèreté pour moi durant cette thèse. Je te souhaite une belle vie, remplie de belles expériences. J'espère que, quand tu seras en mesure de lire ces lignes, tu seras fière de m'avoir comme maman.

X

J'aimerais finir en disant merci à mon conjoint. Merci Rocard pour ton amour, ton soutien à toute épreuve. Merci de m'avoir encouragé à commencer cette thèse, merci d'avoir été mon relecteur pour mes multiples documents, mon spectateur et réviseur pour mes milles et une présentations, mon psychologue quand j'avais des inquiétudes sur ma thèse. Merci de m'avoir toujours encouragé à aller au bout de mes rêves. Merci d'être le papa merveilleux que tu es pour Sènami. Merci aussi de jouer la maman quand je ne suis pas là. Merci d'être mon refuge et mon roc.

Merci à toutes celles et tous ceux et qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Conception et caractérisation d'un hydrogel bioactif pour la régénération du disque intervertébral

Gbéïté Atma-Luseck ADOUNGOTCHODO

RÉSUMÉ

Le traitement minimalement invasif de la dégénérescence du disque intervertébral constitue une approche intéressante pour pallier les insuffisances des techniques chirurgicales actuelles. Ce type de technologie requiert l'encapsulation de cellules dans des matrices injectables avec ou sans facteurs bioactifs. Idéalement, la matrice injectable doit permettre de renforcer mécaniquement le tissu dégénéré pendant que les facteurs bioactifs stimulent les cellules encapsulées à produire les composants nécessaires pour la régénération du tissu. Pour ce faire, la matrice doit respecter à la fois des spécifications mécaniques et biologiques précises.

Compte tenu de leur teneur élevée en eau et leur versatilité, les hydrogels injectables constituent des candidats très intéressants. Cependant, les hydrogels actuellement développés peinent à respecter à la fois les spécifications mécaniques et biologiques nécessaires à leur performance clinique. Des formulations d'hydrogels de chitosane thermosensibles et une molécule bioactive, le Link N respectivement développés ou évalué dans les laboratoires des professeurs Sophie Lerouge et Fackson Mwale pourraient pallier ces insuffisances. Le Link N est une molécule bioactive favorisant la synthèse de protéoglycans, un composant important de la matrice extracellulaire du disque responsable de ses propriétés mécaniques en compression.

L'objectif du projet est de développer et de démontrer le potentiel de ces hydrogels associés au Link N, à restaurer les propriétés biomécaniques du disque notamment sa partie centrale: le noyau pulpeux (NP). Le projet fait l'hypothèse selon laquelle, ces formulations d'hydrogels une fois optimisées et associées au Link N, posséderaient les propriétés mécaniques adéquates et seraient capables de permettre l'encapsulation des cellules, assurer leur survie ainsi que la production d'une matrice extracellulaire appropriée à l'obtention d'un tissu fonctionnel ayant les propriétés proches du NP sain.

Dans un premier temps, une étude d'optimisation a été effectuée et a permis de sélectionner une formulation optimale constituée de 2%w/v de chitosane, 75mM de sodium hydrogénocarbonate et de 100mM de β glycérophosphate. Cette formulation est liquide et stable à température ambiante et injectable à travers une aiguille (22 gauge). Elle présente une vitesse de gélification adéquate et des propriétés mécaniques en compression et en torsion proches de celles du NP humain, après complète gélification. Les propriétés de ce gel permettent l'encapsulation et la survie des cellules du NP (plus de 80% de viabilité après 14 jours de culture). Cependant, la quantité de protéoglycans produite est sous-optimale. Cette activité de synthèse a été améliorée par l'ajout du Link N (100 μ /mL) et de la gélatine (1%w/v) dans une seconde étape du projet. L'efficacité de ces facteurs bioactifs a été évaluée et confirmée dans un milieu de culture répliquant la composition biochimique d'un disque dégénéré et indique donc le potentiel clinique de la méthode.

Dans une troisième étape, des tests *ex vivo* dans un modèle de disque bovin dégénéré ont été effectués afin d'évaluer la capacité du gel à restaurer les propriétés mécaniques du disque. Cependant, la diffusion de la solution de dégénération en dehors du NP vers le reste du disque nous a empêchée d'aller au bout de cette étape. Néanmoins, un protocole a été mis au point afin de définir les paramètres importants à prendre en compte pour effectuer de façon fiable ce type d'étude.

Finalement, en vue d'évaluer le potentiel de transfert clinique de la technologie, la viabilité des cellules souches/stromales mésenchymateuses (MSC) encapsulées dans ce gel a été étudiée. Ces résultats montrent que la sensibilité de ces cellules et le manque de motifs d'adhésion cellulaire dans le gel de chitosane ne favorisent pas suffisamment la survie des MSC dans le gel. La technologie reste donc à améliorer afin de remédier à ce manque d'adhésion cellulaire, critique pour les MSC qui sont les plus appropriées pour une utilisation clinique de cette technologie.

Mots-clés: Chitosane, hydrogel injectable, disque intervertébral, noyau pulpeux, propriétés mécaniques, gélatine, Link N

Design and characterization of a bioactive hydrogel for intervertebral disc regeneration

Gbéïté Atma-Luseck ADOUNGOTCHODO

ABSTRACT

The minimally invasive treatment of intervertebral disc degeneration is an interesting approach to overcome the shortcomings of current surgical techniques. This type of technology requires the encapsulation of cells in injectable scaffolds with or without bioactive factors. The injectable scaffolds will mechanically reinforce the degenerated tissue while the bioactive factors stimulate the encapsulated cells to produce the components necessary for the tissue's regeneration. In this order, the scaffold must fill both precise mechanical and biological requirements.

Given their high water content and their versatility, injectable hydrogels are very interesting candidates. However, the hydrogels currently developed struggle to meet simultaneously the mechanical and biological specifications necessary for their clinical performance. Novel thermoresponsive chitosan hydrogels formulations and a bioactive molecule, Link N respectively developed or evaluated in the laboratories of Professors Sophie Lerouge and Jackson Mwale could overcome these shortcomings. Link N is a bioactive molecule promoting the synthesis of proteoglycans, an important component of the extracellular matrix of the disc responsible for its mechanical properties in compression.

The objective of the project is to develop and demonstrate the potential of these hydrogels associated with Link N, to restore the biomechanical properties of the disc, in particular its central part: the nucleus pulposus (NP). The project hypothesizes that these hydrogel formulations, once optimized and associated with Link N, would possess the appropriate mechanical properties and would be suitable for the encapsulation of cells, ensuring their survival as well as the production of an appropriate extracellular matrix.

Firstly, an optimization study was carried out to select an optimal formulation consisting of 2% w/v of chitosan, 75 mM of sodium hydrogen carbonate and 100 mM of β glycerophosphate. This formulation is liquid and stable at room temperature and injectable through a needle (22 gauge). It has an adequate gelation rate and mechanical properties in compression and shear close to those of human NP, after complete gelation. The properties of this gel allow encapsulation and survival of NP cells (> 80% viability after 14 days of culture). However, the amount of proteoglycans produced is suboptimal. This proteoglycans production was improved by adding Link N (100 μ /mL) and gelatin (1%w/v) in a second step of the project. The efficacy of these bioactive factors has been evaluated and confirmed in a culture medium replicating the biochemical composition of a degenerated disc and therefore indicates the clinical potential of the method.

In a third step, *ex vivo* tests in a degenerated bovine disc model were carried out to evaluate the capacity of the gel to restore the mechanical properties of the disc. However, the diffusion of the degeneration solution outside the NP towards the rest of the disc prevented us from

going through with this step. Nevertheless, a protocol has been developed to define the important parameters to be considered to reliably perform this type of study.

Finally, to assess the potential for clinical transfer of the technology, the viability of mesenchymal stem/stromal cells (MSC) encapsulated in this gel was studied. These results show that the sensitivity of these cells and the lack of cell adhesion patterns in the chitosan gel induce a low cell viability for encapsulated MSC. Therefore, the technology remains to be improved to increase the viability of MSCs which are the most appropriate cells for clinical application of this technology.

Keywords: Chitosan, injectable hydrogel, intervertebral disc, nucleus pulposus, mechanical properties, gelatin, Link N

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
1.1 Contexte clinique	5
1.1.1 Le disque intervertébral : anatomie et fonction	5
1.1.1.1 Description générale	5
1.1.1.2 L'anneau fibreux	7
1.1.1.3 Le noyau pulpeux (NP).....	8
1.1.1.4 Les plaques cartilagineuses.....	9
1.1.2 Biomécanique et fonctionnement normal du disque.....	11
1.1.2.1 Le disque en compression.....	13
1.1.2.2 Le disque en cisaillement.....	16
1.1.3 Dégénérescence du disque intervertébral.....	18
1.1.3.1 Mécanisme de la dégénérescence du disque intervertébral	19
1.1.3.2 Les différents grades de dégénérescence du DIV	21
1.1.3.3 Effets de la dégénérescence sur la biomécanique de la colonne.....	23
1.1.3.4 Traitements actuels et leurs limites.....	23
1.2 La régénération du disque intervertébral	27
1.2.1 Thérapie cellulaire et ingénierie tissulaire : concepts et définitions	27
1.2.2 Cahier des charges d'une matrice injectable pour le noyau pulpeux.....	29
1.2.2.1 Objectif général.....	29
1.2.2.2 Les contraintes	29
1.2.2.3 Attributs et spécifications techniques	31
1.3 État de l'art.....	33
1.3.1 Les lignées cellulaires pour la régénération du disque intervertébral.....	33
1.3.1.1 Les cellules du noyau pulpeux (CNP)	34
1.3.1.2 Les chondrocytes	36
1.3.1.3 Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC)	37
1.3.2 Les agents bioactifs pour la régénération du disque intervertébral.....	39
1.3.2.1 Le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β)	39
1.3.2.2 Le facteur de différenciation 5 (GDF-5).....	41
1.3.2.3 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1).....	42
1.3.2.4 La protéine morphogénétique osseuse 7 (BMP-7).....	42
1.3.2.5 Le peptide Link N	43
1.3.3 Les hydrogels : d'excellentes matrices injectables	45
1.3.3.1 Définition	45
1.3.3.2 Classification selon la source du polymère.....	46
1.3.3.3 Classification selon le type de liaisons dans le réseau polymérique	51
1.3.4 Les hydrogels injectables pour le disque intervertébral : état de l'art	53

1.3.4.1	Les hydrogels chimiques.....	53
1.3.4.2	Les hydrogels physiques	55
1.3.4.3	Résumé de l'état de l'art sur les hydrogels	62
1.3.5	Le chitosane et les hydrogels de chitosane	66
1.3.5.1	Mécanisme de formation des hydrogels thermosensibles de chitosane	67
1.3.5.2	Des hydrogels de chitosane avec de meilleures propriétés mécaniques.....	69
CHAPITRE 2 HYPOTHÈSES, OBJECTIFS DU PROJET.....		73
2.1	Résumé de la revue de littérature.....	73
2.2	Objectifs et hypothèses spécifiques du projet.....	74
2.2.1	Premier objectif.....	74
2.2.2	Second objectif.....	74
2.2.3	Troisième objectif	75
2.2.4	Quatrième objectif	76
CHAPITRE 3 INJECTABLE CHITOSAN HYDROGELS WITH ENHANCED MECHANICAL PROPERTIES FOR NUCLEUS PULPOSUS REGENERATION.....		77
3.1	Mise en contexte	77
3.2	Abstract.....	78
3.3	Introduction.....	79
3.4	Materials and methods	81
3.4.1	Chitosan hydrogel preparation.....	81
3.4.2	Selection of the chitosan hydrogel formulations	82
3.4.3	Hydrogels characterization	83
3.4.3.1	Rheological properties	83
3.4.3.2	Mechanical properties	83
3.4.3.3	Hydrogels cytocompatibility.....	85
3.4.4	Injectability in human NP	86
3.4.5	Statistical analysis.....	87
3.5	Results.....	87
3.5.1	Rheological properties	87
3.5.2	Mechanical properties of hydrogels using unconfined compression and dynamic shear.....	89
3.5.3	Osmolality.....	90
3.5.4	Cytocompatibility of the hydrogels with disc cells.....	91
3.5.5	GAG synthesis by the encapsulated NP cells	92
3.5.6	Hydrogels injectability in human NP.....	93
3.6	Discussion.....	95
3.7	Conclusion	99

CHAPITRE 4	INJECTABLE CHITOSAN HYDROGELS SUPPLEMENTED WITH GELATIN AND LINK N ENHANCE EXTRACELLULAR MATRIX DEPOSITION BY ENCAPSULATED CELLS IN A DEGENERATIVE INTERVERTEBRAL DISC ENVIRONMENT	101
4.1	Mise en contexte	101
4.2	Abstract	102
4.3	Introduction.....	103
4.4	Materials and Methods.....	105
4.4.1	Source of chitosan, gelatin, and Link N.....	105
4.4.2	Preparation of CH and CH/gelatin hydrogels	106
4.4.3	Hydrogels gelation kinetic	106
4.4.4	Unconfined compression	106
4.4.5	Isolation of NP cells.....	107
4.4.6	Encapsulation of cells in CH and CH/gelatin gels.....	107
4.4.7	Link N diffusion in the gel.....	108
4.4.8	Effect of gelatin and Link N on encapsulated NP cells	109
4.4.9	Statistical analysis.....	110
4.5	Results.....	110
4.5.1	Effect of gelatin on rheological and unconfined compression properties of CH hydrogels	110
4.5.2	Effect of gelatin on the viability and GAG production of cells encapsulated in CH hydrogels	112
4.5.3	Diffusion of LN within the hydrogel	113
4.5.4	Effect of LN on GAG production by cells encapsulated in CH hydrogel	114
4.5.5	Additive effect of LN and gelatin on GAG production in normal and degenerative environment.....	117
4.5.6	Cell viability of encapsulated NP cells supplemented with either LN or TGF- β	119
4.6	Discussion.....	122
4.7	Conclusions.....	126
CHAPITRE 5	EFFECT OF COCCYGEAL LEVELS, INTER-SPECIMEN VARIABILITY, STORAGE CONDITIONS, AND DEGENERATION ON MECHANICAL PROPERTIES OF BOVINE CAUDAL INTERVERTEBRAL DISCS	129
5.1	Mise en contexte	129
5.2	Abstract	130
5.3	Introduction.....	131
5.4	Material and methods.....	132
5.4.1	Sample preparation	132
5.4.2	Degeneration model	134
5.4.3	Histology.....	134
5.4.4	Mechanical testing	134

5.4.5	Effect of inter-specimen variability, coccygeal levels, and incubation time on healthy disc mechanical properties	137
5.4.6	Effect of the degeneration model on discs' mechanical properties	137
5.5	Results.....	139
5.5.1	Degeneration model	139
5.5.2	Effects of coccygeal levels, previous testing, and storage conditions on the mechanical behavior of discs in compression.....	141
5.5.3	Comparison between degenerated and healthy discs.....	144
5.6	Discussion.....	147
5.7	Conclusion	149
CHAPITRE 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES : VIABILITÉ ET PRODUCTION DE PROTÉOGLYCANES PAR LES CELLULES STROMALES MÉSENCHYMATEUSES (MSC) ENCAPSULÉES DANS LES GELS DE CHITOSANE.....		151
6.1	Mise en contexte	151
6.2	Viabilité et production de GAG par les MSC encapsulées dans les gels de chitosane en présence du Link N	152
6.2.1	Objectif	152
6.2.2	Méthodologie	152
6.2.3	Résultats et discussion	153
6.3	Comment peut-on améliorer la viabilité des cellules MSC dans les gels de chitosane	155
6.3.1	Est-ce que le gel relargue des produits nocifs pour les MSC ?.....	155
6.3.1.1	Contexte et objectif	155
6.3.1.2	Méthodologie	157
6.3.1.3	Résultats et discussion	157
6.3.2	Est-ce que la méthode de culture serait trop restrictive pour les MSC ?	158
6.3.2.1	Contexte	158
6.3.2.2	Méthodologie	159
6.3.2.3	Résultats et discussion	160
6.3.3	Effet de l'ajout de la gélatine sur la viabilité des MSC	161
6.3.3.1	Contexte	161
6.3.3.2	Méthodologie	161
6.3.3.3	Résultats et discussions.....	161
6.3.4	Milieu de culture optimale pour la culture 3D des MSC	162
6.3.4.1	Contexte	162
6.3.4.2	Méthodologie	163
6.3.4.3	Résultats et discussions.....	163
CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE.....		165
7.1	Des propriétés mécaniques proches de celles du NP	166
7.2	Le gel de chitosane permet une bonne viabilité pour les cellules encapsulées dans les gels de chitosane	175

7.3	Le gel procure aux cellules NP un environnement propice à la synthèse de matrice extracellulaire.....	178
7.4	Dégradation des gels versus la vitesse de production des GAG	181
7.5	Les MSC pour un transfert clinique de la technologie	184
7.6	Résumé : Originalités du projet	186
7.7	Perspectives pour le traitement minimalement invasif de la dégénérescence du disque	186
	CONCLUSION	189
	ANNEXE I DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE 1.....	193
	LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	195

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.1	Spécifications techniques d'une matrice injectable pour le disque intervertébral
	34
Tableau 1.2	Hydrogels chimiques étudiés dans la littérature
	56
Tableau 1.3	Hydrogels physiques étudiés dans la littérature
	63
Tableau 3.1	Hydrogels composition and osmolality
	83
Tableau 5.1	Experimental protocol to evaluate the effect of the degeneration model on the discs' mechanical properties in unconfined compression
	138
Tableau 5.2	Flexibility test protocol
	139
Tableau 5.3	Equilibrium modulus of disc after a first round of unconfined compression test.....
	143

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	Schéma d'une colonne vertébrale humaine6
Figure 1.2	a) Schéma montrant les structures principales du disque intervertébral b) Image d'un disque intervertébral bovin caudal7
Figure 1.3	Schéma montrant les échanges entre le disque et son environnement durant et après un chargement11
Figure 1.4	Les différentes parties du disque intervertébral, leurs compositions et l'organisation de la matrice extracellulaire12
Figure 1.5	Schématisation d'une unité fonctionnelle de la colonne : deux vertèbres séparées par un disque A) sans charge et B) sous compression14
Figure 1.6	A) Schématisation d'un test de compression non confinée B) Test incrémenté de compression en relaxation de contrainte C) Courbe de la contrainte à l'équilibre en fonction de la déformation15
Figure 1.7	Schématisation du test de compression confinée16
Figure 1.8	Schématisation du test de cisaillement sur le noyau pulpeux18
Figure 1.9	Schéma montrant le déséquilibre dans la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire, responsable de la dégénérescence du disque21
Figure 1.10	État macroscopique du disque dépendamment du stade de dégénérescence23
Figure 1.11	Schéma d'une colonne ayant subi une fusion spinale a) le disque est remplacé par une greffe osseuse autologue. b) Il est remplacé par une prothèse en métal25
Figure 1.12	Exemples de prothèses de remplacement total du disque intervertébral26
Figure 1.13	Principe de la thérapie cellulaire28
Figure 1.14	Injection de cellules du disque (NP et AF) dans un modèle canin36

Figure 1.15	Caractérisation de la matrice extracellulaire produite par des cellules encapsulées dans un hydrogel de chitosane	37
Figure 1.16	Le noyau pulpeux de disques canins explantés produit une quantité plus importante de protéoglycans en présence du TGF- β	40
Figure 1.17	Hauteur normalisée du disque dégénéré après injection du Link-N ou d'une solution saline.....	45
Figure 1.18	Exemples d'interactions dans A) un gel physique B) un gel chimique	50
Figure 1.19	Structure chimique du chitosane	66
Figure 1.20	Mécanisme de formation des hydrogels de chitosane.....	67
Figure 1.21	Évolution des modules de stockage et de perte d'un gel thermosensible à 37°C (tgel= temps de gélification). Le mélange est liquide dans le cadre bleu et solide dans le cadre orange	68
Figure 1.22	Propriétés mécaniques en compression des nouvelles formulations d'hydrogels de chitosane.....	70
Figure 1.23	Viabilité des lymphocytes T encapsulées dans les hydrogels de chitosane	71
Figure 3.1	Novel hydrogel formulations are more stable at RT than BGP0.4 hydrogel. (A) Evolution of complex viscosity with time at 22°C immediately after mixing. Mean \pm SD (n=3). **p<0.01, ****p<0.0001 compared to t=15s for each formulation. (B) Evolution of storage modulus (G') with time at 22°C. Mean (n=3).....	88
Figure 3.2	Chitosan hydrogels are thermosensitive with rapid kinetic of gelation. Evolution of storage (G') and loss (G'') moduli with time at 37 °C (strain 5%, frequency 1 Hz) immediately following preparation. Mean (n=3-4)	88
Figure 3.3	(A) Mean stress-strain curve of the hydrogels in unconfined compression test (after 24h at 37 °C) (n=3-5). (B) Secant modulus of the hydrogels in unconfined compression test at 15% deformation and (C) at 50% deformation (BGP0.4 hydrogels did not withstand 50% deformation and they are shown as not applicable (NA) in the graph). Mean \pm SD (n=3-5). *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 compared to BGP0.4 and between hydrogels (using bars)	90

Figure 3.4	SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02 hydrogels show mechanical properties like human NP tissue. Equilibrium moduli of hydrogels measured using incremental stress relaxation during unconfined compression (Five steps of 5% strain at 5%/s, followed by 5min of relaxation in PBS). Mean \pm SD (n = 5-6). ***P < 0.001, ****P < 0.0001 compared to human NP tissue	91
Figure 3.5	Cytocompatibility of the chitosan hydrogels. (A) LIVE/DEAD assay performed on cells encapsulated in hydrogels and cultured for 14 days. Scale bar represents 100 μ m. (B) Percentage of viable cells according to cell counting on LIVE/DEAD images. Mean \pm SD (n = 4). (C) Metabolic activity of the cells encapsulated in hydrogels after 14 days. Mean \pm SD (n = 9). (D) DNA content in the cell-laden hydrogels after 14 days (expressed as percentage of DNA content in the BGP0.4 hydrogel). Mean \pm SD (n = 9). ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 compared to BGP0.4 and between hydrogels (using bars).....	92
Figure 3.6	GAG production and retention in hydrogels. (A) Total GAG synthesized by encapsulated NP cells for 7 days (GAG accumulated in the hydrogels is presented as patterned area). Mean \pm SD (n = 9). (B) Table of Total GAG synthesized, accumulated in hydrogels and released in medium (measured in μ g). Mean \pm SD (n = 9). For total GAG, *** p<0.001, **** p<0.0001 compared to BGP0.4 and between hydrogels (using bars). For accumulated GAG, + p<0.05, ++ p<0.01 and ++++ p<0.0001 compared to BGP0.4 and between hydrogels (using bars).....	94
Figure 3.7	SCH0.075PB0.02 hydrogel was injected into human degenerated IVD. (A) Injection of the toluidine blue-stained hydrogel into the degenerated NP of human cadaveric degenerated IVD (grade 3) using a 25-gauge needle. (B&C) Macroscopic evaluation of an axially dissected disc following 30 minutes incubation at 37°C for donor 1 and 2. Note that the solution filled the nuclear clefts, and no evidence of hydrogel (blue) extrusion was observed.....	95

Figure 4.1	Effect of gelatin concentration on rheological and unconfined compression properties of chitosan hydrogels. (a, b) Time sweep experiments of chitosan hydrogel solutions as a function of gelatin concentration (0, 1, 1.5, and 2% w/v) (a) Evolution of storage modulus with time at 22° C (to confirm stability at room temperature) followed by temperature increase to 37° C (strain 1%, frequency 1 Hz, data shown as mean, n=3) (b) Evolution of storage modulus with time at 37° C (strain 5%, frequency 1 Hz, data shown as mean, n = 3) (c, d) Unconfined compression : (c) Mean stress versus strain curves (up to 70% of deformation at 100%/min, n = 4); (d) Secant modulus of hydrogels at 15% deformation (Mean ± SD n = 8, *p< 0.05 compared to control). Tests were performed on cylindrical samples (14 mm diameter, 9 mm height) left to gel for 24 hours at 37° C.....	112
Figure 4.2	Viability of nucleus pulposus (NP) cells encapsulated in CH and CH/gelatin hydrogels using a) Live/Dead assay performed after 1 or 14 days in culture. No significant differences were observed between conditions in terms of cell viability. Scale bar represents 300 µm (green for living cells and red for dead cells) b) Percentage of viable cells according to cell counting on LIVE/DEAD© images. Data are shown as Mean ± SD, n = 3.....	114
Figure 4.3	Glycosaminoglycan (GAG) production by encapsulated nucleus pulposus (NP) cells in CH or in CH/gelatin hydrogels. NP cells were encapsulated in CH or in CH/gelatin (1, 1.5 and 2% w/v) hydrogels and cultured in normal medium for 14 days. (a) Total GAG production (in construct and released in the media) was analyzed by the DMMB assay (b) GAG production was normalized to DNA quantity (measured by PicoGreen assay (n = 12-14, **** p < 0.0001, ** p < 0.01).....	115
Figure 4.4	Link-N (LN) diffusion within the CH and CH/1% gelatin hydrogels. 5-FAM conjugated LN was placed on top of the chitosan hydrogels with or without gelatin. The media was retrieved and analyzed spectrophotometrically to quantify the remaining LN in the media at each time point. This amount was subtracted from the initial LN content to assess the amount of LN that diffused in the gel. LN concentration in the gel after 1, 3 and 24 H are shown as Mean ± SD, n = 4-6)	116

- Figure 4.5 Proteoglycan (GAG) production by encapsulated NP cells treated with LN. Bovine NP cells were encapsulated in CH hydrogels and cultured in either normal or degenerative media in the presence of LN (10, 25 and 100 µg/mL) or media without peptide supplementation for 14 days. Glycosaminoglycan (GAG) content was taken as a measurement of proteoglycan. Total GAG production per construct in (a) normal and (b) degenerative media. GAG production per 1µg DNA in (c) normal and (d) degenerative media. Data are expressed as Mean ± SD, Anova One Way followed by Turkey Test, n =7; **** p<0.0001 (compared to control).....118
- Figure 4.6 Proteoglycan production by encapsulated NP treated with either LN or TGF-β. NP cells were seeded in CH or CH/1%gelatin hydrogel and cultured in (a, c) normal or (b, d) degenerative media in the presence of 100 µg/mL LN, 50 ng/mL TGF-β or media without peptide supplementation for 14 days. Glycosaminoglycan (GAG) content was taken as a measurement of proteoglycan. Data shown as Mean ± SD, Two- Way ANOVA followed by Turkey post-hoc comparison, (*p<0.05, ****p<0.0001 compared to control without gelatin, ###p<0.001, ##### p<0.0001 compared to control with gelatin, \$ p<0.05, \$\$\$ p<0.001, \$\$\$\$p<0.0001, n = 8-16)120
- Figure 4.7 Effect of LN or TGF-β supplementation on bovine nucleus pulposus (NP) cell viability encapsulated in CH or CH/1% gelatin scaffolds. (a) Live/dead© assay performed at 14 days on NP cells encapsulated in hydrogel with or without gelatin in normal and degenerative media alone (control), supplemented with 50 ng/mL TGF-β or 100 µg/mL LN. Scale bar represents 200 µm. Green for living cells and red for dead cells. (b, c) Percentage of viable cells according to cell counting on LIVE/DEAD© images. Data are shown as Mean ± SD, n = 3, Two- Way ANOVA followed by Turkey post-hoc comparison. * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001121
- Figure 5.1 Preparation of samples for mechanical characterization. Soft tissues were removed from the tail and 3 to 4 motion segments (delimited by the dotted rectangles) were extracted by cutting through adjacent vertebrae for unconfined compression test. The coccygeal level is labelled from Cd1 to Cd4 in the cranio-caudal direction (indicated on the figure by the arrow). For the flexibility test, one motion segment (solid line rectangle) was extracted per tail by cutting through Cd1-Cd2 and Cd3-Cd4 intervertebral discs133

- Figure 5.2 Unconfined compression and flexibility tests on motion segment (disc with adjacent vertebrae) A) Samples for compression were placed in a custom chamber filled with PBS 1X on MTS 858 Mini Bionix II testing machine B) Incremental stress relaxation test was performed on samples in unconfined compression (10 cycles of preconditioning followed by 5 series of 3% deformation, each followed by 10 min of relaxation) C) Samples for flexibility were tested in flexion/extension and lateral bending using the torsional motor of a Bose Flexiforce 3220-AT and a custom translation table to ensure pure moment. D) Fifteen cycles were performed for each movement. A cycle starts at the neutral position of the sample (0 Nm), a rotation is imposed at 1°/s until a moment of 1.5 Nm is reached, then the rotation is reversed until it reaches -1.5 Nm. The cycle ends when the sample returns to its neutral position.....136
- Figure 5.3 Papain induces time- and dose-dependant degeneration on bovine discs. Papain solution injected (60U/mL or 150U/mL) in the NP through AF and incubated at 37°C for 1, or 3 days. A) Macroscopic picture of the discs cut after 1 or 3 days of incubation. B) NP and C) AF tissues stained with hematoxylin eosin (H&E) D) NP and E) AF stained with safranin-O (S-O) (red squares show the hole created in the tissue by the degeneration process).....141
- Figure 5.4 The mechanical behavior of discs from the same bovine tails under unconfined compression varies depending on the disc level and decreases with time and when repeating the tests. A, B, C) 3-4 motion segments per tail were tested in unconfined compression 24h after sample preparation; D) Relative equilibrium was obtained after testing the same discs a second time (48h after sample preparation) in unconfined compression (test 2 was not performed on disc Cd4-Cd5 for tail 3).....143
- Figure 5.5 Papain degeneration model induces a decrease of the equilibrium modulus in compression in bovine discs. Papain solution was injected in the NP, and after 24h of incubation at 37°C, ebselen was injected to stop the papain effect. The control group (healthy disc) was submitted to similar steps, but the solutions were replaced by PBS. A) Equilibrium modulus was calculated from incremental test performed on the samples 24h after ebselen injection. Discs Cd1-Cd2 were used for degenerated group and discs Cd2-Cd3 for the control group. B) Relative variation of equilibrium modulus was calculated by dividing the value of each sample by its own control. Data shown as mean ±std, n=4144

Figure 5.6:	Papain and storage conditions induce modifications to the discs' mechanical properties in flexion/extension and lateral bending. A) Range of motion (ROM); B) Neutral zone; C, D) Stiffness in flexion, extension, and lateral bending for degenerated disc (gray column) and control disc (black column) at the following timepoints: Initial (Test 1); 24h after papain injection (test 2); 24h after ebselen injection (test 3); 24h later (test 4). In the control group, samples were only incubated at 37°C without injection. Results are expressed relative to the results of test 1. Data are shown as mean ± std, n=3. One sample in the degenerated group broke during the fourth test and was not included in the data for this test (n=2 instead of 3).....	146
Figure 6.1	Le Link N stimule une production plus accrue de GAG par les MSC dans le milieu dégénératif. Les MSC ont été encapsulées dans le gel de chitosane et cultivées dans différents milieux pendant 14 jours. A) La quantité totale de GAG produite a été évaluée par le test de DMMB B) La quantité de GAG normalisée à celle de l'ADN a été obtenue en divisant la quantité de GAG par la quantité d'ADN (évalué par le test de PicoGreen). Les données sont montrées en tant que moyenne ± écart-type, n=7-10 §§p<0.01, §§§p<0.0001 comparativement à la condition avec le Link N, *p<0.05, ***p<0.0001 comparativement à la condition α-mem	154
Figure 6.2	Les MSC encapsulées dans les gels de chitosane présentent une viabilité relativement faible. Les MSC sont A) encapsulées dans le gel de chitosane ou B) cultivées en 2D dans différents milieux. La viabilité des cellules a été évaluée par Live/Dead après 1, 7 ou 14 jours de culture. La barre d'échelle représente 200µm. Les cellules vivantes sont en vert et les mortes en rouge	156
Figure 6.3	Les MSC cultivés en 2D avec des milieux incubés avec le gel présentent une excellente viabilité. Les MSC ont été cultivées pendant 24h ou 3 jours avec le milieu incubé avec le gel pendant 24h (gauche) ou 3jours (droite). La barre d'échelle représente 200µm. Les cellules vivantes sont en vert et les mortes en rouge	158
Figure 6.4	Les MSC présentent une faible viabilité dans le gel malgré un changement de milieu plus fréquent. La barre d'échelle représente 400µm. Les cellules vivantes sont en vert et les mortes en rouge	159

Figure 6.5	Les MSC présentent une faible viabilité cellulaire indépendamment de la concentration de chitosane dans le gel, la quantité de milieux et la surface de culture utilisés. Les MSC ont été encapsulées dans le gel de chitosane avec 1.5 ou 2% de chitosane et cultivées dans des puits de plaque de 24 ou 48 puits avec 2 ou 0.5mL de milieu dégénératif (+10% FBS) respectivement. La barre d'échelle représente 400µm. Les cellules vivantes sont en vert et les mortes en rouge.....	160
Figure 6.6	Les MSC présentent une meilleure viabilité quand elles sont encapsulées dans un gel de collagène comparativement à quand elles le sont dans un gel de chitosane/gélatine. La barre d'échelle représente 200µm.....	162
Figure 6.7	Les MSC encapsulées dans le gel présente une meilleure viabilité dans le milieu NutriStem® Les MSC humaines encapsulées dans le gel de chitosane 2% SHC0.0075MBGP0.1M. A) La viabilité a été évaluée par live/Dead et le B) taux de viabilité a été calculée en faisant le ratio entre les cellules vivantes (vertes) et le nombre total de cellules. Les cellules mortes sont représentées par les points rouges. Les données sont exprimées selon la moyenne ± écart-type, n=4. La barre d'échelle représente 200µm	164
Figure 7.1	Tests de compression cycliques sur la formulation optimale (SGC0.075BGP0.1M). Le gel a été préparé et incubé à 37°C pendant 24h. 50 cycles à une amplitude de 15% de déformation ont été appliqués aux échantillons à une fréquence de 0.2 Hz. A) Courbes de contrainte et déformation de quelques cycle B) Hauteur du gel au début du cycle de compression, n=2	172
Figure 7.2	Tests de compression non confinée des gels obtenus en combinant le gel de chitosane (CH) et le gel de gélatine réticulé en présence de transglutaminase (Gel T). Les deux gels ont été produits séparément et mixés ensuite à différents ratios volumiques. Le Gel T a été produit en mixant de la gélatine A à 10% w/v avec la transglutaminase (10U/mL) à un ratio de 10U d'enzyme par gramme de gélatine. Le gel de CH contient 2% de CH 75mM SHC et 100mM BGP. Chaque échantillon a été incubé à 37°C pendant 24h et un test de compression non confinée a été effectué (70% de déformation à une vitesse de 100%/min).....	174
Figure 7.3	Les propriétés mécaniques du gel SHC0.075BGP0.1 baissent significativement en 24h en présence de sérum dans le milieu de culture. Les gels de chitosane complètement gélifiés ont été immersés dans différentes solutions. Les gels ont été testés en compression non confinée après 24h d'incubation.....	183

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADSC	Cellules souches d'origine adipeuse
AF	Anneau fibreux
AH	Acide hyaluronique
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	Acide ribonucléique
BGP	Bêta Glycérophosphate
BMP-7	Protéine morphogénétique osseuse 7
BMSC	Cellules souches/stromales dérivées de la moelle
CH	Chitosane
CNP	Cellules du noyau pulpeux
DDIV	Dégénération du disque intervertébral
DIV	Disque intervertébral
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMMB	Bleu de diméthyle méthylène
ÉTS	École de Technologie Supérieure
GAG	Glycosaminoglycane
GDF-5	<i>Growth differentiation factor 5</i>
hMSC	Cellules souches d'origine humaine
IGF	Insulin-like growth factor
IPN	Réseau de polymères interpénétrés

IRM	Imagerie par résonance magnétique
IVD	Intervertebral disc
LN	Link N
MSC	Cellules souches/stromales
NP	Noyau pulpeux
OP-1	Osteogenic protein-1
PB	Tampon phosphate
PBS	Solution saline de tampon phosphate
PEG	Polyéthylène glycol
p-NIPAM	poly(N-isopropylacrylamide)
SHC	Sodium hydrogénocarbonate
TGF β	Facteur de croissance transformant bêta

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

°C	degré Celsius
G	gauge
h	heure
kPa	Kilo pascal
Kg	Kilogramme
μg	microgramme
mosm/Kg	milliosmoles/ Kilogramme
min	minute
<i>p</i>	p value
Pa	Pascal
%w/v	Pourcentage masse par volume
s	seconde
SD	<i>Standard deviation</i>

INTRODUCTION

Les maux dans le bas du dos affectent 19% de la population mondiale (Wang et al., 2015) avec un taux de prévalence d'environ 70% chez la population de moins de 50 ans et 90% chez les plus de 50 ans (Teraguchi et al., 2014). Caractérisée par des douleurs violentes pour le patient, cette maladie nécessite annuellement une mobilisation de ressources financières avoisinant les 90 milliards de dollars aux États-Unis (Wang et al., 2015) et les 12 milliards de livres au Royaume-Uni (Sebastine & Williams, 2007). La dégénérescence du disque intervertébral (DDIV) est l'une des causes majeures de ce dysfonctionnement (DePalma, Ketchum, & Saullo, 2011).

La DDIV est une maladie multifactorielle causée par une variation importante dans la composition biochimique de la matrice extracellulaire du tissu qui entraîne une diminution graduelle de la hauteur des disques intervertébraux. Cette réduction de la hauteur avec le temps devient tellement importante qu'elle induit un frottement entre les vertèbres adjacentes qui finissent par exercer des pressions sur les nerfs qui traversent la colonne vertébrale. Ce qui est responsable des douleurs atroces pour le patient. Les techniques actuelles de prise en charge de la DDIV sont entre autres la prise d'antidouleurs, de la physiothérapie et des périodes de repos imposées pour les stades précoce de la maladie. Pour les symptômes plus douloureux donc une dégénérescence sévère, il existe des traitements chirurgicaux visant l'ablation du disque (Whatley & Wen, 2012). Non seulement ces techniques sont très invasives, mais elles sont aussi inefficaces pour la restauration complète des fonctions biomécaniques du DIV. Il en résulte une réduction de mobilité pour le patient et une progression de la dégénérescence aux disques adjacents entraînant souvent une nouvelle chirurgie dans 40-50% des cas cinq ans après l'intervention (Snider et al., 1999; Whatley & Wen, 2012). Le développement de nouvelles techniques minimalement invasives et axées sur la réparation ou la restauration des propriétés du DIV devient donc pertinent et urgent. Le génie tissulaire constitue une alternative intéressante.

Cette technique consiste à livrer des cellules et des molécules bioactives encapsulées dans des matrices injectables appropriées dans l'objectif de régénérer le DIV notamment sa partie centrale : le noyau pulpeux (NP). Les matrices injectables appropriées pour cette application doivent respecter des critères spécifiques telles qu'être biocompatibles et présentant des propriétés mécaniques adéquates. Compte tenu de leur taux élevé en eau et de leur versatilité, les hydrogels injectables constituent d'excellents candidats.

Les travaux dans le domaine ont permis de mettre au point des formulations d'hydrogels intéressantes, mais ces dernières peinent à être à la fois biocompatibles et mécaniquement adéquates. (Francisco et al., 2013; Nair, Baranwal, Vijayan, Keyan, & Jayakumar, 2015; Richardson et al., 2008; Roughley et al., 2006).

L'équipe du professeur Lerouge (de l'ÉTS) a récemment mis au point des hydrogels injectables possédant à la fois des propriétés mécaniques élevées (environ 180kPa comme module sécant à 50% de déformation) (Assaad, Maire, & Lerouge, 2015) et une bonne compatibilité pour l'encapsulation cellulaire (Ceccaldi et al., 2017; Monette, Ceccaldi, Assaad, Lerouge, & Lapointe, 2016). De son côté, le professeur Mwale de l'institut Lady Davis (McGill) a prouvé les propriétés bioactives d'un peptide, le Link N, pour la régénération du disque (Gawri et al., 2012; Mwale et al., 2003; Mwale, Wang, Roughley, Antoniou, & Haglund, 2014). L'objectif général de ce projet qui est donc une collaboration entre les deux équipes est de mettre au point, évaluer et optimiser un hydrogel bioactif pour la régénération du DIV.

Plus spécifiquement, il sera question de développer un hydrogel injectable et bioactif ayant les caractéristiques biomécaniques et bioactives adéquates pour renforcer mécaniquement le NP et stimuler la régénération des composants de sa matrice extracellulaire dans le but d'obtenir un nouveau tissu tout aussi fonctionnel que le NP natif.

Cette thèse se subdivise en sept chapitres. Le CHAPITRE 1 fait le résumé de la revue de la littérature sur le sujet de la thèse. Les propriétés du disque intervertébral ainsi que la problématique clinique de la DDIV sont présentées en premier et suivies par, le cahier des

charges d'une matrice injectable pour le NP, l'état de l'art sur les types de cellules, les molécules bioactives ainsi que les matrices injectables déjà étudiées pour la réparation du NP. Cette section du document permettra au lecteur de comprendre entre autres les mécanismes aboutissant à la DDIV, l'impact sur les propriétés biomécaniques du disque et les défis reliés à la mise au point d'un traitement minimalement invasif pour cette maladie.

Le CHAPITRE 2 présente de façon détaillée les hypothèses et les objectifs (général et spécifiques) ayant permis de conduire cette recherche. Les résultats concrets obtenus de ces travaux sont présentés sous forme d'articles de journaux dans les chapitres 3 à 5 suivis du chapitre 6 qui présentent des résultats complémentaires non encore soumis pour publication.

Le CHAPITRE 3 présentant le premier article, publié dans le journal *Tissue Engineering Part A*, montre les tests ayant permis de sélectionner une formulation d'hydrogel de chitosane dont les propriétés sont appropriées pour être utilisée comme matrice injectable. En effet, les travaux présentés dans cet article montrent que la formulation choisie présente des propriétés mécaniques similaires au NP humain tout en permettant la survie des cellules du NP encapsulées ainsi que la synthèse de matrice extracellulaire. Cependant, la quantité de matrice produite par les cellules encapsulées reste sous optimale comparée aux valeurs observées *in vivo*.

L'objectif du deuxième article présenté dans le CHAPITRE 4 (publié dans *European Cells & Materials Journal*) a donc été de trouver des stratégies pour augmenter l'activité de synthèse des cellules encapsulées dans cette formulation d'hydrogel tout en conservant les propriétés mécaniques et biologiques déjà obtenues. Pour cette partie, l'ajout de la gélatine ainsi que du peptide Link N a été évalué dans des conditions expérimentales répliquant la composition biochimique d'un disque sain ou d'un disque dégénéré.

En vue de caractériser la capacité des gels à restaurer les propriétés mécaniques du disque, une étude dont les résultats sont résumés au CHAPITRE 5 a été effectuée (article soumis au *Journal of Biomechanical Engineering*). Dans ce chapitre qui constitue également l'article 3, l'effet

des paramètres pouvant induire de la variabilité et une interprétation erronée des résultats de caractérisation mécanique des modèles de disque bovins explantés a été évalué. Ces travaux permettront de mieux choisir les échantillons et les conditions de tests appropriées afin de tester *ex vivo* la performance mécanique des matrices injectables pour le disque.

Le CHAPITRE 6 présente des résultats d'une étude préliminaire évaluant le comportement des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) encapsulées dans le gel. Ces cellules constituent celles qui seront probablement utilisées advenant un transfert clinique de la technologie. Ces résultats n'ont pas été soumis pour publication parce qu'ils ne sont pas encore complets.

Une discussion générale de ces résultats au regard des objectifs initiaux du projet ainsi que de l'état de l'art est présentée au CHAPITRE 7. Les limitations du travail ainsi que les recommandations pour des travaux futurs y sont également abordées. Le document finit par une conclusion générale résumant le contenu des différents chapitres.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Contexte clinique

Le disque intervertébral (DIV) est un constituant essentiel de la colonne vertébrale. Entre autres, le disque assure la mobilité du dos et joue un rôle d'amortisseur en absorbant les chocs et sert de jointure pour les vertèbres (Urban, Roberts, & Ralphs, 2000). Comme toutes les structures cartilagineuses articulaires du corps, le DIV subit des modifications irréversibles dans leur composition avec le temps. Ces modifications, selon leur sévérité et leur vitesse de développement peuvent entraîner la dégénérescence du DIV affectant la stabilité de la colonne vertébrale (Panjabi, 1992). Malgré plusieurs études sur le sujet, les facteurs impliqués dans la dégénérescence du DIV demeurent plus ou moins nébuleux. Mais le vieillissement occupe une place prépondérante dans ce processus jugé normal et éventuellement inévitable (Buckwalter, 1995). Cette section de la thèse a pour objectif de présenter le fonctionnement normal du disque et exposer le mécanisme de dégénérescence ainsi que les techniques actuelles pour sa prise en charge.

1.1.1 Le disque intervertébral : anatomie et fonction

1.1.1.1 Description générale

Les vertèbres de la colonne sont reliées entre elles par les DIV comme schématisé sur la Figure 1.1. Une colonne humaine comprend 23 DIV. Les disques occupent entre 15 à 20 % de la longueur totale de la colonne dépendamment du moment de la journée, l'âge et les conditions médicales (Shapiro & Risbud, 2014).

Le rôle principal des DIV est d'assurer une flexibilité contrôlée à la colonne vertébrale en maintenant un certain degré de liberté entre les vertèbres. Ces degrés de liberté permettent des

mouvements de rotation, de torsion et de flexion du dos. La flexibilité du dos est due à la capacité des DIV à transmettre à travers la colonne les contraintes provenant du poids du corps et de l'activité musculaire (Raj, 2008). Les DIV jouent également un rôle dans le maintien de la posture. Leur structure cartilagineuse hautement hydratée assure un rôle d'amortisseur, d'absorption des chocs et donc de protection de la colonne.

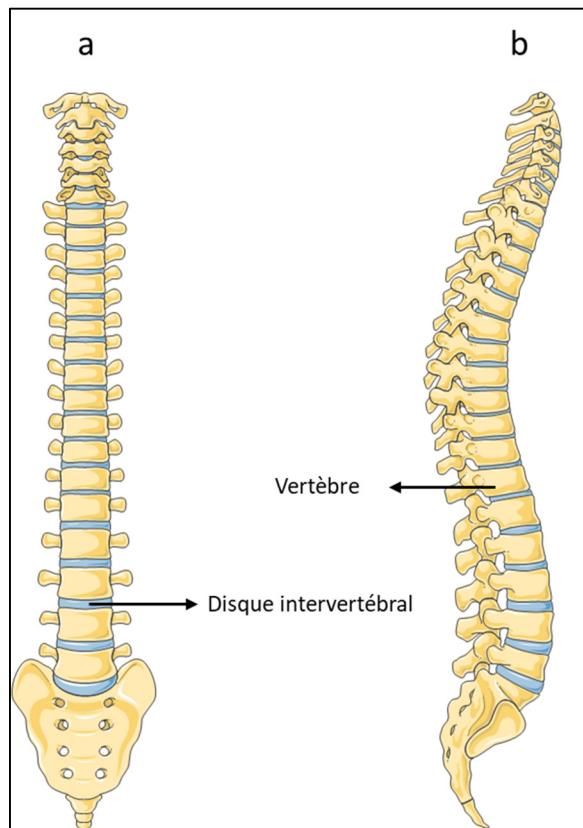


Figure 1.1 Schéma d'une colonne vertébrale humaine

- a) Vue antérieure b) Vue sagittale
- Adaptée de Servier Medical Art (s.d)

De forme approximativement cylindrique, le DIV, présenté sur la Figure 1.2, est composé de tissus cartilagineux fibreux organisés en lamelles concentriques appelées **anneau fibreux (AF)**. Au centre de cet anneau se trouve une structure gélatineuse dénommée **noyau pulpeux (NP)**. Un film de cartilage hyalin appelé **plaqué cartilagineuse** présente aux niveaux supérieur

et inférieur du disque assure le lien entre le disque et les vertèbres adjacentes (Rannou, Mayoux-Benhamou, Poiraudieu, & Revel, 2004). Le DIV est une structure avasculaire, ce qui rend son autoguérison pratiquement impossible.

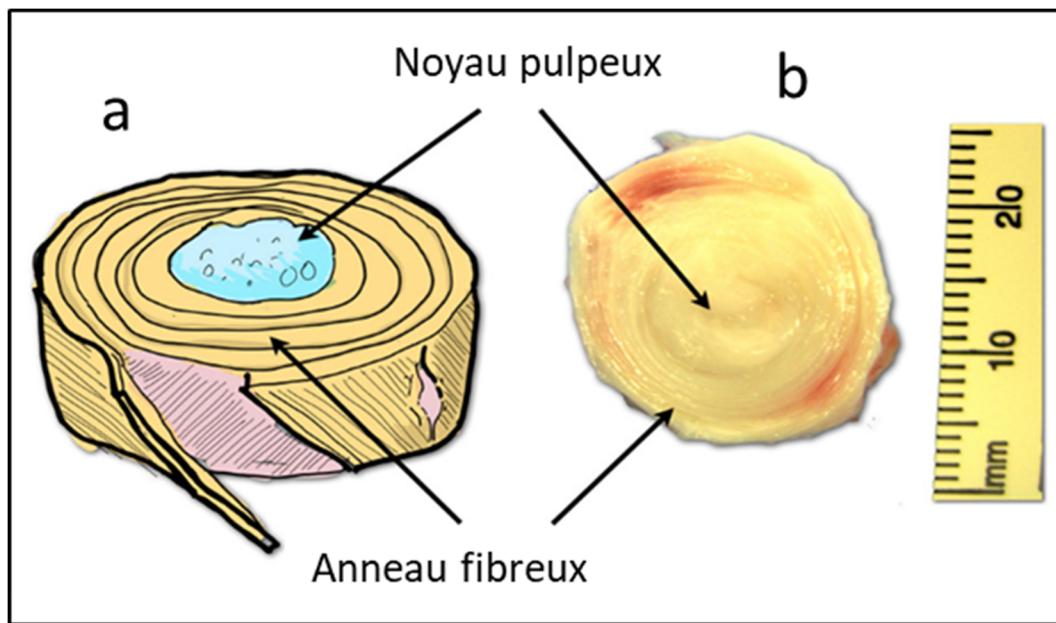


Figure 1.2 a) Schéma montrant les structures principales du disque intervertébral
 b) Image d'un disque intervertébral bovin caudal
 Adaptée de Chan & Gantenbein-Ritter (2012)

1.1.1.2 L'anneau fibreux

La matrice extracellulaire

L'AF est la structure externe du DIV. Il est constitué d'environ 15 à 25 lamelles concentriques de collagène, principalement de type I. Elles sont attachées aux plaques cartilagineuses et aux ligaments longitudinaux antérieurs et postérieurs qui renforcent leur résistance aux contraintes. Situées entre les lamelles, des fibres élastiques composées d'élastine assurent le lien entre elles ainsi que l'élasticité de l'AF (Melrose, Smith, Appleyard, & Little, 2008; Shankar, Scarlett, & Abram, 2009).

Il faut noter que l'AF se divise en trois parties distinctes : L'AF périphérique ou externe, l'AF interne et *la zone de transition*. Les deux dernières zones représentent environ 50% de

l'épaisseur radiale du disque (Shapiro & Risbud, 2014). L'organisation structurale de l'AF, est assez différente d'une région à une autre. L'AF externe comporte une concentration de fibres collagéniques plus importante et est donc plus dense que les deux autres régions. L'AF interne moins dense donc que la région externe est caractérisée par une organisation moins régulière des lamelles. Quant à la zone de transition, elle démarque l'interface entre l'AF et le NP. Elle est encore moins dense, moins concentrée en collagène et moins organisée que les précédentes régions.

Outre le collagène qui représente le tiers de sa masse sèche, la matrice extracellulaire de l'AF est également constituée de protéoglycans, mais en faible proportion (Cassinelli & Kang, 2000). Un protéoglycane est un assemblage d'une protéine et d'un glycosaminoglycane (GAG), une macromolécule glucidique avec une grande capacité de rétention d'eau.

Les cellules

Le DIV est constitué d'une très faible quantité de cellules, environ 1% de son volume total. Au niveau de l'AF externe, ces cellules sont similaires à des fibroblastes. Elles sont alignées selon la direction parallèle à l'orientation des fibres de collagène (O'Halloran & Pandit, 2007). Au niveau de l'AF interne on distingue des cellules de forme plutôt ovale et ressemblant à des chondrocytes. La zone de transition est également composée du même type cellulaire (Errington, Puustjarvi, White, Roberts, & Urban, 1998). Ces cellules ont pour rôle de secréter les composants de la matrice extracellulaire de l'AF.

1.1.1.3 Le noyau pulpeux (NP)

La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du NP se différencie de celle de l'AF par une composition riche en protéoglycans (50% de sa masse sèche). Ce taux élevé de protéoglycans confère au NP une teneur de presque 80% en eau et en fait un tissu très fortement hydraté. Le NP est également constitué de collagène, mais en moindre quantité comparée aux protéoglycans. Contrairement à l'AF, le collagène de type II est plus prédominant.

Les cellules

Le NP est constitué de deux types cellulaires baignant dans une matrice extracellulaire hautement hydratée. À la naissance, le NP est constitué presque uniquement de cellules notochordales qui disparaissent graduellement durant le développement pour laisser place à des cellules matures dont la structure ressemble à celle des chondrocytes compte tenu de leur forme ovale et de leur activité endocrinienne. À partir de l'âge de 10 ans, les cellules matures sont pratiquement les seules cellules présentes au niveau du NP (Urban & Roberts, 1995). Pour la suite du document, le terme « cellules du NP » sera donc utilisé pour désigner les cellules matures du NP.

Des études ont montré que ce changement dans le phénotype des cellules du NP est en partie responsable de la dégénérescence graduelle du disque avec le temps. En effet, les cellules notochordales秘rètent une matrice plus riche en protéoglycans comparativement aux cellules matures (Tang et al., 2018).

Plusieurs études ayant procédé à la caractérisation du phénotype des cellules NP ont démontré qu'elles exprimaient les gènes COL2A1, ACAN et SOX9 (Minogue, Richardson, Zeef, Freemont, & Hoyland, 2010). Ces gènes sont respectivement responsables de l'expression du collagène II, de l'aggrécane (donc les protéoglycans) et du facteur de transcription chondrogénique SOX-9. Ce sont les trois principaux gènes évalués pour valider le phénotype des cellules NP (Smith et al., 2014; Thorpe, Boyes, Sammon, & Le Maitre, 2016). Il faut mentionner que les chondrocytes expriment également ces gènes, mais dans des proportions différentes. En effet, les cellules NP produisent plus de protéoglycans que de collagène (Mwale, Roughley, & Antoniou, 2004) donc expriment une quantité plus importante de l'ARN (acide ribonucléique) du gène ACAN comparativement à l'ARN du gène COL2A1 (Richardson et al., 2008; Smith et al., 2014)

1.1.1.4 Les plaques cartilagineuses

Les plaques cartilagineuses constituent l'interface entre le DIV et les vertèbres adjacentes. Ces plaques sont constituées d'un film de cartilage hyalin qui atteint son épaisseur maximale

d'environ 0.5 à 1mm à l'âge adulte. Les plaques sont constituées de chondrocytes baignant dans une matrice extracellulaire riche en agrécanes et en collagène de type II (Moore, 2000). On distingue également la présence de collagène de type X, principalement au niveau de la région centrale des plaques. Des études ont montré que le collagène X est impliqué dans la calcification des plaques. Son taux augmentant avec l'âge, le collagène X est considéré comme étant un marqueur de dégénérescence du disque (Lammi et al., 1998). En effet, certaines études établissent un lien entre la calcification des plaques cartilagineuses et la dégénérescence du disque (Aigner, Greskötter, Fairbank, von der Mark, & Urban, 1998).

Une des fonctions principales des plaques est d'assurer l'apport de nutriments au niveau du disque. En effet, les structures vasculaires, à l'opposé du disque, sont présentes au niveau des plaques cartilagineuses. Ce sont elles qui acheminent vers les plaques les nutriments et substances nécessaires pour les cellules du disque. Ces nutriments pénètrent dans le disque à travers des phénomènes de diffusion reliés aux mouvements d'eau durant les cycles de déformation du disque tel que présenté sur la Figure 1.3. En effet, quand une pression est appliquée sur le disque, sa hauteur diminue et favorise la sortie d'eau du tissu. Cette eau est chargée des déchets produits par le disque. Ces déchets sont relargués à l'extérieur et sont échangés par les nutriments présents au niveau des plaques cartilagineuses. Une fois la pression relâchée, l'eau maintenant riche en nutriments pénètre dans le disque et fournit aux cellules les composants nécessaires à leur fonctionnement (Remillieux, 2017).

Il faut mentionner que la région centrale des plaques, donc celle en contact avec le NP, est plus perméable que les périphéries. Les plaques protègent également le disque en l'empêchant de directement se poser sur l'os dense des vertèbres (Shapiro & Risbud, 2014).

La Figure 1.4 résume les différents composants du DIV et leur composition.

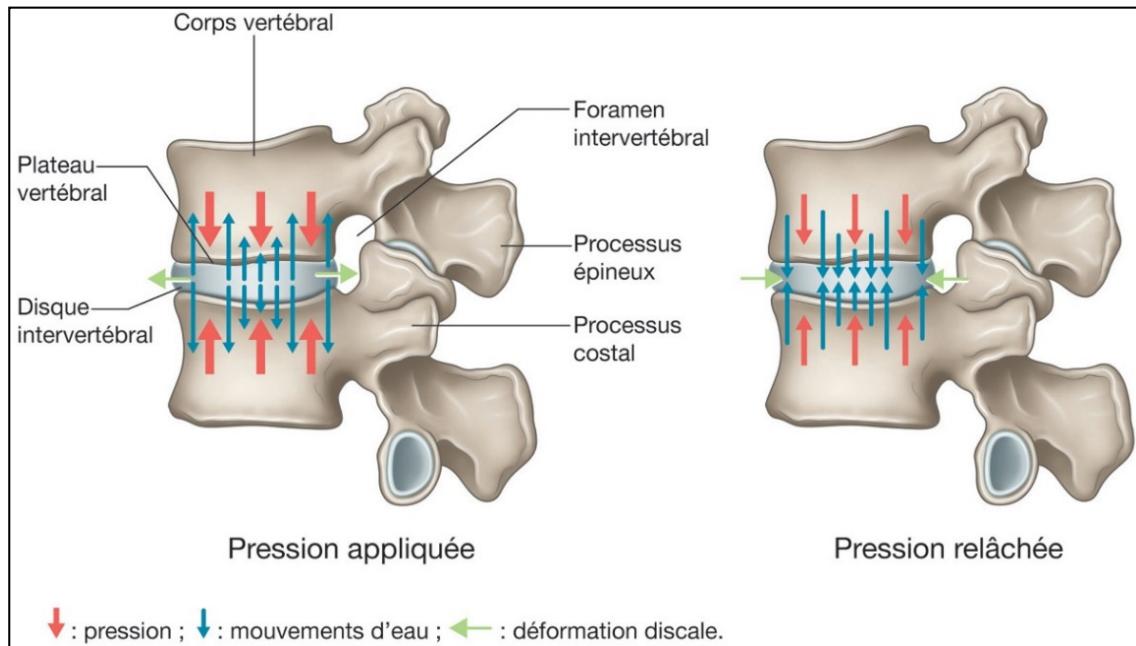


Figure 1.3 Schéma montrant les échanges entre le disque et son environnement durant et après un chargement
Tirée de Éléonore Lamoglia Remillieux (2017)

1.1.2 Biomécanique et fonctionnement normal du disque

Les fonctions et les propriétés mécaniques du DIV sont intimement liées à la composition de sa matrice extracellulaire.

Les protéoglycans présents dans le disque sont chargés négativement au pH physiologique (Urban et al., 2000). Étant donné leur taille relativement importante, ces molécules ne peuvent pas diffuser et sont donc piégées dans le réseau de collagène du disque, entraînant ainsi un déséquilibre chimique entre l'intérieur et l'extérieur du disque. Ce déséquilibre est supprimé par un déplacement d'eau à l'intérieur du disque créant ainsi une pression osmotique au sein du tissu (Han, Chen, Klisch, & Sah, 2011).

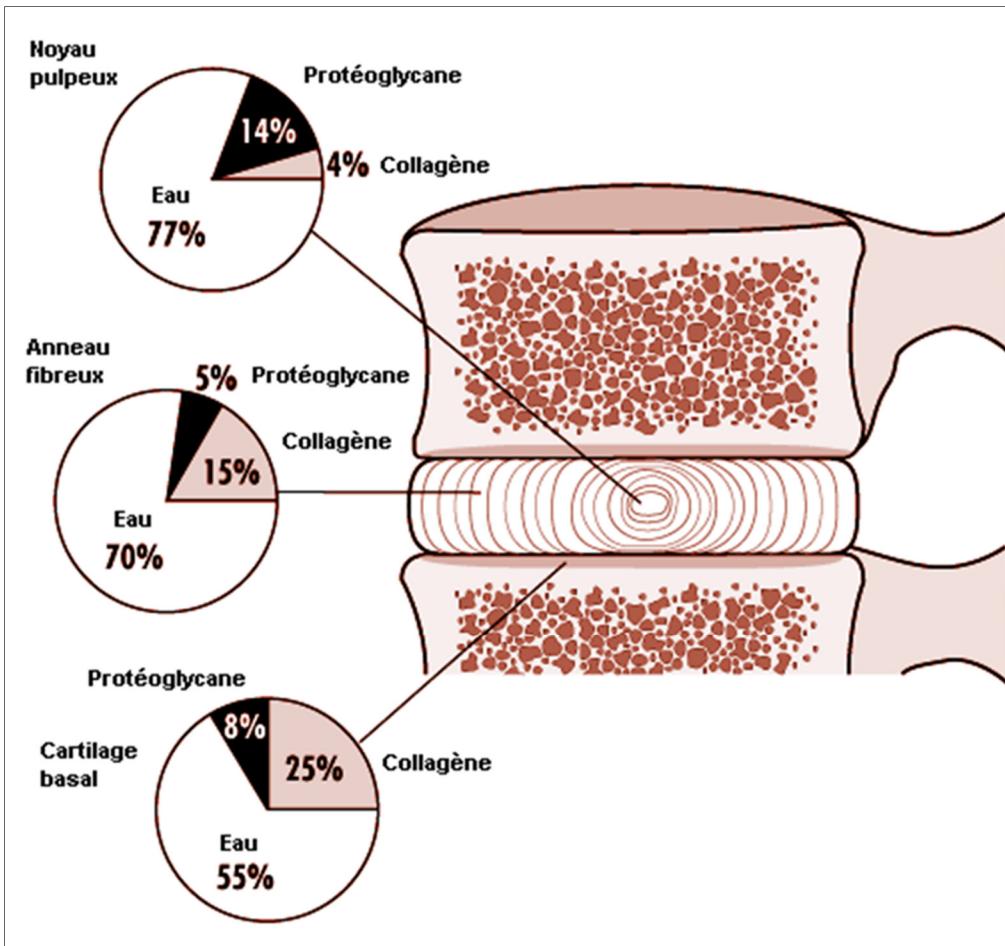


Figure 1.4 Les différentes parties du disque intervertébral, leurs compositions et l'organisation de la matrice extracellulaire
 Adaptée de Encyclopédie de sécurité et de santé au travail (s.d.)

Cette pression osmotique reliée aux protéoglycanes est responsable de l'hydratation du disque, mais également de la pression résiduelle présente dans le disque même en absence de chargement (Lanir, 2009).

Sous charge, le comportement mécanique du disque est dépendant de la composition biochimique du NP et de l'AF. En effet, le NP étant riche en protéoglycanes et donc en eau est capable de subir des contraintes importantes en compression. L'AF quant à lui, est capable de supporter des déformations en tension compte tenu de la teneur en collagène de ses lamelles concentriques.

Le comportement biomécanique du disque est expliqué dans cette section selon les deux grandes contraintes auxquelles le disque est soumis : la compression et le cisaillement.

1.1.2.1 Le disque en compression

La compression est la contrainte la plus importante supportée par le disque. Ces contraintes de compression proviennent généralement du poids du haut du corps et de l'activité musculaire (O'Halloran & Pandit, 2007).

Quand on exerce une compression sur le disque, le NP absorbe la contrainte jusqu'à un niveau donné avant de se déformer radialement. Durant cette phase de déformation, le NP subit donc une compression non confinée. Cette déformation radiale exerce une contrainte sur les fibres de collagène de l'AF qui se retrouvent donc sous tension et se déforment radialement, comme schématisé sur la Figure 1.5 (Cortes & Elliott, 2014). L'environnement créé par l'AF et les plaques cartilagineuses empêche le NP de continuer de se déformer malgré le chargement. Le NP se retrouve donc sous compression confinée à un certain moment durant le chargement. Des études ont donc caractérisé le NP aussi bien en compression confinée (Johannessen & Elliott, 2005) que non confinée (Cloyd et al., 2007).

Pour décrire les propriétés du disque, les travaux de Cloyd et al. sont très cités. L'équipe a effectué des tests de compression en mode *non confiné* sur des NP humains normaux, tel que schématisé sur la Figure 1.6A. Durant ce test, l'échantillon cylindrique, libre de se déformer latéralement, subit de façon incrémentée 5 séries de déformation de 5% en 1 seconde suivies de 5min de relaxation comme sur la Figure 1.6B. Les résultats obtenus ont permis d'obtenir la courbe contrainte à l'équilibre (σ_{eq}) en fonction de la déformation (ε) (Figure 1.6C), σ_{eq} étant la contrainte obtenue après les 5min de relaxation pour chaque 5% de déformation (Cloyd et al., 2007).

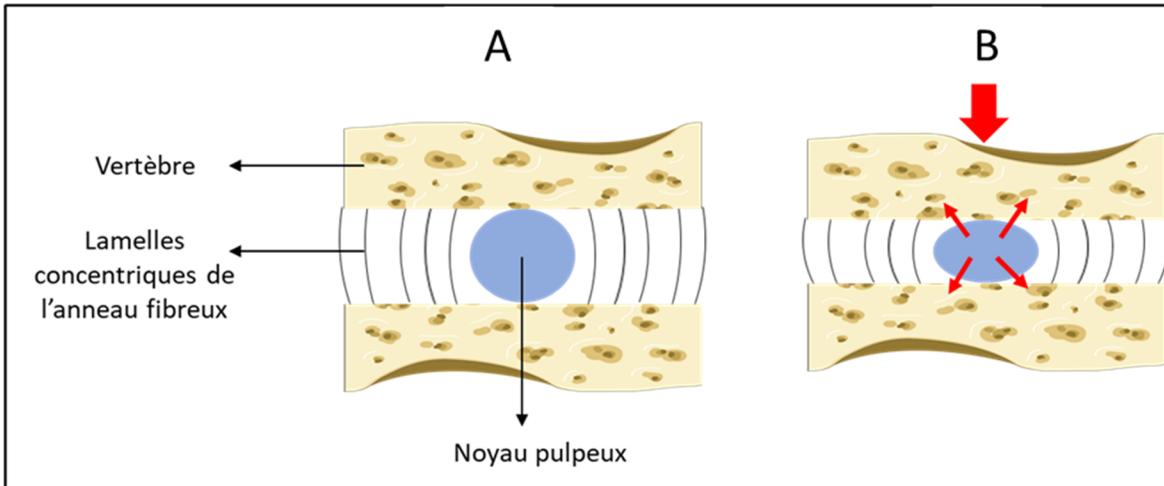


Figure 1.5 Schématisation d'une unité fonctionnelle de la colonne : deux vertèbres séparées par un disque A) sans charge et B) sous compression
Adaptée de Servier Medical Art (s.d)

Les propriétés en compression non confinée du matériau sont exprimées à travers le module de compression sécant à l'équilibre représentant la pente de la courbe σ_{eq} (ε) à une déformation donnée. Cloyd et al. ont évalué ce module à 3.25 ± 1.56 kPa à 0% de déformation et 5.39 ± 2.56 kPa à 20%. Cette expérience leur a également permis de quantifier le coefficient de Poisson en mesurant la variation du diamètre de l'échantillon pendant que la compression est appliquée. Ils ont estimé ce coefficient à 0.62 ± 0.15 . Le coefficient de Poisson des matériaux isotropes incompressibles devant être inférieur à 0.5, cette valeur confirme le caractère anisotrope et/ou compressible du NP.

D'autres équipes ont choisi de tester le NP en compression confinée, en exerçant une compression axiale sur le NP placé dans un porte-échantillon rigide fermé par une plaque poreuse, comme montré sur la Figure 1.7. Cet environnement de test empêche le NP de se déformer radialement tout en permettant le déplacement d'eau.

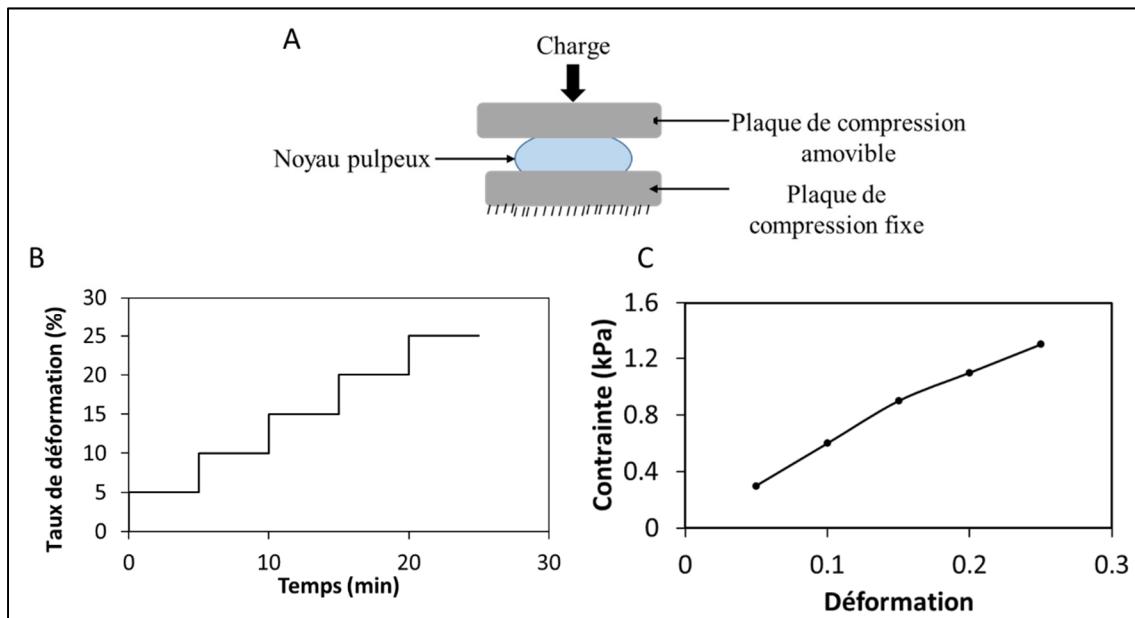


Figure 1.6 A) Schématisation d'un test de compression non confinée B) Test incrémenté de compression en relaxation de contrainte C) Courbe de la contrainte à l'équilibre en fonction de la déformation

Johannessen et al. ont effectué des tests en compression confinée sur des NP saints et dégénérés (Johannessen & Elliott, 2005). Dans cette étude, le NP est considéré comme un matériau biphasique étant donné qu'il se comporte à la fois comme un fluide et un solide selon la vitesse de déformation (Iatridis, Weidenbaum, Setton, & Mow, 1996). En effet, à faible vitesse de déformation, le NP ne subit aucune contrainte et se comporte donc comme un fluide capable de s'écouler sans aucun stress externe, ce qui est le contraire à haute vitesse de déformation.

Dans ce test, des échantillons cylindriques de NP humain ont été placés dans une chambre rigide recouverte d'une plaque poreuse (voir Figure 1.7). Après une étape de précharge, une compression de 1% a été appliquée sur l'échantillon suivie d'une étape de relaxation de 3 heures. Cette première étape du test a permis de déterminer la pression de gonflement isométrique c.-à-d. la contrainte à laquelle le tissu n'absorbe plus de l'eau (Zhang, Cui, Conil, & Talandier, 2020). Ils ont également fait subir aux échantillons un test de relaxation en compression confinée (déformation de 5% suivie de 2 h de relaxation). Ces résultats leur ont

permis de mesurer la rigidité en compression confinée exprimée par le module effectif d'agrégat du matériau H_a^{eff} exprimée par l'équation ci-après.

$$H_a^{eff} = H_a + \Pi \quad (1.1)$$

H_a représente la résistance de la portion solide du matériau et Π le négatif du taux de variation de la pression osmotique avec dilatation (Ateshian, Chahine, Basalo, & Hung, 2004).

Les résultats ont montré que le NP sain a une capacité d'absorption d'eau et un module d'agrégat effectif plus importants que le NP dégénéré. Pour le NP sain, ils ont estimé cette pression de gonflement à 0.138 ± 0.029 MPa après 3h de relaxation à 1% de déformation et le module d'agrégat effectif à 1.01 ± 0.43 MPa (Johannessen & Elliott, 2005).

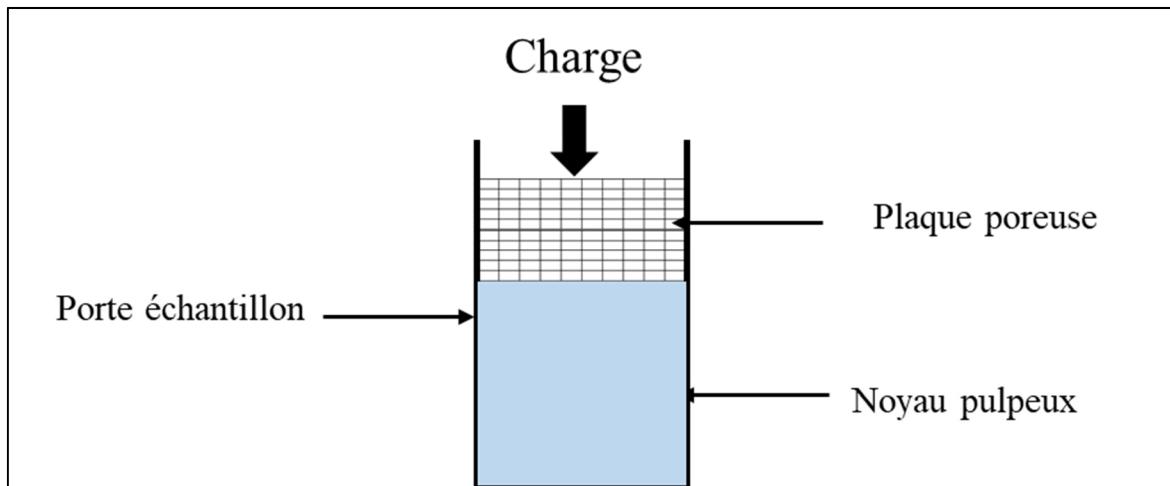


Figure 1.7 Schématisation du test de compression confinée

1.1.2.2 Le disque en cisaillement

La seconde contrainte importante subie par le disque est la contrainte de cisaillement. Ce type de contrainte subsiste durant les mouvements de torsion quand le haut du corps effectue une rotation sur lui-même. Durant les mouvements de torsion, ce sont principalement les fibres de

collagène de l'AF qui sont sollicitées. En effet, durant une rotation latérale, une partie des fibres de l'AF se retrouve en tension pour supporter la contrainte pendant que l'autre partie ne participant pas au mouvement se retrouve en compression. L'intensité de la tension exercée sur les fibres augmente radialement, avec la plus grande tension sur les fibres plus à la périphérie. On assiste également à la diminution du renflement externe de l'AF qui résulte en l'augmentation de la hauteur du disque ainsi que de la pression discale (van Deursen, Snijders, Kingma, & van Dieën, 2001). Une torsion du disque entraîne donc une dépressurisation du NP et une augmentation des contraintes dans l'AF (van Deursen et al., 2001). Ce mouvement contribue donc aussi au déplacement d'eau dans le disque et donc à sa nutrition.

Les propriétés en cisaillement du disque, notamment du NP, sont généralement mesurées pendant des tests rhéologiques en mode oscillatoire, compte tenu de son caractère viscoélastique. Ces tests permettent la détermination des **modules en cisaillement G' , G'' , G^*** du matériau. Le module de stockage G' représente la rigidité de la composante élastique du matériau et le module de perte G'' la composante visqueuse. Le lien entre ces trois paramètres est représenté dans l'équation ci-dessous (Anseth, Bowman, & Brannon-Peppas, 1996). La Figure 1.8 montre le principe du test pour évaluer les propriétés du NP en cisaillement.

$$G^* = G' + G'' \quad (1.2)$$

Iatridis et al. ont ainsi évalué et quantifié le comportement viscoélastique du NP humain en cisaillement (Iatridis et al., 1996). Ils concluent que la rigidité en cisaillement G^* du NP varie entre 7 et 21 kPa selon la fréquence de déformation appliquée.

Ils ont également effectué ces tests sur des NP avec des taux de dégénérescence variés. Selon les résultats, plus la dégénérescence évolue, plus le module G^* augmente (Iatridis, Setton, Weidenbaum, & Mow, 1997), le NP devient de plus en plus fibreux.

Le NP étant un matériau viscoélastique, les propriétés mesurées varient selon la vitesse de déformation et le type de test effectué. Il est donc important d'utiliser le même test et les mêmes paramètres de test afin de comparer les propriétés quantifiables de deux études.

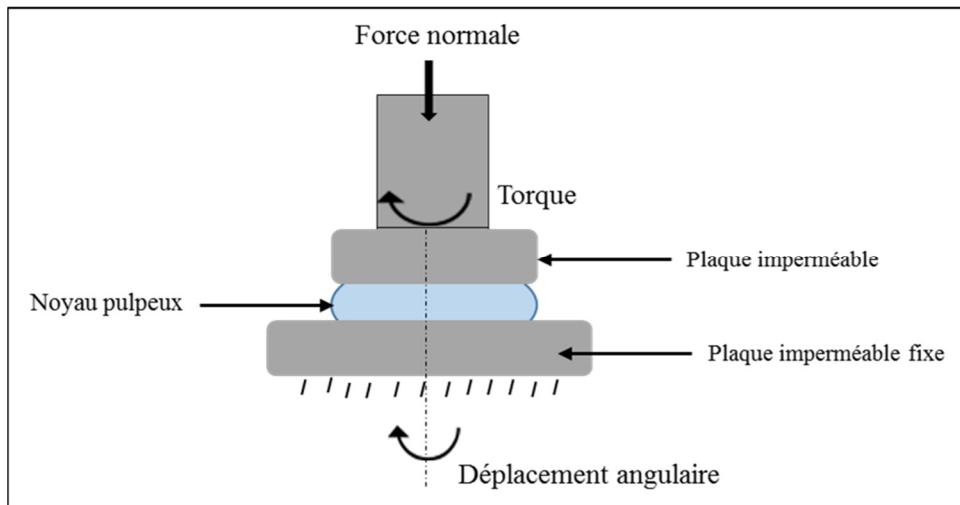


Figure 1.8 Schématisation du test de cisaillement sur le noyau pulpeux

1.1.3 Dégénérescence du disque intervertébral

Les pathologies du DIV sont multiples. Les plus symptomatiques sont reliées à la dégénérescence d'un ou de plusieurs DIV. Elles sont presque exclusivement responsables des pathologies dégénératives de la colonne vertébrale. La discopathie dégénérative est le terme clinique utilisé pour désigner la dégénérescence du DIV. Au cours du processus de dégénérescence, on assiste à la diminution graduelle de la hauteur du disque. Au niveau clinique, cette maladie se reconnaît par des douleurs vives pour le patient au niveau du bas du dos lorsque ce sont des disques lombaires qui sont impliqués ou au niveau du cou pour les disques cervicaux (Loibl et al., 2019). Les causes exactes de ces douleurs restent nébuleuses mais les études ont confirmés une corrélation entre la survenue des douleurs et la dégénérescence des DIV.

La discopathie dégénérative peut également être la cause ou la conséquence d'un autre dysfonctionnement clinique de la colonne tel que la scoliose dégénérative de l'adulte (Dupin, 2015), la hernie discale (Regnault & Faivre, 2012), le spondylolisthésis (Bauerfeind, s.d.)..

Dans le cadre de ce projet, la problématique ciblée se limite à la discopathie dégénérative qui n'est associée à aucune pathologie classique de la colonne et le terme dégénérescence du disque intervertébral (DDIV) sera utilisé pour y faire référence.

1.1.3.1 Mécanisme de la dégénérescence du disque intervertébral

Effets de l'âge sur la structure du disque intervertébral

À la naissance, le NP contient uniquement des cellules notochordales. On distingue également quelques vaisseaux sanguins au niveau de l'AF externe et les plaques cartilagineuses. À ce stade, le NP occupe la moitié de la surface transverse du disque. Au cours du développement, la taille et la hauteur du disque deviennent de plus en plus importantes, la quantité des cellules notochordales diminue graduellement jusqu'à leur disparition totale (vers l'âge de dix ans) au profit des cellules du NP ayant les caractéristiques de cellules cartilagineuses : les chondrocytes. On remarque donc l'apparition d'un NP de plus en plus riche en collagène et donc plus fibreux. Dans le même temps, on assiste à une diminution graduelle de la densité des vaisseaux sanguins qui finissent par disparaître complètement du disque adulte, sauf au niveau de l'AF externe où quelques vaisseaux sanguins persistent (Urban & Roberts, 1995). Ce phénomène a un incident direct sur l'apport des nutriments dans le disque qui se retrouve être un facteur important dans le processus de dégénérescence.

En effet, certaines cellules du disque, n'ayant plus tous les nutriments dont elles ont besoin rentrent dans un état de sénescence où elles demeurent vivantes, mais incapables d'assurer la production d'une matrice extracellulaire adéquate. Ce qui engendre un NP moins hydraté dans le temps. La concentration de protéoglycane baisse au profit de l'augmentation de la quantité de collagène. Le NP perd graduellement donc son aspect gélatineux pour une structure plus fibreuse. L'AF également perd une bonne partie de son hydratation et les lamelles de collagènes sont moins organisées. Dans ces conditions, le NP se retrouve dans l'impossibilité d'absorber adéquatement les charges qui lui sont assignées. En effet, tout le chargement reçu de la colonne est communiqué à l'AF qui a déjà perdu de son élasticité et de sa résistance. Il en résulte, avec le temps, une déchirure de l'AF (Adams, McNally, & Dolan, 1996). Le phénomène devient un cercle vicieux, plus le disque se dégénère, plus il est incapable de

supporter les contraintes et plus il se dégénère. Macroscopiquement, ceci s'exprime par une diminution graduelle de la hauteur du disque visible à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Urban & Roberts, 1995; Whatley & Wen, 2012)

Ce mécanisme de dégénérescence amène certains chercheurs à affirmer que la dégénérescence n'est que le résultat inévitable d'un vieillissement normal du corps. Néanmoins certaines études montrent qu'une possible prédisposition génétique et d'autres causes potentielles, notamment les sollicitations mécaniques excessives du disque et une activité enzymatique inadéquate contribueraient à ce processus.

Effet des surcharges mécaniques

Les contraintes mécaniques contribuent au bon fonctionnement du disque. En effet ce sont les compressions répétées au niveau du disque qui assurent les mouvements d'eau et donc la nutrition du disque par diffusion. Cependant, lorsque ces contraintes sont anormalement élevées, il peut en résulter une fatigue conduisant à la dégénérescence du disque. Il a été noté chez des personnes dont le travail nécessite des sollicitations physiques intenses un taux significativement élevé de dégénérescence des disques au niveau lombaire (Urban & Roberts, 1995; X.-b. Zhang et al., 2021). Une masse corporelle élevée augmente également les sollicitations mécaniques. Selon les chercheurs, cependant, la contribution des surcharges mécaniques au processus de dégénérescence demeure infime (Leung, Chan, & Cheung, 2006; Raj, 2008; Shankar et al., 2009).

Activité enzymatique

Comme mentionné tout au long de ce document, les propriétés mécaniques du DIV sont liées à la composition de sa matrice extracellulaire. Au niveau du disque dégénéré, on dénote une quantité plus élevée que la normale de metalloprotéases (MMP). Le rôle de ces enzymes est de détruire les composants de la matrice extracellulaire. Les cytokines (IL-1 & IL-6), l'oxyde de nitrate et la prostaglandine E2 (PGE2) font également partie de ces enzymes destructrices (Whatley & Wen, 2012).

Dans un disque sain, il existe un équilibre entre les facteurs cataboliques et anaboliques qui maintient l'équilibre dans la synthèse et la dégradation du collagène et des protéoglycane. Un disque dégénératif est caractérisé par un déséquilibre des activités anaboliques et cataboliques des cellules résidentes. La dégénérescence serait déclenchée par un déséquilibre entre les activités anaboliques et cataboliques des cellules du disques entraînant la destruction de la matrice extracellulaire du DIV (Figure 1.9).

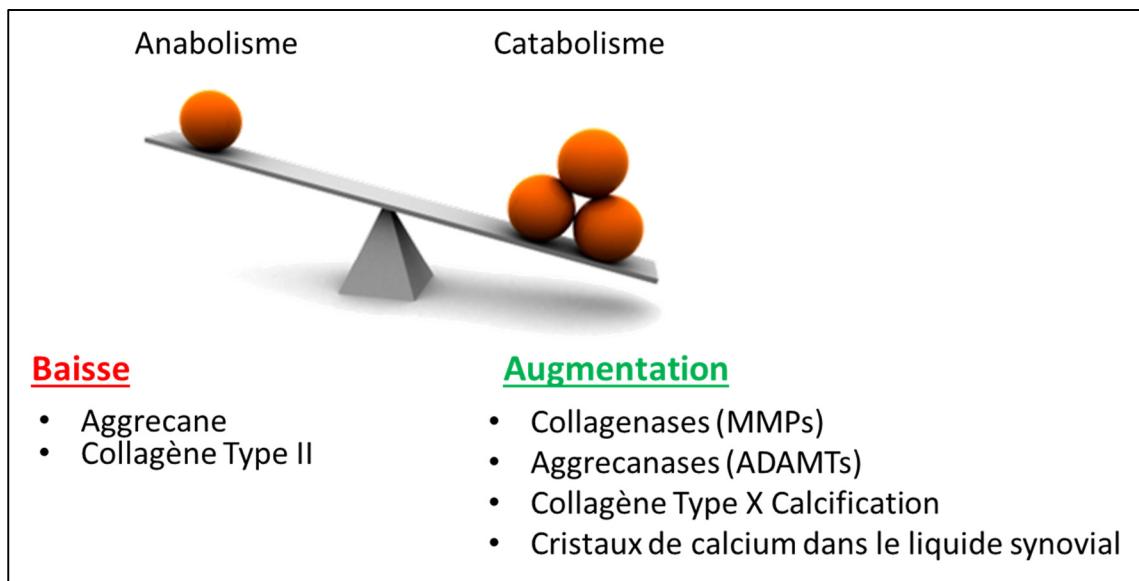


Figure 1.9 Schéma montrant le déséquilibre dans la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire, responsable de la dégénérescence du disque (Figure obtenue avec la permission d'OrthoLab)

1.1.3.2 Les différents grades de dégénérescence du DIV

L'échelle de classification de la dégénérescence du DIV comporte cinq (5) grades selon l'échelle de Thompson (Thompson et al., 1990) et de Pfirrmann (Pfirrmann, Metzdorf, Zanetti, Hodler, & Boos, 2001). L'échelle de Thompson a été établie en se basant sur des photographies de disques humains explantés. Il fait donc référence à l'aspect visuel du disque durant le processus de dégénérescence. L'échelle de Pfirrmann, quant à elle, se base sur les changements

observés sur des paramètres mesurés sur des images IRM, qui avec la radiographie à rayons X font partie des méthodes cliniques de diagnostic.

La section qui suit décrit les grades de l'échelle de Thompson ; les images associées sont présentées sur la Figure 1.10.

Grade 1

Le grade 1 est considéré comme l'état le plus sain du disque ou l'état du disque à un jeune âge. À ce stade, le NP est très hydraté et possède un aspect très gélatineux avec une démarcation bien visible avec l'AF et ses lamelles fibreuses discrètes. Les plaques cartilagineuses sont minces et constituées de cartilage hyalin.

Grade 2

Le grade 2 est l'état du disque à l'âge adulte. À ce stade, la limite entre le NP et l'AF devient moins évidente due à la formation d'une couche fibreuse blanchâtre autour du NP. La perte de hauteur du disque est estimée à environ 25% à ce stade (Mimura et al., 1994). L'épaisseur des plaques cartilagineuses est irrégulière, ce qui pourrait entraîner une irrégularité au niveau du profil de diffusion des nutriments dans le disque.

Grade 3

Le grade 3 est considéré comme un état de dégénérescence précoce. Le NP présente maintenant une structure complètement fibreuse ce qui entraîne la perte de la démarcation avec l'AF. On dénote le début de la formation des ostéophytes au niveau du disque et quelques défauts focaux au niveau des plaques cartilagineuses.

Grade 4

Le grade 4 est un état de dégénérescence avancée où on note des fissures au niveau du NP et quelques déchirures au niveau de l'AF. Les plaques cartilagineuses autrefois hyalines sont maintenant constituées de fibrocartilage d'aspect irrégulier. On note la formation

d'ostéophytes de moins de 2 mm au niveau du corps vertébral. Le disque a perdu entre 50 et 75% de sa hauteur à ce stade.

Grade 5

Le disque dans son entièreté présente des cavités aussi bien au niveau du NP que de l'AF. Les plaques cartilagineuses sont largement sclérosées. La perte de hauteur est estimée à plus de 75% à ce niveau de dégénérescence.

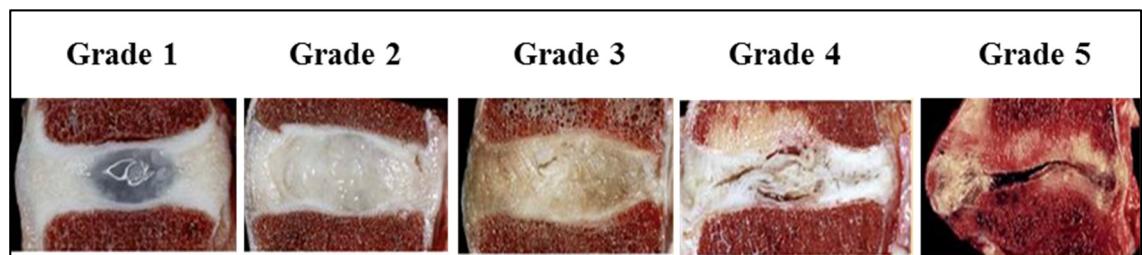


Figure 1.10 État macroscopique du disque dépendamment du stade de dégénérescence
Adaptée de Dechambenoit (2016)

1.1.3.3 Effets de la dégénérescence sur la biomécanique de la colonne

La diminution graduelle de la hauteur du disque entraîne dans les premiers stades de la maladie une augmentation du degré de mouvement entre les vertèbres adjacentes et donc des degrés de mouvement plus importants dans la colonne. Ces mouvements excessifs entraînent la compression ou de la tension au niveau des nerfs de la colonne et sont donc responsables des douleurs épisodiques ressenties par le patient (Inoue & Espinoza Orías, 2011). Pour les stades avancés (grade 5) on assiste plutôt à une baisse de la flexibilité de la colonne due au manque de lien entre les vertèbres adjacentes et les douleurs chroniques qui limitent les mouvements du patient.

1.1.3.4 Traitements actuels et leurs limites

Le DIV étant un tissu avasculaire (Sun, Liu, & Luo, 2020), son autorégénération est impossible. Le mécanisme assez complexe de la dégénérescence et ses causes multiples

rendent son traitement étiologique complexe. Les traitements actuels ont principalement pour objectif de supprimer les douleurs ressenties par le patient. Au début du processus, les douleurs sont moins importantes et sont donc prises en charge par des antidouleurs, des séances de kinésithérapie, du repos, des anti-inflammatoires (Urban & Roberts, 2003). Pour les stades évolués, quand les douleurs deviennent trop intenses, insupportables pour le patient, les techniques chirurgicales sont celles privilégiées. Leur objectif est de retirer le DIV et/ou le remplacer par un matériau synthétique (Crevensten et al., 2004).

La discectomie et fusion spinale

La discectomie implique l'ablation complète du DIV et la fusion des vertèbres adjacentes. Durant l'opération, le chirurgien retire le disque endommagé et relie les vertèbres avec une cage de fusion. Pour faciliter la guérison, l'espace laissé par le disque est soit remplacé par des tissus osseux retirés d'autres parties du patient ou par une plaque métallique afin d'améliorer la stabilité de la colonne.

Chez les patients opérés, on dénote une diminution significative des douleurs. Les patients sont même capables de reprendre leurs activités quotidiennes après leur rémission de la chirurgie. En revanche, des études ont montré que cette procédure, au niveau lombaire, augmente la pression intradiscale des disques adjacents. On note également une flexibilité moins accrue que la normale au niveau des vertèbres fusionnées. Ceci s'expliquant par le fait que l'absence de DIV entre les vertèbres fusionnées diminue la flexibilité entre ces vertèbres et entraîne une mauvaise répartition des charges et des mouvements de la colonne. Ce qui par la suite est responsable de la dégénérescence des disques adjacents qui sont hautement sollicités. Quatorze pour cent (14 %) des patients se retrouvent donc obligés de refaire une autre chirurgie pour les nouveaux DIV dégénérés (Hilibrand & Robbins, 2004).

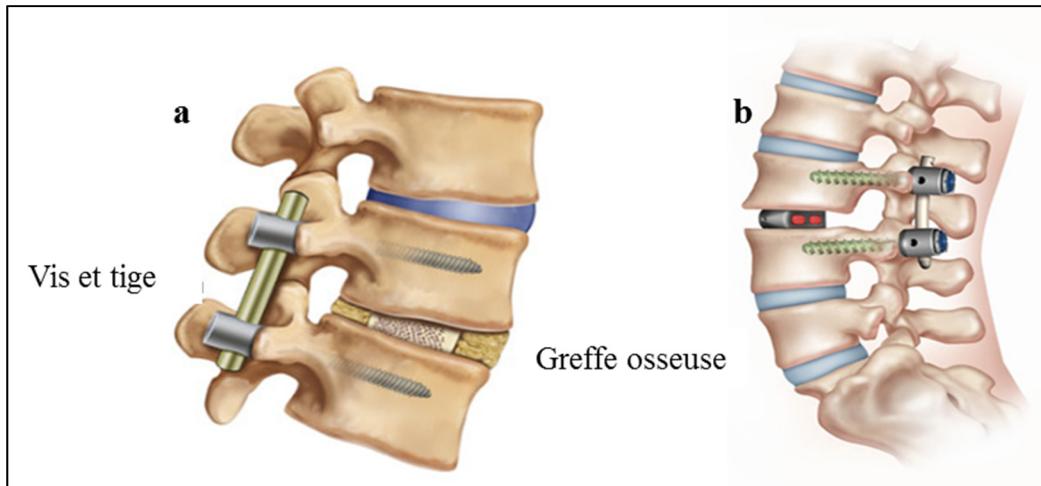


Figure 1.11 Schéma d'une colonne ayant subi une fusion spinale a) le disque est remplacé par une greffe osseuse autologue. b) Il est remplacé par une prothèse en métal

La fusion spinale est donc très efficace à court terme en ce sens où elle diminue les douleurs et plaintes du patient. Cependant, elle affecte la biomécanique normale de la colonne et conduit à la dégénérescence des disques adjacents aux vertèbres fusionnées. Pour pallier ces insuffisances, de nouvelles techniques ont été mises en place pour remplacer le DIV et éviter la fusion des vertèbres.

Le remplacement du disque intervertébral

Dépendamment de l'évolution de la maladie, le remplacement peut viser le NP ou le DIV au complet.

Les implants de remplacement total (Figure 1.12) sont utilisés lorsque la maladie est évoluée, c'est-à-dire quand le disque au complet est atteint. Les prothèses actuellement sur le marché répondent aux besoins cliniques, mais ce sont des techniques fort invasives, dont la durée de vie est limitée et où les matériaux utilisés peuvent causer d'autres types de problèmes. En effet, ces implants sont majoritairement faits de matériaux métalliques dont la corrosion libère des

ions toxiques nécessitant l'explantation (Lebl, Cammisa, Girardi, Wright, & Abjornson, 2011) et de polyéthylène dont l'usure génère des réactions biologiques de type inflammatoire.



Figure 1.12 Exemples de prothèses de remplacement total du disque intervertébral

Quelques tentatives ont été faites pour mettre en place des implants uniquement pour le NP, notamment le PDN de Raymedica (Ray, 2002). Mais les problèmes de migration ont mis fin à son déploiement sur le marché (Zhao, Qu, Jin, & Jiang, 2008).

Plusieurs équipes de recherche tentent également de fabriquer des DIV *in vitro* par impression 3D ou bio-impression 3D. Tout le disque est produit par bio-impression (Wu et al., 2021) (Doench et al., 2019; D. Nguyen et al., 2017) ou seulement le noyau par bio-impression et l'AF par électrofilage (Martin et al., 2014; Nerurkar, Elliott, & Mauck, 2007). Le défi est de produire du bio-encre stable, possédant des propriétés mécaniques adéquates tout en permettant l'encapsulation des cellules d'intérêt. D'autres limitations de ces techniques qui retardent leur développement sont le coût élevé de la production, la reproductibilité de la méthodologie et les potentielles difficultés pour une production à grande échelle (De Pieri et al., 2020).

1.2 La régénération du disque intervertébral

Toutes ces techniques susmentionnées nécessitent une chirurgie et sont donc très invasives. De plus, elles ne permettent pas de restaurer la biomécanique du disque. Les recherches se sont alors tournées vers des approches permettant de « réparer » le DIV en stimulant la régénération de ses composants par le biais de composants injectés de façon minimalement invasive. Ces composants peuvent être des agents bioactifs, des cellules, une matrice injectable ou leur combinaison. Dans le cadre de cette thèse, on s'intéresse aux traitements incluant des cellules, que l'on appelle thérapie cellulaire.

1.2.1 Thérapie cellulaire et ingénierie tissulaire : concepts et définitions

La thérapie cellulaire consiste à injecter des cellules vivantes dans le corps du patient dans un but thérapeutique. La plupart du temps, les cellules utilisées proviennent du patient afin de diminuer les risques de rejet. Ensuite, elles sont cultivées *in vitro* pour augmenter la quantité ou pour les différencier en cellules spécialisées. Finalement, à travers une aiguille ou un cathéter, on injecte ces cellules au niveau du site d'intérêt (Figure 1.13).

Cette technique est possible même avec des aiguilles de très petit diamètre. En revanche, elle ne fournit aucun support tridimensionnel pour les cellules. Ce manque de support ne favorise ni leur rétention au niveau du site désiré, ni leur survie (Ganjun et al., 2011). Dans le cas où les cellules arrivent à survivre, elles prolifèrent en une monocouche qui entraîne leur différenciation et une production moindre de matrice extracellulaire, spécifiquement pour les cellules du disque cultivées *in vitro* (Rosenzweig et al., 2017; Sakai et al., 2003).

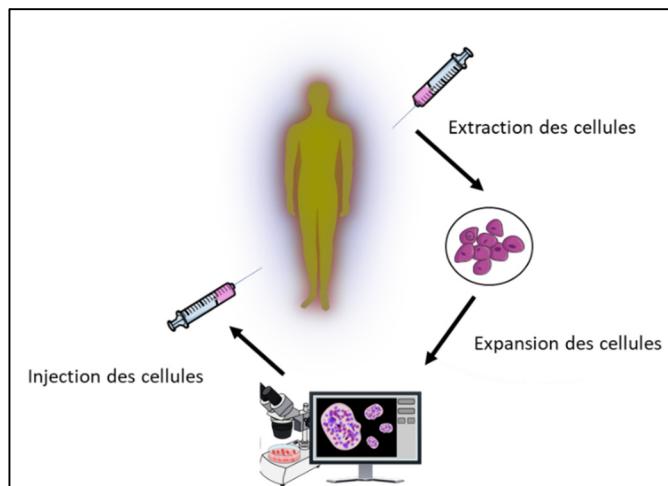


Figure 1.13 Principe de la thérapie cellulaire
Adaptée de Regrow (2010)

Elles se retrouvent donc incapables de remplir les fonctions escomptées. C'est pourquoi, de plus en plus fréquemment, la thérapie cellulaire est effectuée en combinaison avec une matrice injectable. Cette option permet d'encapsuler les cellules dans un matériau et ensuite intégrer l'ensemble au site d'intérêt. Ceci permet une livraison très localisée et une meilleure rétention des cellules et de la matrice extracellulaire produite par ces cellules. La survie cellulaire s'en retrouve aussi améliorée (Crevensten et al., 2004; Ganjun et al., 2011). De plus, dans le cas du disque, cette matrice peut jouer un rôle clé pour renforcer les contraintes mécaniques du tissu et potentiellement restaurer sa hauteur.

On se rapproche alors du concept de **génie tissulaire**, qui consiste à développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus.

Dans le cas de la dégénérescence du DIV, l'objectif est de livrer des cellules d'intérêt dans le disque dans le but qu'elles secrètent une matrice extracellulaire appropriée, comme les cellules natives du disque. Ces techniques visent des stades peu avancés de la maladie et sont mises au point pour la régénération du NP seulement pour le moment. Les sections suivantes présentent dans un premier temps le cahier des charges d'une matrice injectable pour le NP,

basé sur les connaissances de la littérature et le cas spécifique du disque. En second lieu, un état de l'art sur les cellules, les agents bioactifs et les matrices testées dans le cadre de la régénération du NP sera présenté.

1.2.2 Cahier des charges d'une matrice injectable pour le noyau pulpeux

1.2.2.1 Objectif général

Le traitement vise à favoriser la régénération du NP sur le long terme. Pour cela, la matrice injectable a pour rôles principaux de renforcer, au moins temporairement, les propriétés mécaniques du NP dégénéré et de permettre l'injection et la rétention de cellules viables dont la prolifération et l'activité de synthèse permettront de restaurer la matrice extracellulaire et donc les propriétés biomécaniques du tissu.

Étant donné que la technique à développer ne vise que la restauration du NP, son utilisation sera limitée aux patients dont la maladie est encore à des stades peu avancés (grade 3 or 4) c.-à-d. quand l'AF n'est pas encore très atteint. Sinon pour les stades avancés, elle devra être combinée à d'autres techniques permettant la réparation de l'AF.

Au regard de ces objectifs, la matrice injectable devra respecter des contraintes ainsi que des spécifications techniques découlant des fonctions à remplir.

1.2.2.2 Les contraintes

Injectabilité par aiguille

La matrice doit pouvoir être utilisée de façon minimalement invasive, c'est à dire injectable à travers une aiguille. Selon Wang et al., les aiguilles de diamètre inférieur ou égal à celui d'une aiguille de 22 gauges (diamètre intérieur 0.42mm et diamètre extérieur 0.72mm) sont adéquates pour injecter des solutions dans des disques humains tout en évitant des blessures significatives à l'AF et l'écoulement de la solution (Wang, Tsai, & Wang, 2007) or induire une

dégénérescence additionnelle du disque. Il est donc important que la matrice utilisée soit suffisamment liquide pour permettre une injection et remplir les défauts du tissu dégénéré. Le processus de solidification *in situ* doit se faire assez rapidement pour éviter que la matrice ne se disperse hors du site cible.

Stérilisation

Étant donné que ce matériau sera injecté dans le corps, il doit pouvoir être stérilisé, et ce avant l'ajout des cellules et l'injection. Un degré d'assurance de stérilité (SAL) de 10^{-6} (moins d'une chance sur 1 million qu'il y ait un microorganisme vivant dans le produit) est requis pour tout implant. Cet aspect doit être pris en compte durant le choix des matériaux et des protocoles de fabrication.

Biocompatibilité

La biocompatibilité d'un matériau se résume à respecter deux critères essentiels : 1) Le biomatériau ne doit pas engendrer de réaction néfaste au sein de l'organisme ; 2) Il doit également permettre ou induire une réponse appropriée à l'application. Le second critère sera détaillé dans les attributs.

Selon le premier critère, il est requis que la matrice démontre l'absence d'effet néfaste en passant les tests de biocompatibilité de la norme ISO10993 pour implant permanent implanté dans les tissus mous (cytotoxicité, immunogénicité, carcinogénicité, etc.). De plus, les cellules encapsulées ne doivent pas favoriser de rejet, ce qui implique d'utiliser des cellules du patient ou des cellules de faible immunogénicité comme les cellules souches.

L'implantation d'un biomatériau entraîne toujours une réaction inflammatoire dans l'organisme, mais cette réaction est limitée dans le temps si le matériau est biocompatible. La réaction inflammatoire attendue se doit donc d'être brève. Cette réponse doit être vérifiée durant des tests *in vivo*. Les probabilités qu'une inflammation survienne dans le disque sont quand même limitées étant donné son caractère « immuno-isolé » (Sun et al., 2020). Il existe plusieurs autres tests spécifiques prévus par la Food and Drug Administration (FDA) pour les dispositifs implantables qui seront présents dans un tissu pendant plus de 30 jours. Ces tests

sont entre autres des tests de sensibilisation, Irritation/ réaction intracutanée, toxicité systémique aiguë, toxicité subaiguë ou subchronique, génotoxicité...

Il est donc important de tenir compte de la complexité chimique des matrices à considérer. En effet, plus les méthodes de fabrication des matrices sont trop complexes, plus elles nécessitent des composés et des processus chimiques plus ou moins toxiques susceptibles de constituer un frein pour le processus d'approbation.

Biodégradabilité

L'objectif en utilisant une matrice est de remplacer le NP, mais aussi de stimuler sa régénération. Pour ce faire, la matrice doit être biodégradable afin de progressivement permettre au nouveau tissu de la remplacer. De plus, la vitesse de dégradation du matériau doit être autant que possible adaptée à la vitesse de régénération du tissu. Dans une étude préclinique effectuée par Meisel et al., une thérapie cellulaire à base de chondrocytes autologues sur des chiens a permis d'obtenir une réduction des douleurs dès 2 ans (Meisel et al., 2007). Ceci pourrait suggérer que le DIV s'est régénéré après cette période. Mizuno et al ont quant à eux implanté un biomatériau rempli de cellules du NP et de L'AF dans des souris. Les résultats montrent que 16 semaines ont suffi pour avoir une matrice extracellulaire similaire à celui du tissu natif. Cette durée serait donc assez pour permettre une régénération du NP (Mizuno et al., 2006; Rederstorff et al., 2011).

1.2.2.3 Attributs et spécifications techniques

Les principaux attributs du cahier des charges ainsi que les spécifications techniques associées sont présentés ci-après

Permettre la survie des cellules encapsulées.

Les cellules encapsulées dans la matrice doivent être capables de survivre. Par convention, lors d'essais *in vitro*, elle doit assurer un pourcentage de plus de 80% de viabilité pour être classée

non cytotoxique. Selon la norme ISO 10993, la cytotoxicité doit être vérifiée de façon directe, mais aussi indirecte. C'est-à-dire les cellules doivent être viables quand exposées aux composés relargués par la matrice (cytotoxicité indirecte), mais aussi en contact direct avec la matrice (cytotoxicité directe) (ISO, 2009). Dans le cadre de la régénération du disque, la matrice devra non seulement être sécuritaire pour les cellules résidentes du disque, mais également permettre la survie des cellules encapsulées dans la matrice. Les cellules doivent pouvoir être mélangées de façon homogène dans la matrice à l'état liquide/visqueux avant l'injection et doivent rester viables malgré l'injection et la solidification de la matrice.

Les connaissances en biomatériaux ont permis d'établir un lien entre la survie cellulaire et plusieurs facteurs, notamment le taux de cisaillement exercé durant l'injection, la porosité/perméabilité, le pH et l'osmolarité des hydrogels, ainsi que leur composition en eau. En effet, la matrice doit être assez poreuse pour permettre une diffusion uniforme afin de mettre à la disposition des cellules les ressources nécessaires (Kuo & Ma, 2001). Ce critère peut être caractérisé par la perméabilité du matériau qui doit idéalement être similaire de celle du NP natif qui est de l'ordre de $0.9 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ en compression confinée (Johannessen & Elliott, 2005). Les valeurs cibles de pH, d'osmolarité et de composition en eau sont également présentées dans la liste des spécifications techniques (voir Tableau 1.1)

Stimuler la production et la rétention d'une matrice extracellulaire similaire à celle du NP

Les propriétés mécaniques du NP dépendent en grande partie de la constitution de sa matrice extracellulaire. Il est donc important que le biomatériau soit non seulement capable de faire produire cette matrice par les cellules encapsulées, donc favoriser le bon phénotype cellulaire, mais il doit également pouvoir retenir la matrice en place. Comme le NP natif, la matrice extracellulaire à produire doit être riche en protéoglycans, mais aussi en collagènes de type II. Par exemple, la composition d'un disque bovin en santé est de l'ordre de 31 à 47 µg de protéoglycans par mg de tissu (Alini et al., 2003).

Renforcer les propriétés mécaniques du NP dégénéré le temps que le nouveau tissu se forme

Pour restaurer les propriétés du NP et ne pas perturber l'équilibre biomécanique de la colonne vertébrale, la matrice, une fois solidifiée, devra permettre de reproduire les propriétés natives du NP natif. Idéalement les propriétés du biomatériau à utiliser doivent être égales ou meilleures au NP natif. Par contre, ces propriétés ne doivent pas être trop supérieures, car ceci peut causer une charge supplémentaire sur les DIV subséquentes et induire une dégénérescence aux niveaux adjacents (Bao, McCullen, Higham, Dumbleton, & Yuan, 1996). Il est donc important de documenter ces paramètres afin de savoir la cible qu'on cherche à atteindre, les propriétés qu'on cherche à reproduire, à mimer. Les caractéristiques mécaniques du NP humain que la matrice devrait idéalement posséder sont présentées dans le Tableau 1.1.

1.3 État de l'art

Cette section vise à faire le point sur les lignées cellulaires, les agents bioactifs et les matrices injectables étudiés jusqu'à présent pour chercher à régénérer le DIV. Il est important de préciser que la plupart de ces travaux sont au stade de la recherche. À part une clinique d'orthopédie en Allemagne, La Gelenk-Klinik (La Gelenk-Klinik, 2016) et The Boston Stem cells Center (The Boston Stem Cell Center, 2021) qui offrent des traitements de thérapie cellulaire pour le DIV, il n'existe actuellement aucun traitement cellulaire approuvé sur le marché ni en étude clinique, à notre connaissance.

1.3.1 Les lignées cellulaires pour la régénération du disque intervertébral

Les lignées cellulaires évaluées sont des cellules spécialisées qui sont biologiquement capables de synthétiser la matrice extracellulaire du disque ou des cellules souches capables de se différencier en ces cellules spécialisées. Parmi ces cellules, on distingue les cellules du NP, les chondrocytes et les cellules stromales mésenchymateuses humaines (hMSC).

Tableau 1.1 Spécifications techniques d'une matrice injectable pour le disque intervertébral

Critères	Spécificités (valeurs ou caractéristiques cibles)
Biocompatibilité	<ul style="list-style-type: none"> - Non cytotoxique et réaction inflammatoire limitée - Survie, prolifération (et différenciation) des cellules encapsulées - Production et rétention d'une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et collagène type II - pH autour de 7.4
Injectabilité	<ul style="list-style-type: none"> - Injectables à travers une aiguille allant de 26 G à 22G, sans endommager les cellules qu'elle contient
Stérilisabilité	<ul style="list-style-type: none"> - Stérilisation possible des constituants du gel ou du gel une fois produit, avant l'ajout des cellules
Biodégradabilité	<ul style="list-style-type: none"> - Le gel doit se dégrader au fur et à mesure que le nouveau tissu s'installe
Capacité d'absorption d'eau	Une matrice riche en eau, avec une capacité d'absorption proche de celle du NP (200 % (Iatridis et al., 1996) et une osmolarité proche de celle du disque (430 mOsm/L(van Dijk, Potier, & Ito, 2011))
Propriétés mécaniques : Elles doivent être proches de celles du NP soit:	
Compression non confinée	Module à l'équilibre 5.39 ± 2.56 kPa à $\epsilon = 20\%$ (Cloyd et al., 2007)
Compression confinée	<ul style="list-style-type: none"> - Pression de gonflement : 0.138 ± 0.029 MPa - Module d'agrégat effectif 1.01 ± 0.43 MPa (Johannessen & Elliott, 2005)
Module en cisaillement G*	7 à 21 kPa (Iatridis et al., 1996)

1.3.1.1 Les cellules du noyau pulpeux (CNP)

Les CNP demeurent les meilleures cellules pour la régénération du NP pour la simple et bonne raison que ce sont les cellules mêmes du tissu. Les cellules du NP sont responsables de la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire. Les cellules ont été étudiées *in vitro* pour confirmer leur rôle au niveau de la production de la matrice extracellulaire. En effet,

quelques études ont démontré la potentialité des CNP à secréter, *in vitro*, du collagène II et des protéoglycanes (Francisco et al., 2013; Richardson et al., 2008). Neidlinger-Wilke et al. ont démontré dans leur étude que des CNP humaines cultivées dans un gel de collagène ont été capables de secréter du collagène II et du protéoglycane, mais également des metalloprotéases capables de détruire ces composants. En appliquant une stimulation mécanique sur ces cellules, ils ont aussi pu montrer qu’elles étaient sensibles aux stimulations mécaniques en réduisant la production des metalloprotéases tout en continuant à secréter une matrice extracellulaire (Neidlinger-Wilke et al., 2005). Ceci démontre que l’environnement de culture et les charges mécaniques subies par le disque ont un impact important sur l’activité synthétique des CNP *in vivo*. De plus, l’âge du patient peut aussi avoir un effet sur l’activité synthétique des CNP. Il faut mentionner que comparativement aux autres sources cellulaires, très peu d’auteurs ont étudié ces cellules, compte tenu de leur indisponibilité pour une utilisation en clinique.

En effet, pour obtenir des CNP autologues, il faudrait l’extraire du NP du patient. Ceci revient à opérer ou faire une biopsie au patient pour extraire du NP et en retirer les cellules. Ceci faisant, on ajoute de l’instabilité dans la colonne du patient et la biopsie d’un disque peut conduire à sa dégénérescence. De plus, le NP contient très peu de cellules ($4000/\text{mm}^3$), il faut donc plusieurs extractions pour obtenir une quantité suffisante de cellules (Richardson et al., 2008). Il faut noter que même si on arrive à extraire assez de cellules, il est indispensable que le patient soit très jeune, sinon l’activité de synthèse de ces cellules peut ne pas être adéquate pour régénérer le disque. Les CNP adultes ont en effet une activité de synthèse relativement limitée et les passages cellulaires successifs durant les expansions *in vitro* risquent d’induire leur dé-différentiation.

Les seules études cliniques utilisant ces cellules en Allemagne s’effectuent sur des patients ayant subi une discectomie suite à une hernie discale (Ganey & Meisel, 2002). Dans ces cas, toutes les cellules du disque (AF y compris) sont utilisées pour être réinjectées dans le disque afin de ralentir la dégénérescence du disque suite à la chirurgie (Grochulla, Mayer, & Korge, 2006). Mais il n’y a pas d’étude formelle et rigoureuse montrant l’efficacité clinique de ces

traitements. La Figure 1.14 montre une image radiographique où des cellules du disque explantées et cultivées sont réinjectées dans un modèle de disque canin, *in vivo*.

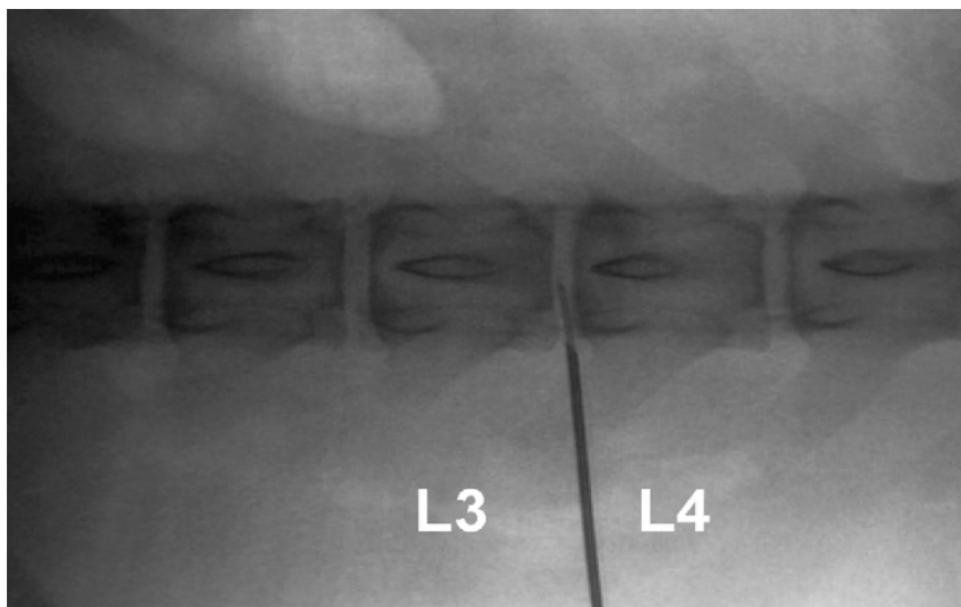


Figure 1.14 Injection de cellules du disque (NP et AF) dans un modèle canin

Tirée de Meisel et al. (2007)

Compte tenu de la non-disponibilité clinique des CNP, d'autres lignées cellulaires plus faciles à obtenir ont été évaluées.

1.3.1.2 Les chondrocytes

Les CNP de par leur forme et activité synthétique, ressemblent aux chondrocytes, qui sont les cellules présentes dans le cartilage. Pour la régénération du DIV, ce sont les chondrocytes présentes dans le cartilage articulaire qui ont été étudiées. Dans un modèle *in vivo* de lapin, Gorensen et al. ont montré la production d'un tissu fibreux à la place du NP suite à une transplantation de chondrocytes (Gorensen et al., 2004). En effet, la quantité de protéoglycans produite par ces cellules était plus faible que celle de collagène produit. Cette composition est caractéristique d'un cartilage hyalin, mais c'est l'inverse dans le NP où les protéoglycans sont en plus grande proportion (Mwale et al., 2004). Richardson et al, ont fait le même constat dans

leur étude comparative. Les chondrocytes humains encapsulés dans un hydrogel de chitosane, produisent plus de collagène que de protéoglycanes (Figure 1.15). Ce qui est le contraire de ce qui est observé pour des CNP humaines et les hMSC encapsulées dans le même hydrogel(Richardson et al., 2008). Ces cellules malgré la similarité morphologique avec les CNP ne sont donc pas appropriées pour l'obtention d'une matrice extracellulaire adéquate pour le NP. D'ailleurs, l'une des causes du caractère fibreux du NP dégénéré serait en partie une invasion des chondrocytes provenant des plaques cartilagineuses qui lient le disque aux vertèbres adjacents (Leung et al., 2006). Ce qui confirme encore une fois que ces cellules ne sont pas appropriées pour la régénération du DIV.

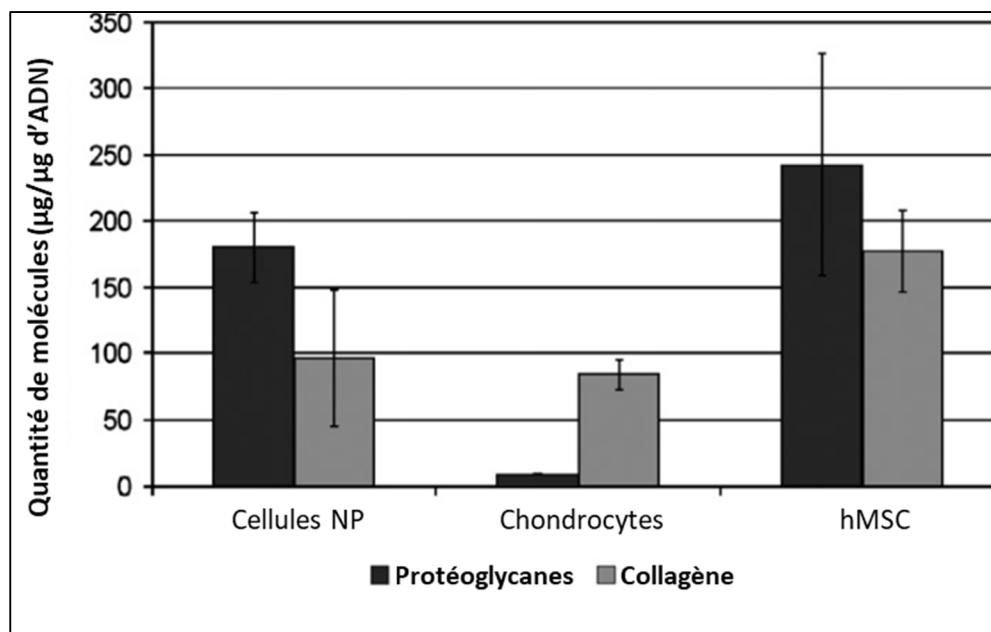


Figure 1.15 Caractérisation de la matrice extracellulaire produite par des cellules encapsulées dans un hydrogel de chitosane
Adaptée de Richardson, Hughes, Hunt, Freemont, & Hoyland (2008)

1.3.1.3 Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC)

Les MSC sont des cellules souches pluripotentes donc capables de se différencier en plusieurs lignées cellulaires spécialisées dépendamment des conditions de culture et de stimulation. Pour une application clinique, les MSC sont plus privilégiées que les CNP, compte tenu de leur

facilité d'obtention. En effet, elles peuvent être obtenues par une biopsie de la moelle osseuse (BMSC) (Thorpe et al., 2016) ou extraites du tissu adipeux (ADSC) (Murab et al., 2015). En revanche, des facteurs de croissance et de différenciation peuvent être nécessaires pour diriger leur différenciation en cellules du NP. Smith et al. ont montré que les hMSC encapsulées dans un hydrogel présentent une meilleure viabilité et une meilleure production de matrice extracellulaire en présence du facteur de croissance transformant $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), *in vitro* (Smith et al., 2014).

Étant donné le coût élevé de ces facteurs de croissance et leurs effets secondaires, plusieurs chercheurs ont évalué l'utilisation de ces cellules sans avoir recours à des facteurs de croissance. Dans un modèle de lapin *in vivo*, Ganjun et al. n'ont trouvé aucune différence significative entre la matrice extracellulaire secrétée par les BMSC et celle secrétée par les CNP (Ganju et al., 2011). Dans une étude comparée *in vitro*, Richardson et al. ont montré que les hMSC produisent une matrice extracellulaire similaire à celle produite par les CNP humaines. Ces cellules ont été encapsulées dans un hydrogel de chitosane sans aucun facteur bioactif (Richardson et al., 2008) (voir Figure 1.15). Thorpe et al. ont démontré que, cultivées dans un milieu hypoxique, les hMSC sont capables de se différencier en des cellules présentant un phénotype similaire à celui des CNP et ce, sans ajout d'agent bioactif (Thorpe et al., 2016). Ces résultats confirment en effet que les hMSC utilisées dans un environnement possédant des caractéristiques similaires à celles du DIV et/ou avec une matrice injectable appropriée sont capables de synthétiser les composants de la matrice extracellulaire du NP sans ajout de facteur de croissance. Cette source cellulaire reste donc intéressante pour un transfert clinique de la technologie.

En dehors des cellules, certains chercheurs ont étudié l'effet de certains agents bioactifs sur la régénérescence du disque. Ces agents bioactifs sont utilisés soit en combinaison avec les cellules soit seules comme thérapie moléculaire pour le disque. La section suivante présente quelques-uns des agents bioactifs les plus étudiés, leurs effets, particularité, avantages et limites.

1.3.2 Les agents bioactifs pour la régénération du disque intervertébral

Pour stimuler la survie, la prolifération, la différenciation ou la production de matrice extracellulaire, les cellules sont souvent livrées avec certains agents bioactifs. Plusieurs équipes ont également étudié l'effet de ces agents bioactifs injectés seuls dans le disque. Ces molécules sont soit des facteurs de croissance, soit des facteurs de différenciation et/ou simplement des facteurs stimulant la production de matrice extracellulaire. Les équipes de Masuda et de Hodgkinson ont publié chacune une revue montrant les différents facteurs de croissance ayant prouvé leur efficacité pour la production de GAG, de collagène et/ou la prolifération cellulaire (Hodgkinson, Shen, Diwan, Hoyland, & Richardson, 2019; Masuda & An, 2004; Richardson et al., 2008). Les sections suivantes présentent les agents bioactifs les plus étudiés et les plus prometteurs pour la régénération du disque.

1.3.2.1 Le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β)

TGF- β est une famille de cytokines impliquée, entre autres, dans la croissance, le développement, l'inflammation, la réparation et la régulation des mécanismes immunitaires (Clark & Coker, 1998). Pour le DIV, le TGF- β agit comme un facteur de croissance c'est-à-dire induit l'augmentation du taux de division cellulaire. Beaucoup d'études ont démontré l'efficacité de cette molécule aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (avec des modèles animaux) pour stimuler la production de protéoglycans par les cellules du disque.

Thompson et al. sont la première équipe ayant montré dans une étude *ex vivo*, l'effet bénéfique du TGF- β sur la production des protéoglycans par des disques canins explantés (Thompson, Oegema, & Bradford, 1991) (Figure 1.16). Ces tests ont été reproduits par Walsh et al., qui ont également montré qu'une injection répétée de TGF- β (200 ng/ml) faisait augmenter la densité cellulaire (en favorisant la prolifération des cellules) et la production de protéoglycans dans des modèles *in vivo* de disque murins (Walsh, Bradford, & Lotz, 2004). Ces résultats ont été confirmés dans d'autres études *in vivo* où les résultats ont montré que le TGF- β stimule la

prolifération des cellules du disque aussi bien que la production de matrice extracellulaire (Helen E. Gruber et al., 1997; Smith et al., 2014).

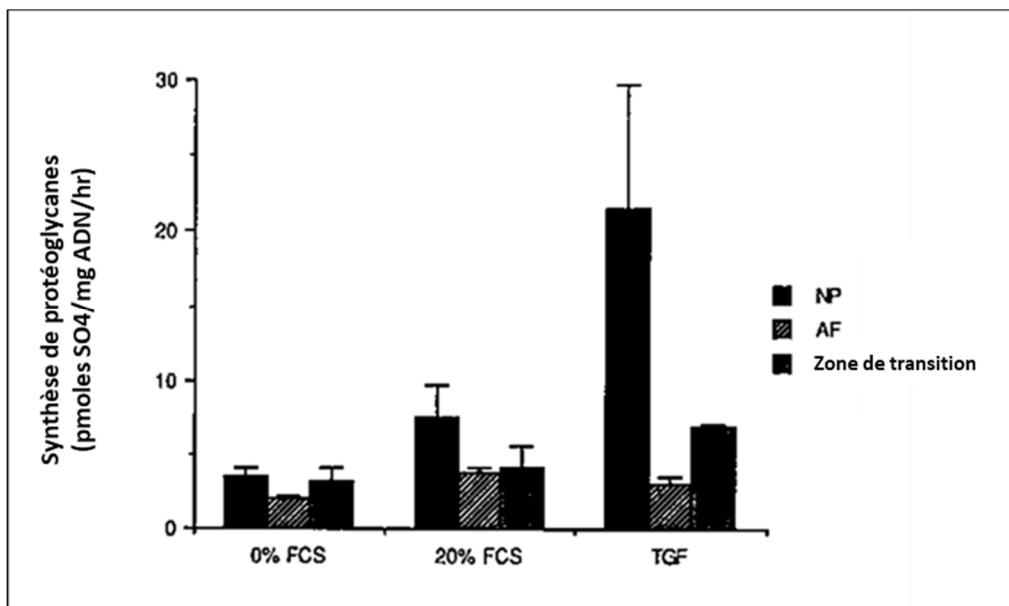


Figure 1.16 Le noyau pulpeux de disques canins explantés produit une quantité plus importante de protéoglycane en présence du TGF- β
Adaptée de Thompson, Oegema et Bradford (1991)

Cette stimulation de la production de GAG par le TGF- β serait due à plusieurs mécanismes. L'une des possibilités serait que le TGF- β augmente la production de GAG en stimulant la synthèse d'ARN par les cellules du disque et en inhibant les protéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (Bassols & Massague, 1988). Bian et al ont quant à eux montré que le TGF- β agit sur les cellules du disque en réponse au stress mécanique par mécanotransduction, les intégrines jouant un rôle prépondérant dans ce mécanisme. En effet, dans des environnements de stress mécanique approprié, le TGF- β agit en tant qu'agent anabolique et augmente la production de matrice par les cellules NP. Par contre, quand les charges mécaniques sont exagérées, on observe une sécrétion excessive de TGF- β qui entraîne un changement au niveau de l'activité de synthèse des cellules NP et conduit au dysfonctionnement observé dans les conditions pathologiques (Bian et al., 2017).

Cette dualité des effets du TGF- β sur le disque et son implication dans les voies de signalisation tumorigène rend son transfert clinique complexe, voire impossible (Brahmkhatri, Prasanna, & Atreya, 2015). En effet, le TGF- β peut agir en tant que suppresseur ou promoteur de tumeur selon les cellules impliquées et les différentes mutations subies par le facteur de croissance (Berie & Moses, 2006)

1.3.2.2 Le facteur de différenciation 5 (GDF-5)

Le GDF-5 est une autre protéine dont l'effet sur les cellules du disque a été largement étudié. Selon les études, ce facteur de différenciation permettrait entre autres de favoriser la survie et la prolifération des cellules du disque en les protégeant contre l'apoptose et en inhibant les voies de signalisation des réactions inflammatoires qui leur sont dommageables. Le GDF-5 stimule également les cellules du disque à produire plus de matrice extracellulaire, notamment les protéoglycans (Guo et al., 2021). Walsh et al. ont démontré qu'une seule injection de GDF-5 dans un modèle de souris *in vivo* de disque dégénéré était suffisante pour obtenir une augmentation significative de la hauteur du disque après quatre semaines (Walsh et al., 2004). Dans une autre étude, Li et al. ont démontré que les DIV des souris déficientes du gène responsable de la protéine GDF-5 montraient des images T2 de faible intensité en IRM et une désorganisation structurale en histologie. Ceci confirme l'importance et le rôle de cette protéine dans le maintien de la matrice extracellulaire du disque (Li, Leo, Beck, Balian, & Anderson, 2004). Cependant, les études actuelles ne permettent pas de définir clairement toutes les voies de signalisations dans lesquelles est impliqué le GDF-5 et aucune étude clinique n'a encore été faite chez l'humain pour confirmer l'efficacité de cette protéine. Cette stagnation des recherches est due au fait que la complexité du milieu du disque et celle du mécanisme de signalisation du GDF-5 pourraient le rendre inefficace ou même potentiellement induire de la dégénérescence. Aucune étude n'a encore aussi confirmé si l'injection de cette protéine chez l'homme est sécuritaire (Guo et al., 2021).

1.3.2.3 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

L'IGF-1 est un peptide dont la structure se rapproche de celle de l'insuline. Des études ont démontré son efficacité plus ou moins limitée pour augmenter la production de protéoglycane par les cellules du cartilage et du DIV aussi bien *in vitro* (Kim et al., 2010; Li et al., 2004) que *in vivo* (Thompson et al., 1991; Walsh et al., 2004). Osada et al. ont en effet prouvé que la réponse des cellules du disque à cette molécule dépend de la concentration de cette dernière (Osada et al., 1996). Le mécanisme d'action de l'IGF-1 demeure encore nébuleux, mais l'une des théories plausibles serait qu'il existerait des récepteurs d'IGF-1 sur les cellules du disque. Ces récepteurs associés à la charge positive de la molécule permettent un taux de pénétration importante dans la matrice et donc un taux de liaison IGF-1/récepteur plus important et donc une activation plus accrue des voies de signalisation impliquées dans la synthèse de matrice extracellulaire.

Pratsinis et al. ont également démontré que l'IGF-1 stimule la prolifération des cellules du disque (Pratsinis & Kletsas, 2007) ce qui pourrait augmenter le besoin en nutriments dans le tissu et empêcher la dégénération (Lin et al., 2022; Travascio, Elmasry, & Asfour, 2014). De plus, les propriétés angiogéniques de l'IGF-1 (Lin et al., 2017) pourraient potentiellement induire la formation de vaisseaux sanguins dans le tissu. Cette angiogenèse habituellement accompagnée de croissance de nerfs (Mapp & Walsh, 2012) pourrait empêcher les douleurs déjà ressenties par le patient (Le Maitre, Freemont, & Hoyland, 2005).

1.3.2.4 La protéine morphogénétique osseuse 7 (BMP-7)

La BMP-7 encore connue sous le nom de la protéine ostéogénique 1 (OP-1) est une protéine faisant partie de la même famille que le TGF- β . Imai et al. ont étudié l'effet du BMP-7 sur des disques de lapins dégénérés à la suite d'une injection de chondroïtinase ABC, une enzyme ayant un effet catabolique sur les protéoglycane notamment la chondroïtine sulfate. Dans cette étude *in vivo*, les résultats ont montré une augmentation significative de la hauteur des disques six semaines après l'injection du BMP-7 comparativement au groupe contrôle. Des images histologiques et des données quantitatives montrent également une synthèse plus accrue de

protéoglycanes dans le groupe traité (Imai et al., 2007). An et al ont fait le même constat dans leur étude *in vivo* avec des modèles de lapin (An et al., 2005). Cependant, des études dans des modèles de grands animaux tels que les chiens (Willems et al., 2015) et les moutons (Peeters et al., 2015) n'ont démontré aucun effet régénératif du BMP 7. Ce qui laisse penser que l'efficacité de cette protéine dépend des espèces des animaux utilisés.

Malgré leur efficacité *in vitro* et durant les tests animaux *in vivo*, aucune étude clinique n'a encore prouvé l'effet de ces molécules au niveau de l'homme (Hodgkinson et al., 2019). Plus encore, certains de ces agents bioactifs, étant donné leur implication dans d'autres mécanismes biologiques, peuvent causer entre autres des effets non voulus et une éventuelle tumorigénicité (Brahmkhatri et al., 2015). Le coût très élevé de ces molécules constitue également un frein pour leur transfert clinique (Antoniou et al., 2012). Le Link N constitue donc une alternative intéressante.

1.3.2.5 Le peptide Link N

Le Link est une glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire du cartilage et du DIV (Melching & Roughley, 1985). Il joue un rôle de stabilisateur pour les liaisons entre les aggrécanes et l'acide hyaluronique. Le peptide formant sa partie N-terminale constituée de 16 acides aminés (DHLSDNYTLDHDRAIH) est nommé le Link N. À l'inverse des agents bioactifs présentés plus haut, ce peptide n'induit pas de la calcification.

Le groupe du professeur Mwale ont effectué plusieurs études pour évaluer l'effet du Link N sur les cellules du disque. Leurs travaux ont montré que le Link N agit en tant qu'agent anabolique et stimule la production de matrice extracellulaire en inhibant les voies de signalisation des molécules et cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 (IL-1). En effet, le Link N stimule la production de matrice extracellulaire en se liant aux récepteurs BMP RII des cellules du disque, ce qui déclenche une cascade de signalisation du complexe Smad/BMP (Wang, Weitzmann, Sangadala, Hutton, & Yoon, 2013). Le Link N permettrait également d'inhiber les molécules responsables de la douleur (Noorwali et al., 2018).

Leur première étude sur le sujet, effectuée en 2003, a démontré que l'ajout du Link N dans une culture tridimensionnelle de cellules NP bovin favorise la synthèse de GAG et la production de collagène II (Mwale et al., 2003). . Cette bioactivité est dose-dépendante et varie donc avec la quantité de Link N utilisée. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude où les cellules du NP humain et de l'AF, encapsulées dans des microbilles d'alginate, produisent plus de protéoglycane en présence de Link N (Gawri et al., 2012)..

Dans une autre étude *in vivo* publiée en 2011, ils ont démontré la potentialité du Link N à stimuler la réparation du disque dégénéré en stimulant la production des composants de la matrice extracellulaire. En effet, leurs résultats ont montré qu'une injection d'une solution de Link N dans un modèle de lapin augmentait la production de protéoglycane ainsi que la hauteur du disque (Figure 1.17) dans le temps (Mwale et al., 2011). De plus, la quantité d'enzymes métaboliques destructrices dans le disque dégénéré diminue considérablement avec l'utilisation du Link N. Une autre étude de la même équipe a également démontré l'efficacité du Link N à stimuler les hMSC différencier à produire de la matrice extracellulaire. Dans cette étude publiée en 2012, les résultats ont montré que l'ajout du Link N dans une culture de hMSC n'a aucun effet sur leur différenciation en cellules chondrogéniques, mais stimule la production de protéoglycane quand ces cellules sont cultivées dans un milieu de différenciation chondrogénique (Antoniou et al., 2012).

Leurs études ont également démontré que le Link N seul ou associé avec des MSC sont suffisantes pour restaurer la quantité de protéoglycane de disques explantés dégénérés (Mwale et al., 2014). Ce peptide est commercialisé par l'entreprise TREPSO THERAPEUTICS INC. à Montréal à des prix plus abordables que les autres agents bioactifs..

Étant donné les propriétés bioactives intéressantes et le coût relativement bas, le Link N est sélectionné comme molécule bioactive de choix pour ce projet. Le TGF- β reste cependant une molécule intéressante qui sera utilisée comme contrôle pour nos études.

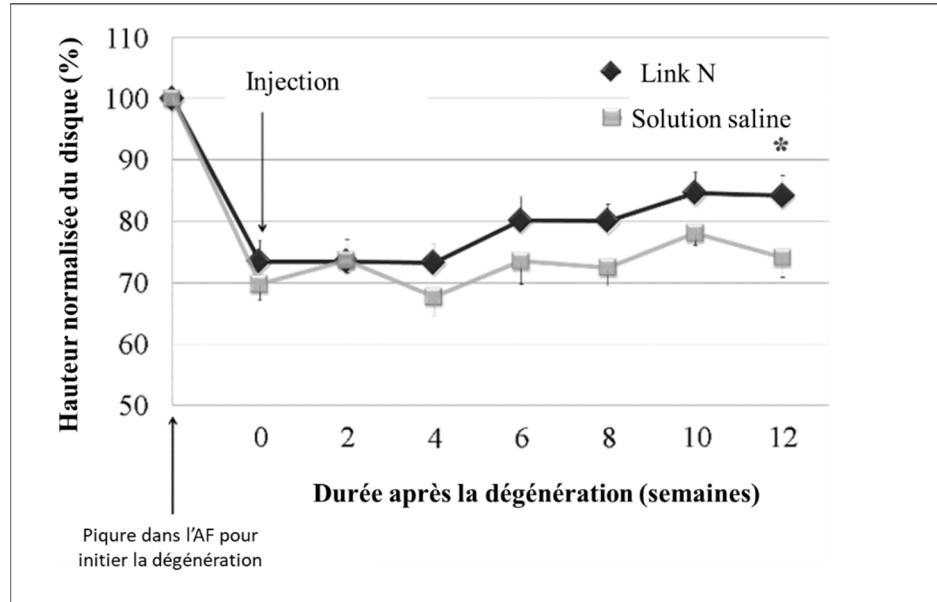


Figure 1.17 Hauteur normalisée du disque dégénéré après injection du Link-N ou d'une solution saline
Adaptée de Mwale et al. (2011)

1.3.3 Les hydrogels : d'excellentes matrices injectables

Au regard des critères présentés dans le cahier des charges et de la structure du disque, les hydrogels injectables constituent d'excellents candidats pour servir de matrice injectable pour la régénération du disque. Cette section du document présente une définition des hydrogels de manière générale et plus spécifiquement ceux étudiés dans le cadre de la régénération du disque.

1.3.3.1 Définition

Les hydrogels sont des matériaux avec un composant solide en faible quantité (quelques pourcents) et un composant liquide: de l'eau. Ils sont constitués d'un réseau de polymères, synthétiques ou naturels, possédant une grande capacité de rétention d'eau (Anseth et al.,

1996). Ils se rapprochent donc de la structure hautement hydratée des tissus biologiques tels que le disque (Vergroesen et al., 2015) et présentent un comportement viscoélastique comme le NP.

Pour la dégénérescence du DIV, ces hydrogels sont soit utilisés pour remplacer le NP de façon mécanique et/ou pour servir de matrice pour la livraison de cellules. Dépendamment de comment l'hydrogel est inséré dans le disque on distingue les matrices implantables par chirurgie et les matrices injectables pour un traitement minimalement invasif. Seules ces dernières seront discutées ici.

Les hydrogels injectables utilisés pour la régénération du DIV peuvent être catégorisés selon la source du polymère utilisé (naturel ou synthétique) ou le type de liaisons constituant leur réseau polymérique (hydrogel physique/chimique).

1.3.3.2 Classification selon la source du polymère

Hydrogels à base de polymères synthétiques

Les chercheurs ont étudié des hydrogels à base de polymères synthétiques à cause de la facilité de contrôle de leurs propriétés intrinsèques et leur capacité à donner des structures plus résistantes. Ces polymères sont pour la plupart utilisés en combinaison avec des polymères naturels afin de renforcer mécaniquement le réseau polymérique. Les plus utilisés pour le disque sont : le polyéthylène glycol (PEG), le poly (N-isopropylacrylamide) (p-NIPAM) et le polyuréthane (Peroglio, Eglin, Benneker, Alini, & Grad, 2013; G. Tang et al., 2020; Thorpe et al., 2016). Ces polymères associés à d'autres molécules permettent de mettre au point des matrices injectables. Des exemples plus concrets seront cités dans la section état de l'art. Cependant, les polymères synthétiques sont pour la plupart non biodégradables et/ou nécessitent des modifications chimiques complexes pour l'être (Cui, Lee, Pauken, & Vernon, 2011; Kumar et al., 2014; Shin, Temenoff, & Mikos, 2003). De plus, la méthode et la chimie de fabrication de certaines formulations induisent la production de produits potentiellement toxiques (Thorpe et al., 2016). Ce qui rend le transfert clinique des hydrogels obtenus avec ces

polymères complexe et limité. Ils sont cependant parfois utilisés conjointement avec un polymère naturel, comme nous le verrons à la section 1.3.4.1.

Hydrogels à base de polymères naturels

Les polymères naturels étudiés pour la régénération du DIV sont le chitosane, l'alginate, l'acide hyaluronique et le collagène ou son dérivé la gélatine. Ces polymères ont l'avantage d'être le plus souvent biocompatibles, biodégradables et largement étudiés dans la littérature. Les sections suivantes présentent les polymères les plus fréquemment étudiés pour la formation d'hydrogels injectables pour le disque.

L'alginate

L'acide alginique ou alginate est extrait des algues brunes. C'est un polysaccharide biocompatible utilisé dans l'industrie de l'agroalimentaire et dans certaines applications biomédicales compte tenu de sa disponibilité et de son moindre coût (Chou, Akintoye, & Nicoll, 2009; Kuo & Ma, 2001). Les hydrogels à base d'alginate se forment à travers des liaisons ioniques entre des cations divalents tels que le calcium et les groupements guluroniques de l'alginate. Ces hydrogels fournissent une structure tridimensionnelle dont les caractéristiques chimiques s'apparentent à celles de la matrice native du disque. En effet, les hydrogels d'alginate possèdent une charge négative comme la matrice du disque (Thonar, An, & Masuda, 2002).

Cependant, la vitesse de gélification de ces hydrogels est très élevée étant donné le caractère presque instantané de la réaction entre l'alginate et le calcium, entraînant une injectabilité limitée et la formation de structures non homogènes (Growney Kalaf, Flores, Bledsoe, & Sell, 2016). De plus, la force et la rapidité de cette réaction font en sorte que les hydrogels d'alginate possèdent une porosité très basse et donc une diffusivité qui diminue significativement selon la taille du gel (macro-gels versus microbilles). En effet, pour améliorer leur survie, les cellules sont le plus souvent encapsulées dans des billes d'alginate et non des macro-gels (Peroglio et

al., 2013). Il faut également noter que les liaisons entre le calcium et l'alginate sont sensibles à la présence d'autres ions tels que le sodium, le magnésium et le potassium. Ces ions, notamment le magnésium se retrouvent en compétition et remplacent le calcium sans pour autant former un hydrogel induisant donc un taux de dégradation assez élevé et peu contrôlable aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Donati, Asaro, & Paoletti, 2009; Hunt, Smith, Gbureck, Shelton, & Grover, 2010). Ces limitations rendent l'utilisation de l'alginate peu appropriée pour la problématique présente.

L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un composant majeur de la matrice extracellulaire des tissus cartilagineux, épithéliaux et nerveux. Il est notamment impliqué dans le développement des organes, la prolifération et la migration cellulaire (Mortisen, Peroglio, Alini, & Eglin, 2010). L'AH est un GAG non lié à une protéine. Il possède donc une grande capacité d'absorption, d'où son utilisation assez répandue dans la thérapie du disque (Peroglio et al., 2013). L'AH seul ne permet pas de former un réseau polymérique stable, il est le plus souvent modifié ou associé à d'autres molécules ou polymères (Highley, Prestwich, & Burdick, 2016) tels que le pNIPAM (Peroglio et al., 2012), la tyramine ((Frith et al., 2013) dans le but de former des hydrogels thermosensibles. Malgré leur capacité à fournir un environnement adéquat pour la survie cellulaire et la production de matrice extracellulaire, les gels d'HA-pNIPAM présentent des propriétés mécaniques limitées et un taux de dégradation élevé *in vivo* qui rend leur utilisation inappropriée dans le contexte de la réparation du disque (Maudens, Meyer, Seemayer, Jordan, & Allémann, 2018).

Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide obtenu de la désacétylation de la chitine. La chitine est un polymère retrouvé au niveau de la carapace des crustacés. On parle de chitosane quand le degré de désacétylation de la chitine est plus de 50% (Lim et al., 2008). Le chitosane est utilisé dans différentes applications biomédicales compte tenu de sa biocompatibilité, son faible coût de

production. Ce polymère permet également de former des hydrogels généralement thermosensibles. La versatilité de ce polymère et la possibilité d'obtenir des propriétés mécaniques et biologiques variées le rendent intéressant pour la problématique actuelle. Il sera détaillé davantage à la section 1.3.5.

Le collagène et la gélatine

Le collagène constitue 25% de la masse totale de protéine dans le corps. Il est présent dans la matrice extracellulaire de la majorité des tissus, ce qui en fait une source de polymère naturel intéressante pour les applications biomédicales. Le collagène de type I est le plus utilisé pour former des hydrogels (Antoine, Vlachos, & Rylander, 2014). Ces hydrogels procurent un excellent environnement pour l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules. Par contre, ils présentent de faibles propriétés mécaniques, un haut degré de dégradation et une contraction (El-Fiqi, Lee, Lee, & Kim, 2013) qui rendent son utilisation complexe pour certaines applications en génie tissulaire telles que la régénération du disque.

La gélatine quant à elle est obtenue de l'hydrolyse acide (gélatine de type A) ou basique (gélatine de type B) du collagène. C'est un polymère qui possède d'excellentes propriétés en termes de survie et prolifération des cellules compte tenu de ses propriétés adhésives comme le collagène. De plus, la gélatine, contrairement au collagène est non immunogène et est donc plus appropriée pour un transfert clinique. Cependant, les gels de gélatine présentent aussi des propriétés mécaniques très faibles. Son utilisation conjointe avec d'autres polymères tels que le chitosane permet d'améliorer ce paramètre (Gentile et al., 2016).

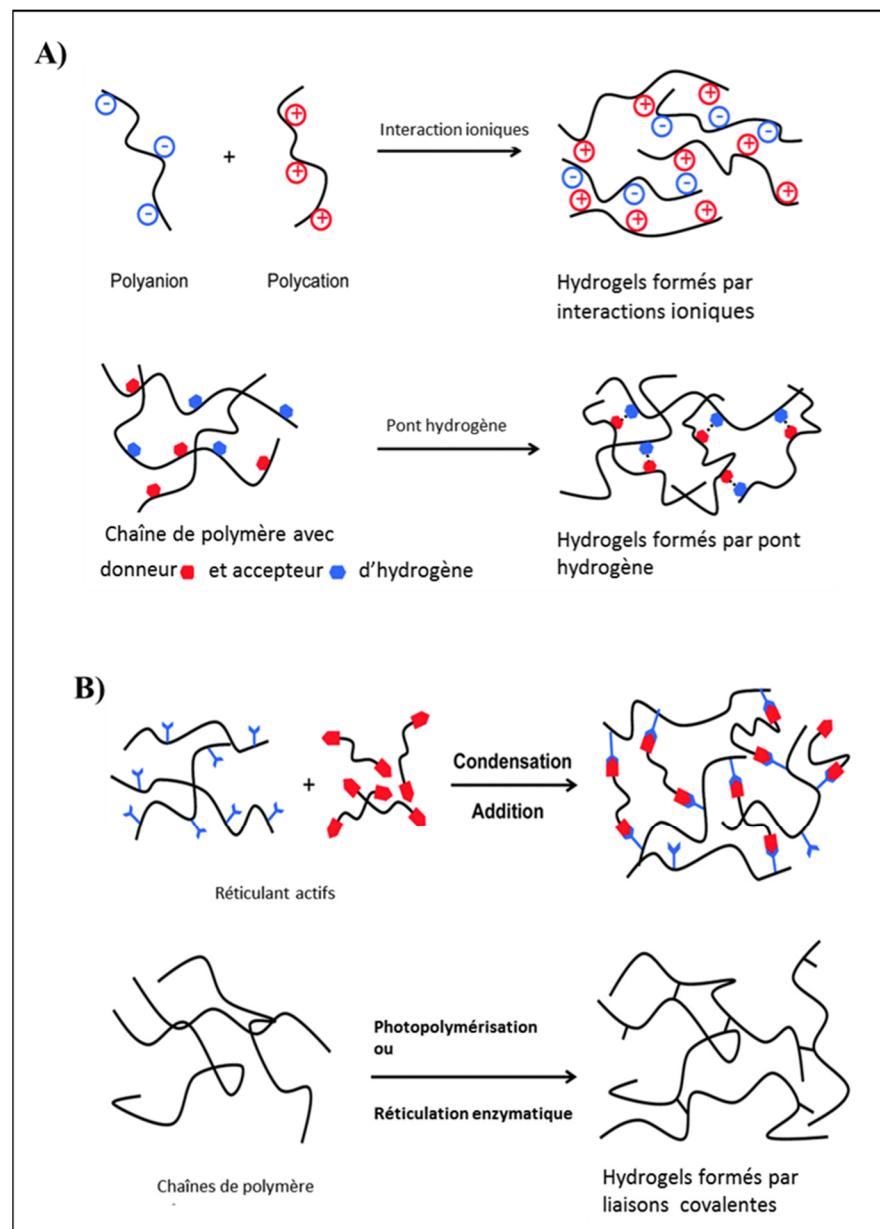


Figure 1.18 Exemples d'interactions dans A) un gel physique B) un gel chimique

Adaptée de Ghobril et Grinstaff (2015)

1.3.3.3 Classification selon le type de liaisons dans le réseau polymérique

Le *type de liaisons présentes* fait référence aux interactions intermoléculaires caractérisant le réseau polymérique de l'hydrogel. La chimie des polymères et ces interactions déterminent la structure tridimensionnelle de l'hydrogel et sont donc très importantes aussi bien pour les propriétés mécaniques que pour la biocompatibilité de la matrice. Selon cette classification, on distingue les **hydrogels physiques** et les **hydrogels chimiques** (Figure 1.18).

Hydrogels physiques

Le réseau polymérique d'un hydrogel physique est assuré par des liaisons faibles entre les chaînes de polymères. Ces liaisons peuvent être des ponts hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou ioniques dues à la présence de charges opposées. Dans ces cas, le gel obtenu possède des propriétés mécaniques relativement faibles et le réseau polymérique est souvent réversible (Gulrez, Phillips, & Al-Assaf, 2011; Ullah, Othman, Javed, Ahmad, & Akil, 2015).

Les hydrogels physiques peuvent être obtenus par un simple mélange de plusieurs composants, ce qui rend leur préparation et utilisation assez simple. Ils ne nécessitent pas l'utilisation d'agents réticulant qui peuvent être toxiques et non adéquats pour des applications biomédicales (Hoffman, 2012). Ils consistent donc des hydrogels plus adéquats pour la survie cellulaire. Le processus de gélification peut être pH-dépendant ou température-dépendant.

Les gels thermosensibles (température dépendant) sont les plus étudiés dans cette catégorie. Ce sont des gels physiques qui passent d'un état liquide à un état solide selon la température, ce qui est un grand atout pour y intégrer les cellules et des molécules bioactives et injecter le tout via de fines aiguilles. Ils seront présentés à la section 1.3.4.2.

Hydrogels chimiques

Ces hydrogels sont souvent obtenus en utilisant des petites molécules appelées *crosslinkers* qui créent des liaisons covalentes entre les chaînes de polymères (Ghobril & Grinstaff, 2015). Ces hydrogels sont donc plus stables et possèdent des propriétés mécaniques intéressantes (Hoffman, 2012). Leur rigidité peut d'ailleurs être ajustée selon la densité de réticulation (Silva-Correia, Correia, Oliveira, & Reis, 2013).

L'utilisation des hydrogels chimiques pour la dégénérescence du DIV est assez répandue compte tenu de la possibilité d'obtenir des structures mécaniquement résistantes et stables. Ils sont soit à base de p-NIPAM, de chitosane, d'acide hyaluronique (Frith et al., 2013), d'alginate (Chou et al., 2009; Kuo & Ma, 2001), de laminine (Francisco et al., 2013). Par contre, les *crosslinkers* utilisés peuvent être très toxiques pour les cellules (Thorpe et al., 2016).

Il existe plusieurs approches pour former des hydrogels chimiques. Les plus répandues sont la polymérisation radicalaire où les chaînes de polymères forment des liens covalents par addition et la photopolymérisation par rayonnement ultra-violet utilisée pour initier des réactions entre différents groupements chimiques. Cette dernière méthode est non appropriée pour la présente application où les rayonnements peuvent être dommageables pour les cellules (Chou et al., 2009; Yang & Li, 2009) et où l'introduction d'une source lumineuse dans le disque serait très difficile.

Cependant, de nouvelles méthodes telles que la «chimie click» (Koschella, Hartlieb, & Heinze, 2011) ou les réseaux polymériques interpénétrés (Interpenetrating polymer network, IPN) sont aussi utilisées pour former des hydrogels chimiques (Anseth & Klok, 2016; Gan et al., 2017; Koschella et al., 2011; Smith et al., 2014; Tsaryk et al., 2015).

La chimie click «regroupe toutes les réactions chimiques capables de former très rapidement et efficacement des intermédiaires synthétiques en établissant des connexions covalentes entre différentes entités» (Bernard et al., 2010). Quant aux IPN, ils résultent de la présence

simultanée au sein de l'hydrogel de deux ou plusieurs réseaux polymériques formés distinctement. Ces réseaux peuvent être entremêlés les uns aux autres (Sperling, 1994; Ullah et al., 2015) et constituent une approche intéressante pour bonifier les propriétés mécaniques des hydrogels, tant chimiques que physiques.

Il faut également mentionner la réticulation enzymatique qui nécessite la présence d'une enzyme pour initier le processus de polymérisation.

La section suivante présente l'état de l'art sur les hydrogels étudiés pour la réparation du DIV.

1.3.4 Les hydrogels injectables pour le disque intervertébral : état de l'art

Les tableaux 1.2 et 1.3 présentent une liste des formulations d'hydrogels chimiques et physiques développés pour la régénération du DIV. Panebianco et al., ont publié une revue systématique des matrices injectables pour la régénération du disque. Dans cette revue, ils ont montré le défi d'obtenir des hydrogels injectables performants aussi bien mécaniquement que biologiquement pour la réparation du disque. En effet, les gels qui possèdent de bonnes propriétés mécaniques ne sont pas toujours biocompatibles et ceux qui sont biocompatibles ne présentent souvent pas de bonnes propriétés mécaniques (Panebianco, Meyers, Gansau, Hom, & Iatridis, 2020). Le même constat est fait au niveau des études qui seront abordées dans les sections prochaines.

1.3.4.1 Les hydrogels chimiques

Comme mentionné plus haut, différents procédés chimiques sont utilisés pour former des hydrogels chimiques. Parmi les études publiées dans le cadre de la régénération du disque, certaines utilisent la polymérisation radicalaire ou la réticulation enzymatique. On peut ainsi citer les travaux de Wiltsey et al. qui ont développé un hydrogel pNIPAM-g-chondroïtine sulfate réticulé avec du méthacrylate par polymérisation radicalaire. Cet hydrogel présente des propriétés mécaniques en torsion intéressantes et favorise la survie de cellules souches

embryonnaires encapsulées. Par contre, la caractérisation mécanique en compression n'a pas été évaluée, ni la production de la matrice extracellulaire (Wiltsey et al., 2013).

Frith et al. ont développé un hydrogel par réticulation enzymatique d'acide hyaluronique et de PEG préalablement fonctionnalisés. De plus, ils ont intégré un agent bioactif, le pentosane polysulphate qui est un polysaccharide sulfaté semi-synthétique ayant démontré sa potentialité à favoriser une différenciation chondrogénique et donc stimuler la synthèse de composants tels que le collagène et les GAG (Ghosh et al., 2010). Cette matrice présente des propriétés mécaniques en torsion intéressantes, une bonne viabilité cellulaire ainsi que la production de collagène II et de GAG. Par contre, outre la chimie complexe, la réticulation requiert l'ajout de peroxyde d'hydrogène qui peut être problématique dans un contexte clinique (Frith et al., 2013).

Certaines équipes ont utilisé la réticulation par réaction de Schiff. Par exemple, Smith et al. ont mis au point un hydrogel à triple réseaux formé par réaction de Schiff à partir de chitosane carboxyméthylé, dextrane oxydé et téloostean (Smith et al., 2014). Cet hydrogel est injectable, thermosensible avec des propriétés mécaniques similaires au NP. Des MSC bovines encapsulées dans cet hydrogel, en présence de TGF- β , ont été capables de survivre, se différencier et produire de la matrice extracellulaire notamment les GAG et du collagène. Cependant la chimie complexe limite fortement la translation clinique de ce gel.

Les IPN constituent également une approche intéressante pour former des gels chimiques présentant d'intéressantes propriétés mécaniques. Par exemple, Gan et al., ont mis au point un réseau IPN constitué de dextrane oxydé, gélatine amino-modifiée (réaction de Schiff) et de PEG-acrylate à 4 branches photo-réticulées par lumière UV. À sa composition optimale, cet hydrogel présente des propriétés mécaniques similaires à celles du NP humain en torsion, mais plus faibles en compression. Les difficultés inhérentes au besoin de photopolymérisation et le risque de présence de groupements acrylates en cas de polymérisation incomplète limitent fortement l'intérêt et les chances de translation clinique de ces gels (Gan et al., 2017).

Il est également possible de combiner deux différents procédés chimiques pour former des hydrogels chimiques. C'est ainsi que Mortisen et al. ont développé un gel chimique thermosensible à base de pNIPAM et d'acide hyaluronique en combinant une technique de polymérisation radicalaire contrôlée et la chimie « click » (Mortisen et al., 2010). Dans une étude comparative avec l'alginate, ils ont démontré que ces gels permettent aux hMSC encapsulées de produire une quantité plus importante de matrice extracellulaire dans un milieu de différentiation chondrogénique et en présence de facteurs de croissance variés. Mais, les auteurs ne présentent aucune caractérisation mécanique en compression de ces gels (Peroglio et al., 2013). De plus, chacun des deux polymères le NIPAM et l'acide hyaluronique ont dû subir des modifications chimiques très complexes pour permettre l'obtention de ces gels. Ce qui pourrait être problématique pour le transfert clinique de la technologie.

En conclusion, ces études, résumées dans le Tableau 1.2, montrent que des hydrogels chimiques ayant de bonnes propriétés mécaniques peuvent être développés. Cependant, le type de réaction de réticulation, la plupart du temps avec des matériaux préalablement fonctionnalisés, la possible toxicité des composants et procédures employés, et la biodégradation peu contrôlable rendent la technologie coûteuse et bien plus difficile à faire approuver par les organismes de réglementation. Les chances de translation clinique de ces technologies sont donc fort limitées.

1.3.4.2 Les hydrogels physiques

Plusieurs équipes ont mis au point et étudié des formulations d'hydrogels physiques pour la réparation du disque. L'objectif de cette démarche est de développer des gels offrant un environnement 3D adapté à l'encapsulation des cellules. Ces études priorisent donc l'utilisation de composants biocompatibles qui peuvent changer d'état sous l'effet de paramètres faciles à contrôler tels que le pH et la température. Ceci explique pourquoi certaines équipes se sont intéressées à la possibilité de former des gels à base des composants naturellement présents dans le disque tels que l'acide hyaluronique et le collagène.

Tableau 1.2 Hydrogels chimiques étudiés dans la littérature

Hydrogels chimiques (1/4)					
Formulations (type de réaction)	Propriétés mécaniques	Cellules encapsulées	Agents bioactifs	Conclusions	Référence
poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) et poly(ethylene glycol) (Polymérisation radicalaire)	Module sécant entre 50-200kPa	-	-	<ul style="list-style-type: none"> - Bonnes propriétés mécaniques - Lente gélification (30 jours pour atteindre des propriétés mécaniques stables) - Aucun test cellulaire 	(Vernengo, Fussell, Smith, & Lowman, 2008)
Hyaluronan grafted	-	hMSC	GDF-5 et TGF- β 1	<ul style="list-style-type: none"> - La viabilité baisse avec le temps <i>in vitro</i> (90% à 70% en 7 jours). - Production similaire de GAG, mais meilleure rétention dans le gel HA-pNIPAM - Bonne viabilité cellulaire dans des disques explantés (90% après 7jours de culture) - L'ajout des facteurs de croissance n'a eu aucun effet significatif sur la production de matrice extracellulaire - Aucune caractérisation mécanique 	(Perogio et al., 2013)

Tableau 1.2 Hydrogels chimiques étudiés dans la littérature (suite)

Hydrogels chimiques (2/4)					
Formulations (type de réaction)	Propriétés mécaniques	Cellules encapsulées	Agents bioactifs	Conclusions	Références
Poly (éthylène glycol) lamine (PEG-LM111) (Polymérisation radiculaire)	T (G=G) = 25min et G*=0.9-1.5kPa	Cellules NP porcines	-	- Propriétés mécaniques plus basses que celles du NP - Temps de gélification relativement long - Faible rétention des cellules dans la matrice - Mort cellulaire	(Francis co et al., 2013)
Acide hyaluronique réticulé avec du PEG (Polymérisation radiculaire)	G'= 3.9-5.5 kPa	MSC	pentosan poly-sulphate	- Propriétés mécaniques en torsion similaire au NP - Bonne viabilité cellulaire après 7 jours - Utilisation H2O2 pourrait être problématique in vivo	(Frith et al., 2013)
Acid sodium 2-acrylamido, methylpropane sulfonique et acrylate (Polymérisation radiculaire)	2-Module sécant entre 8 à 50 Kpa après réticulé avec du 3-sulfopropyl acrylate (Polymérisation radiculaire)	-	-	- Propriétés mécaniques intéressantes - Matrice non cytotoxique (cytotoxicité directe, cellules non encapsulées) - Pas de cellules encapsulées	(Sivan et al., 2014)

Tableau 1.2 Hydrogels chimiques étudiés dans la littérature (suite)

Hydrogels chimiques (3/4)					
Formulations (type de réaction)	Propriétés mécanique \$	Cellules encapsulées	Agents bioactifs	Conclusions	Références
Dextran oxyd-chitosane carboxylé-teleostean (Réaction de Schiff)	Module d'équilibre de 9.48 \$\pm\$2.06 kPa	hMSC	TGF-β3	<ul style="list-style-type: none"> - Cet hydrogel présente des propriétés mécaniques similaires au NP. - Une augmentation des propriétés mécaniques ainsi que de la production de GAG est constaté dans le temps. - Les essais avec le facteur de croissance présentent une meilleure viabilité et production de MEC - Une grande quantité de cellules a été utilisée (20millions/mL) 	(Smith et al., 2014)
N-isopropylacrylamide (NIPAM), N,N'-dimethylacrylamide (DMAc) Et des particules de Laponite® Clay (Polymérisation radiculaire)	-	hMSC	-	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation cellulaire des hMSC dans un milieu hypoxique sans ajout de facteurs de croissance - Mort des hMSC entre 3 et 4jours et prolifération cellulaire après 7jours - Le milieu hypoxique favorise la production de GAG - Propriétés mécaniques évaluées, mais non comparées à celles du disque 	(Thorpe et al., 2016; Thorpe et al., 2017)

Tableau 1.2 Hydrogels chimiques étudiés dans la littérature (suite et fin)

Hydrogels chimiques (4/4)					
Formulations (type de réaction)	Propriétés mécaniques	Cellules encapsulées	Agents bioactifs	Conclusions	Références
Réseau interpénétré constitué de dextrane oxydé (Odex), gélatine amino-modifiée et poly-(éthylène glycol)-acrylate à 4 branches (4APEG-acr) (Photopolymérisation)	Module de Young entre 2 à 60 kPa et G* entre 13 et 46 kPa	Cellules de NP porcin	-	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés mécaniques en torsion similaire aux propriétés du NP humain - Environ 96 % de viabilité cellulaire après 14 jours de culture pour la formulation optimale - Rétention et survie des cellules dans un modèle <i>in vivo</i> de disque de rat 	(Gan et al., 2017)
Carboxyméthylcellulose méthacrylate (CMC) avec d'équilibre à du méthylcellulose (Polymérisation radicalaire)	Module d'équilibre à 16.62 ± 3.59 ou 8.249 ± 1.372 kPa	Fibroblaste s dermiques humaines	-	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés mécaniques en compression élevées (plus élevées que celles du NP humain) - La viabilité et la production de matrice extracellulaire n'ont pas été caractérisées 	(Varma et al., 2018)
poly (N-isopropylacrylamide)-g-chondroitin sulfate (Polymérisation radicalaire)	15% modulus sécant 1.2 – 11.9 kPa (Après 14jours)	-	-	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés mécaniques similaires au NP - Bonne viabilité cellulaire - Tests en compression non effectués - Pas d'évaluation de la matrice extracellulaire 	(Wiltsey et al., 2013)

Neidlinger-Wilke, et al. ont évalué la capacité d'un gel de collagène de type I à servir de matrice de livraison des cellules du disque humain (NP et AF). Ce gel, initialement liquide permet d'encapsuler les cellules et se gélifie à 37°C dans l'intervalle de 30 minutes. Il permet également aux cellules de proliférer et de produire de la matrice extracellulaire. Par contre, aucune mention n'a été faite des propriétés mécaniques (Neidlinger-Wilke et al., 2005). Le même constat est fait pour un gel à base d'acide hyaluronique et de méthylcellulose qui permet l'encapsulation de MSC (obtenu de la gelée de Wharton, un tissu du cordon ombilical). Choi et al. ont démontré que cette matrice permet une meilleure suivie et rétention des cellules ainsi qu'une meilleure production de GAG *in vitro* et *in vivo* (modèle de lapin) (Choi et al., 2020). Outre les propriétés mécaniques qui ne sont pas mentionnées, le collagène et l'acide hyaluronique utilisés dans ces études peuvent subir une dégradation rapide *in vivo*.

L'utilisation de polymères naturels, mais non présents dans le disque constitue une autre possibilité pour former des gels physiques biocompatibles. À cet effet, l'alginate et le chitosane sont intéressants.

L'alginate permet de former un réseau polymérique en présence de calcium, mais la réaction instantanée peut rendre l'injectabilité du gel difficile. C'est pourquoi, Gowney Kalaf et al., en ajoutant du calcium carbonate et du GDL (D-(+)-gluconic acid δ-lactone) ont mis au point un gel d'alginate dont la gélification est plus contrôlée et moins rapide. Leur modification permet d'obtenir des gels en 3 à 77 min dépendamment de la concentration de calcium carbonate. Les propriétés mécaniques obtenues sont intéressantes, mais leur maintien dans le temps nécessite un apport constant de calcium, ce qui n'est pas faisable *in vivo*. En effet, ces gels d'alginate se dissolvent très rapidement en absence de source de calcium (Gowney Kalaf et al., 2016).

Ces problèmes de dégradation rapide peuvent être palliés par l'utilisation d'un polymère réputé biocompatible, mais dont la biodégradabilité peut être contrôlée. Le chitosane constitue un candidat intéressant. En effet, la biodégradabilité de ce polymère peut être contrôlée à travers le degré de désacétylation (DDA). Plus le DDA est élevé, moins vite le polymère se dégrade

(Lim et al., 2008). De plus, ce polymère permet de former des hydrogels thermosensibles en présence de bases faibles telles que le β -glycérophosphate (BGP)(Chenite et al., 2000; Lavertu, Filion, & Buschmann, 2008). Plusieurs équipes ont évalué la possibilité d'utiliser ces gels de chitosane pour la régénération du disque intervertébral (Richardson et al., 2008; Roughley et al., 2006)

Par exemple, Richardson et al. ont mis au point un hydrogel physique thermosensible en mélangeant des solutions de chitosane (3% w/v) et de BGP (0.5 M) pour la culture de plusieurs types cellulaires *in vitro* (hMSC, CNP, chondrocytes). Cet hydrogel présente des propriétés biologiques intéressantes. En effet, les trois types cellulaires encapsulés dans cet hydrogel présentent une viabilité de plus de 70% après quatre semaines de culture. Les cellules ont également produit des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène et les GAG (Richardson et al., 2008). Ce qui confirme que ces gels sont suffisamment stables pour supporter une longue période de culture et possèdent donc un degré de dégradation moindre. En revanche, la gélification se fait à une température de 42°C, qui n'est pas atteignable *in vivo* et les auteurs ne font aucune mention des propriétés mécaniques de cette matrice. Cependant, Roughley et al. ont mentionné dans leur étude la difficulté de manipuler les gels chitosane/BGP compte tenu de leur manque de fermeté confirmant ainsi que ces gels présentent de faibles propriétés mécaniques (Roughley et al., 2006).

Cheng et al. ont cherché à augmenter les propriétés mécaniques des gels de chitosane/BGP par l'ajout de la gélatine. Les résultats ont montré une augmentation significative du module de stockage G' du gel à 37°C (qui passe de 30 Pa à 600 Pa après 13 min de gélification) ainsi qu'une diminution du temps de gélification (de plus de 600 versus moins de 60 secondes) en présence de la gélatine sans aucun effet sur la viabilité des cellules ainsi que la production de GAG. Le temps de gélification est la durée nécessaire pour le croisement des courbes des modules de stockage G' et de perte G'' et indique quand la solution liquide devient un gel. Malgré l'augmentation significative, ces propriétés restent très faibles selon les spécifications requises pour le disque. De plus, aucune caractérisation des propriétés en compression ou en torsion n'a été présentée (Cheng et al., 2010).

Ces quelques exemples de la littérature, résumés dans le Tableau 1.3, montrent que ces hydrogels physiques, bien qu’étant biocompatibles et injectables, présentent des insuffisances, la plus importante limitation étant leurs **faibles propriétés mécaniques** (Peroglio et al., 2013). Comme mentionné dans le cahier des charges, dans le cadre du remplacement du disque, la matrice à utiliser doit présenter des propriétés mécaniques similaires à celles du tissu sain afin de renforcer le tissu dégénéré et fournir un environnement adapté à la production des composants de la matrice extracellulaire (Schmitz et al., 2020).

1.3.4.3 Résumé de l'état de l'art sur les hydrogels

Les matrices injectables actuelles pour la régénération du DIV ne respectent pas pleinement les spécifications requises c'est-à-dire des propriétés mécaniques adéquates et une biocompatibilité appropriée, ou requièrent des composants et méthodes chimiques complexes et potentiellement toxiques, qui rendent peu probable les chances de translation vers la clinique. En effet, les matrices présentées plus haut, pour la plupart, « sacrifient » les propriétés mécaniques au profit des compétences biologiques ou vice-versa (Panebianco et al., 2020).

Il est donc important de mettre au point une nouvelle génération de matrices qui présentent un équilibre entre les performances mécaniques et biologiques c'est-à-dire qui permet de renforcer les propriétés mécaniques du tissu en dégénérescence tout en assurant la survie des cellules encapsulées ainsi qu'une activité de synthèse optimale, gage d'une régénération du disque. C'est l'objectif général de ce projet.

Nous savons que les hydrogels thermosensibles à base de chitosane offrent des avantages intéressants comme matrice d'encapsulation de cellules, notamment en termes d'injectabilité et de biocompatibilité. Cependant, leurs propriétés mécaniques sont trop faibles. Dans la section suivante, nous expliquons plus en détail les propriétés de ces hydrogels et présentons les travaux antérieurs de l'équipe qui suggèrent la possibilité de renforcer significativement les propriétés mécaniques de ces hydrogels et donc les rendre appropriés pour la réparation du disque.

Tableau 1.3 Hydrogels physiques étudiés dans la littérature

Hydrogels physiques (1/3)					
Formulations (type de réaction)	Propriétés mécaniques	Cellules encapsulée	Agents bioactifs	Conclusions	Références
Atelocollagen® (étude in-vivo, lapin)		MSC (lapin)	-	<ul style="list-style-type: none"> - Matrice utilisée juste pour livrer les cellules, aucune référence sur les propriétés mécaniques. - Bonne viabilité initiale (95%), mais diminue dans le temps - Différenciation des hMSC, production de matrice extracellulaire 	(Sakai et al., 2003)
Collagène Type I gel (étude in-vitro)	Cellules humaines du NP et de L'AF		-	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne viabilité cellulaire (91% après 4 semaines de culture) - Meilleure production de matrice extracellulaire sous stimulation mécanique - Gélation relativement lente (30min à 37°C) 	(Neidlinger-Wilke et al., 2005)
15% acide hyaluronique gel (étude in-vivo, rat)	MSC (rat)		-	<ul style="list-style-type: none"> - Mauvaise rétention des cellules (matrice très peu visqueuse, propriétés mécaniques insuffisantes) - Prolifération des cellules dans le temps 	(Crevenst en et al., 2004)

Tableau 1.3 Hydrogels physiques étudiés dans la littérature (suite)

Hydrogels physiques (2/3)					
Formulations (type de	Propriétés mécaniques	Cellules encapsulée	Agents bioactifs	Conclusions	Références
Alginate	G' entre 300 et 2000 Pa	Fibroblastes humaines	-	<ul style="list-style-type: none"> - Temps de gélification long (entre 3 et 77 min selon la concentration de CaCO₃ ajoutée) - Propriétés mécaniques faibles - Production de matrice extracellulaire non caractérisée 	(Gowney et al., 2016)
Acide hyaluronique et méthylcellulose	MSC	-	-	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés mécaniques non caractérisées, la matrice a été utilisée uniquement comme matrice de livraison pour les cellules - Environ 50% de viabilité cellulaire après 7 jours de culture - Caractérisation qualitative de la matrice extracellulaire 	(Choi et al., 2020)
Chitosane (3%)/β-Glycérophosphate (0.5M)	-	CNP, MSC, chondrocytes	-	<ul style="list-style-type: none"> - Gélification à 42°C, cliniquement inadéquat - Environ 70% de viabilité pour les trois types cellulaires - Meilleures quantités de GAG et de collagène produits par les hMSC et les CNP - Propriétés mécaniques non évaluées 	(Richards et al., 2008)

Tableau 1.3 Hydrogels physiques étudiés dans la littérature (suite et fin)

Hydrogels physiques (3/3)					
Formulations	Propriétés mécaniques	Cellules encapsulée	Agents bioactifs	Conclusions	Références
Chitosane, β -glycérophosphate	-	Cellules du NP et AF (bovines)	-	<ul style="list-style-type: none"> - Production plus importante de GAG par les cellules NP pour les gels de chitosane/BGP - Production similaire de GAG par les cellules AF dans les 3 formulations - Les propriétés mécaniques n'ont pas été évaluées, mais les auteurs affirment que les gels de chitosane/BGP étaient difficiles à manipuler 	(Roughle y et al., 2006)
Chitosane, β -glycérophosphate et gélatine	$G' = 400$ et 600 Pa après 10min à 37°C	Cellules du NP (lapin)	-	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration du module de stockage en présence de gélatine - Augmentation de la vitesse de gélification avec la gélatine - Bonne viabilité cellulaire et production de matrice extracellulaire 	(Y.-H. Cheng et al., 2010)
Gel colloïdal de gélatine A et B	G' entre 0.8 et 5.8 kPa selon la concentration de gélatine	MSC de lapin	-	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés mécaniques similaires au NP de lapin, mais faibles comparées au NP humain - Solution injectable uniquement avec des aiguilles de diamètre relativement élevé (18G et 21 G) - Bonne viabilité et prolifération cellulaires - Rétention au site d'injection 	(H. Wang et al., 2011; Y. Wang et al., 2021)

1.3.5 Le chitosane et les hydrogels de chitosane

Comme mentionné plus haut, le chitosane (voir Figure 1.19) est un polymère naturel obtenu de la désacétylation de la chitine. La masse moléculaire ainsi que le DDA sont des paramètres importants pouvant influencer les propriétés, telles que la solubilité du polymère, les propriétés mécaniques des gels obtenus ainsi que leur biodégradabilité (Rinaudo, 2006).

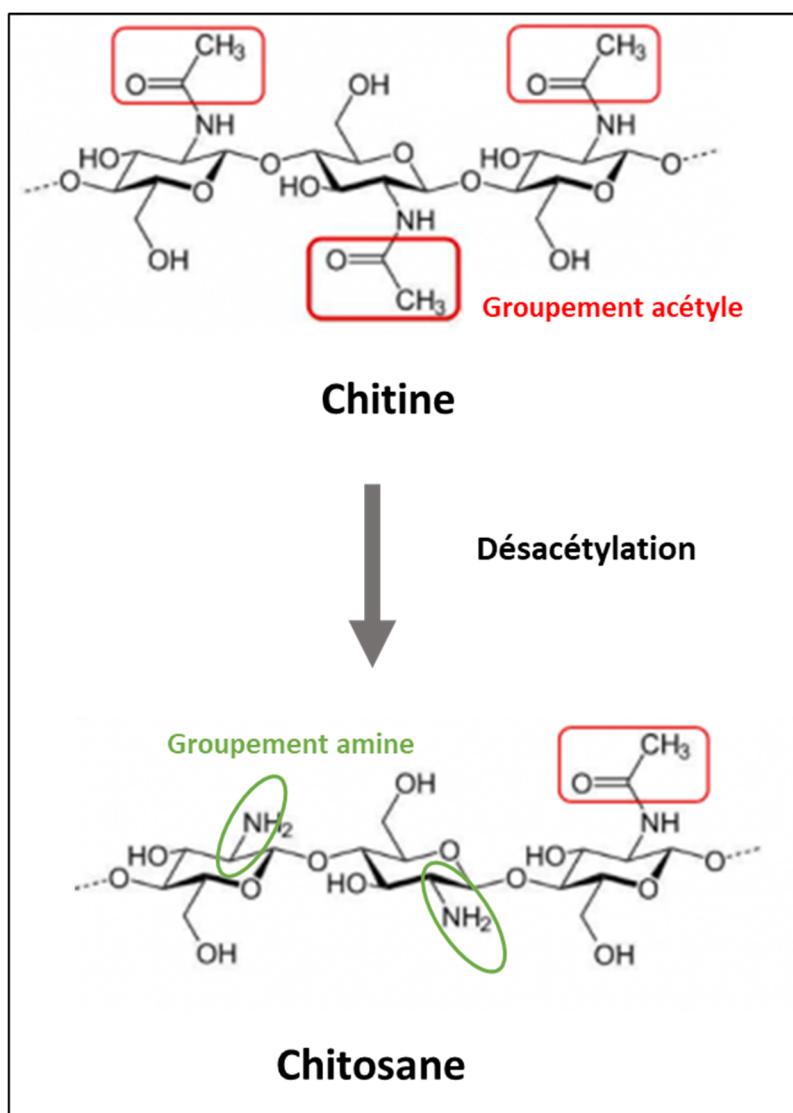


Figure 1.19 Structure chimique du chitosane

Adaptée de COMGRAF sas France (2021)

1.3.5.1 Mécanisme de formation des hydrogels thermosensibles de chitosane

Le chitosane est soluble uniquement dans des solutions acides où il garde une forme protonée avec des charges positives entraînant des forces répulsives entre les chaînes. Comme montré par Chenite au début des années 2000, l'ajout d'une base faible négativement chargée comme le BGP maintient le chitosane soluble à température ambiante à un pH neutre et rend la solution thermosensible (Chenite et al., 2000). En effet, quand la température augmente, on assiste au transfert des protons du chitosane au BGP et la formation de liens intermoléculaires entre les chaînes de chitosane et donc la solidification de la solution (Lavertu et al., 2008). Ce qui conduit à l'obtention d'un hydrogel d'aspect solide comme montré sur la Figure 1.20.

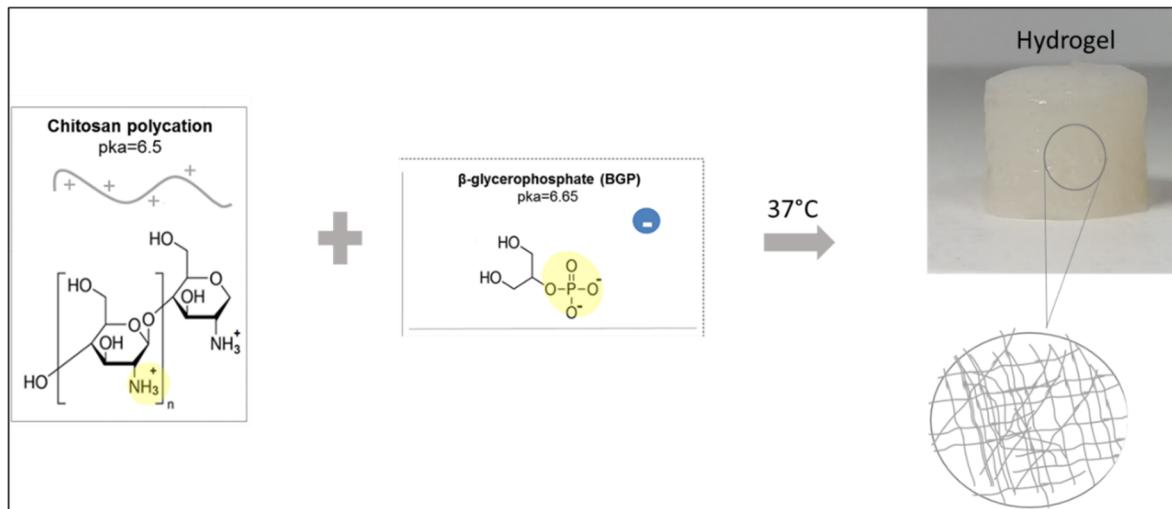


Figure 1.20 Mécanisme de formation des hydrogels de chitosane

Adaptée de Alinejad, Adoungotchodo, Hui, Zehtabi, & Lerouge (2018)

La cinétique de gélification peut être suivie grâce à la variation des modules de stockage (G') et de perte (G''). En effet, comme sur la Figure 1.21, ces paramètres rhéologiques varient selon l'état liquide ou solide du mélange. Par exemple un gel thermosensible à 37 °C présentera un état liquide au début de la gélification et donc $G' < G''$. La gélification se produit au moment où $G' = G''$ et le module $G' > G''$ par la suite.

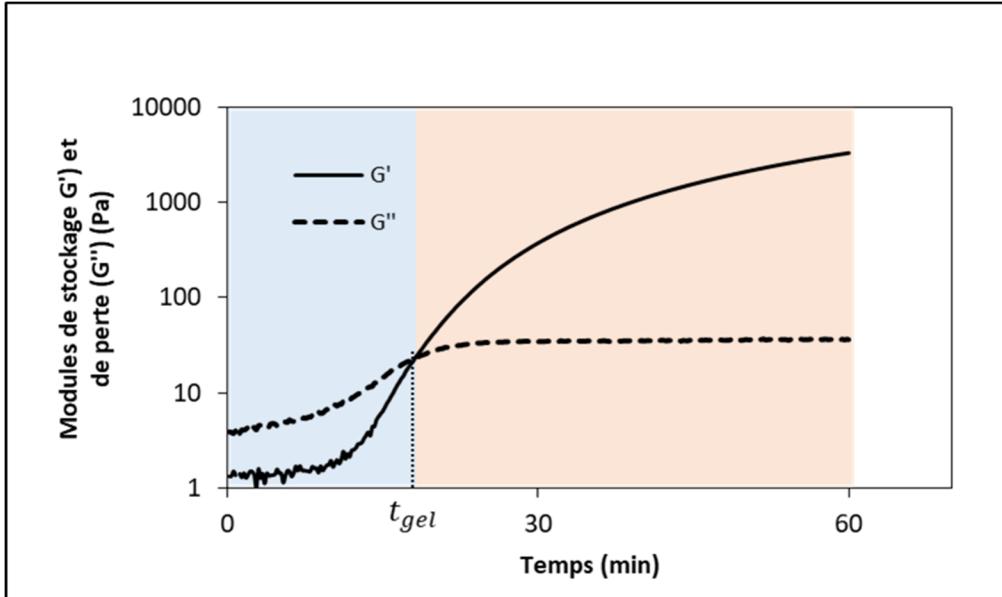


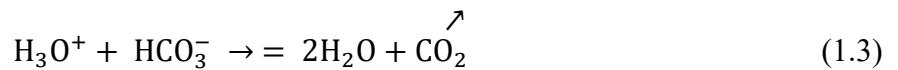
Figure 1.21 Évolution des modules de stockage et de perte d'un gel thermosensible à 37°C (t_{gel} = temps de gélification). Le mélange est liquide dans le cadre bleu et solide dans le cadre orange

Étant donné ces propriétés uniques, plusieurs équipes ont étudié ces hydrogels pour l'encapsulation cellulaire, avec d'excellents résultats en termes de survie et de production de matrice extracellulaire, mais ces formulations présentent des propriétés mécaniques limitées pour être utilisées dans le cadre du disque (Cheng et al., 2010; Richardson et al., 2008; Roughley et al., 2006). De plus, pour obtenir une gélification rapide, une forte concentration de BGP est requise, ce qui génère des hydrogels d'osmolarité supérieure à l'osmolarité physiologique (330 mOsm/L). L'osmolarité est la concentration de particules ioniques ou non présentes dans une solution et participant à la pression osmotique de cette dernière. La pression osmotique étant la pression minimale à appliquer pour empêcher le déplacement de solvant d'une solution moins concentrée à une plus concentrée séparée par une membrane perméable.

1.3.5.2 Des hydrogels de chitosane avec de meilleures propriétés mécaniques

Dans les dernières années, l'équipe du professeur Lerouge a mis au point des hydrogels thermosensibles physiques présentant de meilleures propriétés mécaniques (Assaad et al., 2015). Les formulations mises au point utilisent le même mécanisme que les gels chitosane/BGP, mais en modifiant la base faible utilisée. Les agents gélifiants développés sont constitués d'une solution de sodium d'hydrogénocarbonate (HCO_3^- , nommé SHC pour la suite du document) qui est mélangée avec du BGP ou un tampon de phosphate (PB). Ces formulations donnent des hydrogels physiques avec des propriétés mécaniques nettement plus élevées que les gels chitosane/BGP classiques (Figure 1.22). Avec ces formulations, il est possible d'atteindre les 200 kPa comme module sécant à 50% de déformation comparativement à <10 kPa pour les gels CH/BGP classiques (Assaad et al., 2015; Ceccaldi et al., 2017).

L'amélioration des propriétés mécaniques est due à l'utilisation du SHC dans l'agent gélifiant. Lorsqu'il est ajouté à une concentration optimale de 75 mM (pour 2% de CH), il assure de meilleures propriétés mécaniques après complète gélification. Cela s'explique par la petite taille de la molécule (comparativement au BGP) et sa libération du réseau polymérique sous forme de CO_2 (voir équation ci-dessous) qui permettent un meilleur enchevêtrement entre les chaînes de chitosane.



Cependant, les gels chitosane/SCH n'ont pas un pH parfaitement physiologique (légèrement basique). De plus, la vitesse de gélification des solutions chitosane/SCH est relativement faible, ce qui n'est pas approprié pour une injection localisée.

En effet, la solution d'hydrogel doit être assez liquide pour être injectable et remplir les petits défauts au site d'injection, mais elle doit également se solidifier assez rapidement pour rester au site ciblé et éviter de se disperser à des endroits non voulus. L'ajout du BGP ou du PB

permet d'augmenter la vitesse de gélification des gels chitosane/SHC, mais a un effet négatif sur les propriétés mécaniques (Ceccaldi et al., 2017). Il est donc nécessaire de faire une étude d'optimisation afin de choisir la formulation optimale qui permet à la fois d'obtenir des propriétés mécaniques et un profil de gélification acceptables.

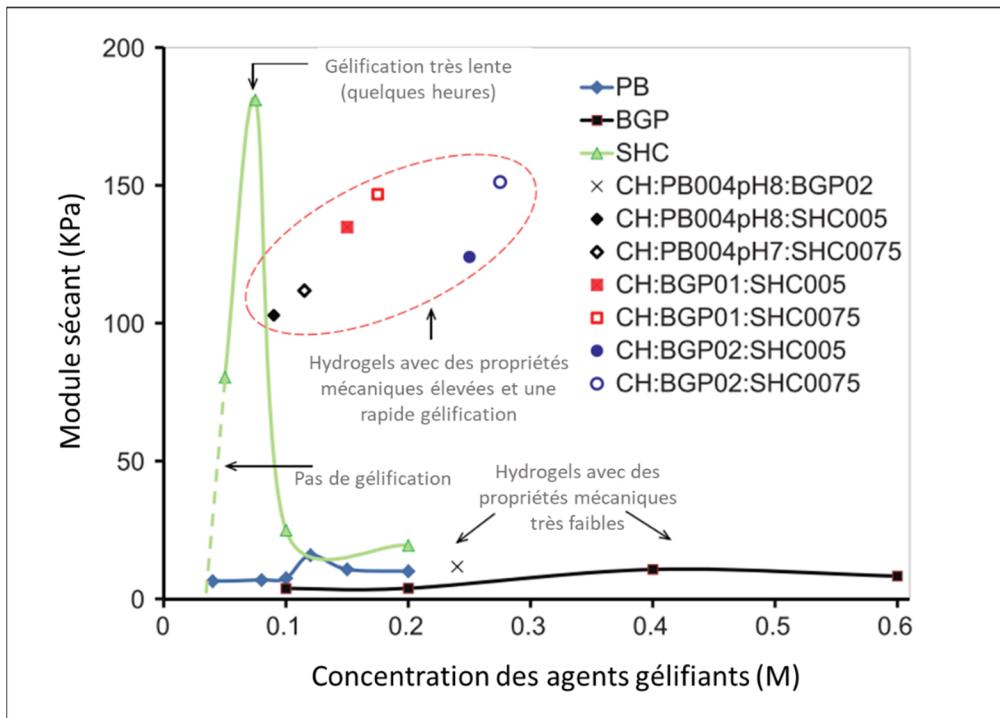


Figure 1.22 Propriétés mécaniques en compression des nouvelles formulations d'hydrogels de chitosane

Adaptée de Assaad, Maire et Lerouge (2015)

En dehors des propriétés mécaniques, la composition des agents gélifiants pourrait influencer également les paramètres permettant de caractériser la biocompatibilité du gel. Parmi ces paramètres, des études dans le laboratoire se sont intéressées au pH et l'osmolarité des hydrogels ainsi que la viabilité des cellules encapsulées dans ces gels.

Les résultats ont démontré que les formulations présentant des pH et osmolarité physiologiques étaient plus aptes à supporter la survie des cellules encapsulées. Plusieurs travaux de l'équipe

ont donc été faits afin d'évaluer l'effet de la composition du gel sur la viabilité de différents types de cellules. Ceccaldi et al. ont démontré qu'en variant la composition de l'hydrogel, il était possible d'obtenir des formulations assurant une bonne viabilité cellulaire pour des fibroblastes et des MSC encapsulées (Ceccaldi et al., 2017). Monette et al. ont démontré dans une autre étude l'efficacité de l'une de ces formulations (75mM SHC et 40mM PB) pour la livraison localisée de lymphocytes T pour le traitement du cancer (Monette et al., 2016). Les résultats (Figure 1.23) démontrent que la structure moléculaire de ces hydrogels est appropriée pour la viabilité cellulaire.

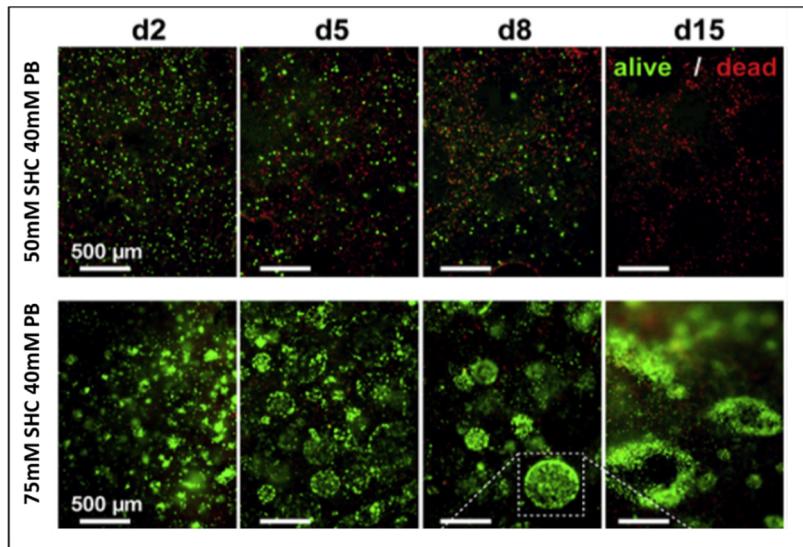


Figure 1.23 Viabilité des lymphocytes T encapsulées dans les hydrogels de chitosane
Adaptée de Monette et al. (2016)

Ces différents résultats nous permettent de poser l'hypothèse selon laquelle ces nouvelles formulations d'hydrogels de chitosane pourraient être d'excellents candidats comme matrice de régénération du NP. Cependant elles doivent bien sûr être optimisées.

CHAPITRE 2

HYPOTHÈSES, OBJECTIFS DU PROJET

2.1 Résumé de la revue de littérature

Les thérapies injectables pour la régénération du disque intervertébral requièrent l'utilisation de cellules, mais aussi d'une matrice injectable devant respecter un cahier des charges spécifique. Ce cahier des charges comprend entre autres des spécifications mécaniques et des critères biologiques. Au meilleur de nos connaissances, il n'existe actuellement aucune matrice respectant pleinement les spécifications nécessaires. En effet, les matrices déjà mises au point présentent soit des propriétés mécaniques adéquates avec des procédés chimiques complexes difficilement biocompatibles et ayant peu de chance de translation clinique, soit ces matrices présentent une bonne biocompatibilité, mais des propriétés mécaniques insuffisantes. Les hydrogels thermosensibles de chitosane entrent dans cette deuxième catégorie, mais de récents travaux ont montré qu'il est possible d'augmenter drastiquement les propriétés mécaniques de ces gels en modifiant les agents gélifiants. Cela en ferait de bons candidats pour la régénération du noyau pulpeux (NP), sur lequel se concentre ce projet étant donné que la dégénérescence débute à cet endroit du disque.

L'**objectif général** de ce projet est de mettre au point une matrice injectable à utiliser de façon minimalement invasive pour renforcer mécaniquement le NP dégénéré, mais aussi stimuler la production d'un nouveau NP fonctionnel possédant les propriétés biomécaniques similaires au tissu sain.

Ce travail fait l'**hypothèse** selon laquelle les nouvelles formulations d'hydrogels de chitosane plus le Link N sont capables de fournir un support mécanique au disque dégénéré tout en permettant la production des composants de sa matrice extracellulaire. Les objectifs et hypothèses du projet sont présentés ci-dessous de façon plus spécifique.

2.2 Objectifs et hypothèses spécifiques du projet

2.2.1 Premier objectif

Hypothèse 1 : Il est possible de développer des hydrogels de chitosane injectables possédant des propriétés mécaniques similaires au NP sain et permettant une bonne viabilité cellulaire ainsi qu'une production adéquate de matrice extracellulaire.

Objectif 1 : Évaluer et sélectionner les meilleures formulations d'hydrogels de chitosane injectables et évaluer leur potentiel pour la régénération du NP.

Objectif 1.1 : Étudier l'influence de la composition sur les propriétés rhéologiques et mécaniques des gels de chitosane pour identifier les formulations les plus prometteuses.

Objectif 1.2 : Effectuer une caractérisation mécanique plus approfondie des formulations les plus prometteuses et les comparer au NP sain dans un contexte *in vitro* (gels seuls comparés au NP seul) afin de sélectionner celles respectant les conditions mécaniques spécifiées plus haut.

Objectif 1.3 : Évaluer la capacité de ces formulations à supporter la survie, la prolifération et la production de matrice extracellulaire par les cellules du NP encapsulées.

2.2.2 Second objectif

Objectif 2 : Mettre au point des stratégies pour augmenter l'activité de synthèse des cellules du NP encapsulées dans les gels de chitosane.

Hypothèse 2 : La gélatine, connue pour améliorer l'adhésion cellulaire, et le peptide Link N, seuls ou en combinaison, permettraient d'augmenter significativement la capacité des cellules

NP encapsulées dans le gel de chitosane, à synthétiser de la matrice extracellulaire notamment les protéoglycans.

Objectif 2.1 : Évaluer le potentiel de la gélatine à améliorer l'activité de synthèse des cellules NP encapsulées dans les gels de chitosane, et son éventuel impact sur les propriétés mécaniques des hydrogels.

Objectif 2.2. Évaluer *in vitro* l'effet de l'ajout du Link N sur la survie cellulaire et la synthèse de matrice extracellulaire par les cellules du NP encapsulées dans les gels de chitosane.

Objectif 2.3 : Déterminer le bénéfice de l'utilisation combinée de la gélatine et du Link N sur l'activité de synthèse des cellules NP en comparaison des facteurs de croissance tels que le TGF- β .

2.2.3 Troisième objectif

Objectif 3 : Mettre au point un test *ex vivo* permettant de confirmer la capacité du gel à restaurer le comportement mécanique d'un disque dégénéré.

Hypothèse 3 : La prise en compte des paramètres pouvant induire des variabilités permettrait d'évaluer de façon fiable la performance mécanique des modèles de disque dégénérés et la capacité des hydrogels à restaurer les propriétés mécaniques du disque.

Objectif 3.1 : Déterminer l'impact des niveaux vertébraux, des variabilités inter-spécimen et des conditions de tests sur les propriétés mécaniques des disques bovins sains.

Objectif 3.2 : Proposer une technique de sélection des échantillons et des conditions de tests afin d'évaluer la performance mécanique d'un modèle enzymatique de disque bovin dégénéré.

Objectif 3.3 : Évaluer l'effet de la méthode de dégénérescence, du mode de stockage des échantillons et de l'injection du gel sur les propriétés mécaniques des disques bovins.

2.2.4 Quatrième objectif

Objectif 4 : Évaluer le potentiel de transfert clinique de la technologie avec les cellules souches/stromales mésenchymateuses (hMSC).

Objectif 4.1: Évaluer la capacité des gels de chitosane associés au Link N à sauvegarder la survie et stimuler la production de protéoglycans par les hMSC encapsulées et cultivées dans un milieu présentant la composition biochimique d'un disque dégénéré.

Objectif 4.2 : Les résultats ayant montré une faible viabilité des hMSC dans les gels de chitosane, ce second sous-objectif a consisté à comprendre les causes et trouver des stratégies pour améliorer cette viabilité.

Les chapitres 3 à 6 qui suivent présentent les résultats obtenus respectivement pour les objectifs 1 à 4

CHAPITRE 3

INJECTABLE CHITOSAN HYDROGELS WITH ENHANCED MECHANICAL PROPERTIES FOR NUCLEUS PULPOSUS REGENERATION

Yasaman Alinejad ^{1,2,3}, Atma Adoungotchodo ^{*1,2,3}, Michael P Grant ³, Laura M Epure ³,
John Antoniou^{3,4}, Fackson Mwale ^{3,4}, Sophie Lerouge ^{1,2}

¹Laboratory of Endovascular Biomaterials (LBeV), Centre de recherche du CHUM
(CRCHUM), 900 St Denis St, Montreal, QC, H2X 3H8, CANADA

²Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure (ETS), 1100
Notre-Dame West, Montreal, QC, H3C 1K3, CANADA

³Lady Davis Institute for Medical Research, SMBD-Jewish General Hospital, 5790 Ch de la
Côte-des-Neiges, Suite H-421, Montreal, QC, H3S 1Y9, CANADA

⁴Division of Orthopaedic Surgery, McGill University, 1650 Ave. Cedar, Montreal, QC, H3G
1A4, CANADA

Article publié dans Tissue Engineering, Novembre 2018

3.1 Mise en contexte

Le premier article, présenté dans ce chapitre, répond à l'objectif 1 de cette thèse qui est d'évaluer et sélectionner les meilleures formulations d'hydrogels de chitosane injectables et évaluer leur potentiel pour la régénération du NP. Cet article, publié dans le Journal Tissue Engineering en Novembre 2018, prend comme point de départ les formulations d'hydrogels de chitosane initialement développées dans le laboratoire de la professeure Lerouge (Assaad et al., 2015). Comme mentionné plus haut, la présence du SHC dans ces formulations permet d'obtenir des propriétés mécaniques plus importantes comparativement à la formulation classique qui ajoute uniquement du BGP au chitosane. Une étude préliminaire, non publiée, a permis d'évaluer l'effet de l'ajout du BGP ou du PB sur les performances mécaniques et la

cinétique de gélification de ces gels chitosane/SHC. L'article présente les tests et résultats ayant conduit à sélectionner la meilleure formulation des gels de chitosane pour cette application. En effet, cette formulation (SHC0.075M BGP0.1M) présente un profil de gélification appropriée, des propriétés mécaniques en compression proches du NP et un environnement adapté à la survie et l'activité de synthèse des cellules NP encapsulées. Les caractérisations cellulaires (tests de viabilité et production de GAG) ont été effectuées conjointement avec Dr Yasaman Alinejad qui était chercheure postdoctorale dans le laboratoire. Le reste des tests ont été effectués par A Adoungotchodo.

3.2 Abstract

Intervertebral disc (IVD) degeneration has been implicated as a major component of spine pathology. As the IVD degenerates, the tissue becomes dehydrated, fibrotic, fissured, acellular, and calcified. These changes can lead to disc bulging, herniation, Schmorl's Nodes, inflammation and hyperinnervation. Injectable hydrogels have received much attention in recent years as scaffold for seeding cells to replenish disc cellularity and restore disc properties and function. However, they generally present poor mechanical properties. In this study, we investigate several novel thermosensitive chitosan hydrogels for their ability to mimic the mechanical properties of the nucleus pulposus (NP) tissue while being injectable, able to entrap and maintain viability of NP cells, and retain matrix proteins. These new hydrogels were prepared by mixing chitosan (CH) with various combinations of three gelling agents: sodium hydrogen carbonate (SHC) and/or beta-glycerophosphate (BGP) and/or phosphate buffer (PB). The kinetics of gelation were studied at room and body temperature by rheology. Mechanical properties of the hydrogels were characterized under compression and torsion and compared with human NP tissue. NP cells were seeded in the hydrogel when still liquid at room temperature (RT), prior to its gelation at 37°C. Hydrogel cytocompatibility and functionality was assessed by measuring cell viability, metabolism, and proteoglycan synthesis. Although all the proposed hydrogels exhibited enhanced strength compared to CH-BGP thermosensitive hydrogels and suitable cytocompatibility and rheological properties, one formulation (containing 2% chitosan, 7.5mM of SHC and 0.1M of BGP) showed mechanical properties

similar to human NP tissue and stimulated better the synthesis and retention of proteoglycans from NP cells. Thus, this novel thermosensitive CH hydrogel shows promise for IVD regeneration.

Impact statement

A thermosensitive chitosan-based hydrogel was developed which mimics the mechanical properties of the human nucleus pulposus (NP) tissue and provides a suitable environment for seeded NP cells to live and produce glycosaminoglycans. This scaffold is injectable through 25G needle and rapidly gels *in vivo* at body temperature. It has the potential to restore mechanical properties and stimulate biological repair of degenerated intervertebral disc (IVD) and could therefore be used for the minimally-invasive treatment of IVD, which degeneration affects more than 1 person out of 5 in the world.

3.3 Introduction

Intervertebral discs (IVDs) are highly organized avascular structures with a complex poroelastic and anisotropic behavior (Vergroesen, van der Veen, Emanuel, van Dieën, & Smit, 2016). They consist of a peripheral collagen-rich annulus fibrosus (AF) surrounding the inner proteoglycan-rich central nucleus pulposus (NP) (Rannou et al., 2004). Two thin cartilaginous endplates confine the IVD and link it to the vertebral bodies (Freemont, 2009). Although AF and NP have very distinct biomechanical and biochemical properties (Antoniou et al., 2013), they function as a load-bearing unit, allowing for complex spinal motion (Roughley, 2004) and large cyclic loading (Costi, Freeman, & Elliott, 2011). The NP is thought to resist compressive forces through its high content in aggrecan (Antoniou et al., 2013) which induce a high swelling pressure that provides much of the compressive stiffness. The AF collagen network helps immobilize proteoglycans within the tissue and provides tensile and shear properties (Antoniou et al., 2013).

IVDs degeneration is one of the main causes of low back pain, the most common type of pain restricting daily activity of elderly and working population (Chan & Gantenbein-Ritter, 2012). As the IVD degenerates, NP loses water and changes from a gelatinous to a more fibrotic structure with the appearance of fissures in both NP and AF. Current first line treatment approaches are targeted to pain management (e.g. drugs, analgesics, physiotherapy). Patients with late stage disease and pain refractory to medication are treated surgically (i.e. disc excision and vertebral fusion) which offers short-term pain relief in many instances but alters spinal mechanics leading to subsequent adjacent-level disc degeneration and elevated early failure rates (Abramovitz & Neff, 1991; Snider et al., 1999). Therefore, regenerative strategies for biological repair of the degenerated IVD have received much attention in the recent years. One attractive approach is to supplement the disc with cells and/or bioactive factors within an injectable scaffold with suitable characteristics for the IVD tissue (Blanquer, Grijpma, & Poot, 2015). This scaffold can not only enhance the retention of the cells and the ECM components they produce but can also offer mechanical support during the regeneration process.

The ideal scaffold for the biological repair of the NP should (a) be injectable through small needles to avoid surgeries and large incision that may damage the AF, (b) present rapid solidification after injection to avoid leakage, (c) possess mechanical properties consistent with the native tissue, (d) provide easy loading and excellent viability and function of encapsulated cells, (e) be biocompatible and biodegradable (Chan & Gantenbein-Ritter, 2012) and (f) retain the glycosaminoglycans (GAGs) synthesized by the cells (M. Grant et al., 2016; M. P. Grant et al., 2016).

In this regard, several injectable biomaterials have been tested, including polyglycolic acid (Mizuno et al., 2004), collagen and collagen/hyaluronan scaffolds (Alini et al., 2003; Rong, Sugumaran, Silbert, & Spector, 2002), agarose (Gruber, Leslie, Ingram, Norton, & Hanley, 2004), alginate (Chou & Nicoll, 2009), and chitosan (CH) (Roughley et al., 2006). However, some of them do not retain GAGs (Grad, Zhou, Gogolewski, & Alini, 2003; Rong et al., 2002) and they usually lack the suitable mechanical properties. Among them CH-based scaffolds appear as promising candidates.

CH is an amino-polysaccharide obtained by the alkaline deacetylation of chitin, widely used for tissue engineering applications. Its structural similarities to GAGs and hydrophilic nature make it an attractive IVD scaffold (Di Martino, Sittinger, & Risbud, 2005; Mwale et al., 2005; Roughley et al., 2006). CH in association with a weak base, such as beta-glycerophosphate (BGP), can form thermosensitive injectable hydrogels (Chenite et al., 2000). These CH-BGP hydrogels have however limited cytocompatibility, low mechanical properties, and the BGP is substrate for alkaline phosphatase which is known to induce mineralization (Ishikawa & Wuthier, 1992). It was recently proven that these limitations can be overcome by either removal of BGP or its addition at lower concentrations in formulations with additional gelling agents (Assaad et al., 2015), namely sodium hydrogen carbonate (SHC) and phosphate buffer (PB). These new CH-based hydrogels are thermosensitive, injectable, cytocompatible and much stronger than conventional CH-BGP hydrogels. Moreover, their gelation rate, osmolality and mechanical strength can be adjusted according to their formulation (Ceccaldi et al., 2017).

The objective of the present study was to identify a suitable CH thermosensitive hydrogel scaffold for biologic repair of the NP.

Several formulations of CH physical hydrogels were selected, based on their mechanical properties, gelation kinetics and cytocompatibility (Ceccaldi et al., 2017) and were evaluated to identify the formulation that exhibits NP-like mechanical properties, good injectability through small diameter needle, excellent viability of encapsulated NP cells and the ability to stimulate and retain the produced GAGs.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Chitosan hydrogel preparation

CH (Shrimp shell chitosan, Kitomer, PSN 326-501, Premium Quality, Mw 250 kDa, DDA 94%, Marinard Biotech, Rivière-au-Renard, QC, Canada) was first purified, freeze-dried, ground and sieved as previously described (Assaad et al., 2015). The purified CH powder was

then solubilized in HCl (0.1 M) at 3.33% (w/v) and the obtained solution was sterilized by autoclaving (20 min, 121 °C) and stored at 4°C.

β-Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate ($C_3H_7Na_2O_6P \cdot 5H_2O$, hereafter BGP), sodium phosphate monobasic NaH_2PO_4 (SPM) and sodium phosphate dibasic Na_2HPO_4 (SPD) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Sodium hydrogen carbonate $NaHCO_3$ (sodium bicarbonate, hereafter SHC) was purchased from MP Biomedicals (Solon, OH, USA).

BGP, SHC and phosphate buffer (PB, pH = 8, prepared with NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 at a ratio of 0.06 w/w in milli-Q water) were combined at different concentrations (Table 1). For cell experiments, the solutions were sterilized by filtration through 0.22 μm filters.

Hydrogels were prepared by mixing the CH acidic solution with the gelling agent (GA) solution at 3:2 (v/v) ratio using syringes connected to each other through a female-to-female luer-lock syringe connector. For cell experiments and osmolality measurements, CH solution was first mixed with doubled concentrated GA solution at 3:1 (v/v) ratio, then the CH-GA mixture was mixed with the content of a third syringe containing complete culture medium with or without cells at 4:1 (v/v) ratio.

3.4.2 Selection of the chitosan hydrogel formulations

Three gel compositions (Table 3.1) were selected based on our previous work showing their appropriate characteristics such as mechanical properties, gelation kinetics and cytocompatibility (Assaad et al., 2015; Ceccaldi et al., 2017). In addition, BGP0.4 hydrogel was chosen as control because of its ideal gelation kinetic and injectability through small lumen (Gruber et al., 2004; Rong et al., 2002). CH was maintained at similar concentration in all selected hydrogel formulations (i.e. 2% w/v). Hydrogels are therefore coded according to their final molar concentrations of gelling agent in their formulations (e.g. SHC0.075BGP0.1 corresponds to a gel containing 2% (w/v) CH, 0.075M SHC and 0.1M BGP).

Table 3.1 Hydrogels composition and osmolality

Hydrogels	CH (w/v %)	GA component (M)		Osmolality (mOsmol/L)
		BGP	SHC	PB
BGP0.4	2	0.4		-
SHC0.075BGP0.1	2	0.1	0.075	
SHC0.075PB0.02	2		0.075	0.02
SHC0.075PB0.04	2		0.075	0.04
				313 ± 10

3.4.3 Hydrogels characterization

3.4.3.1 Rheological properties

Rheological properties at both room temperature (RT, 22°C) and body temperature (37 °C) were investigated using an Anton Paar instrument (Physica MCR 301, Germany) with coaxial cylinder geometry (CC10/T200) in the linear viscoelastic region (strain and frequency at 5% and 1Hz respectively). The complex viscosity (η^*), storage (G') and loss (G'') moduli were followed immediately after mixing the gel components (hydrogel mixture: 1.5 mL). Gelation time was defined as the time of crossover of G' and G''(Winter & Chambon, 1986).

3.4.3.2 Mechanical properties

Sample preparation

Directly after mixing, the hydrogel solutions were poured into cylindrical containers (12mm height, 14mm diameter) and incubated for 24h at 37°C prior to mechanical testing.

Human lumbar spines were obtained through the organ donation program of Hema-Québec. NP tissue (6.9 ± 0.4 mm height and 12 ± 3.1 mm diameter) from three lumbar discs (Thompson grade 3) were isolated from a donor (age 44) and used for the mechanical testing. All procedures were approved by our institutional review board.

Unconfined compression

Mechanical properties of the hydrogels were measured on the hydrogel samples (12mm height, 14mm diameter) by unconfined compression test with Bose Electroforce® 3200 equipped by a 225N load cell. Unconfined compression was performed at 100%/min until 50% deformation to determine stress versus strain curve and the secant modulus.

Relaxation tests

To compare mechanical properties of the hydrogels with those of human NP tissue, the equilibrium modulus in unconfined compression was determined using incremental stress relaxation test, as previously defined by Cloyd et al. (Cloyd et al., 2007). Compression was applied by increments of 5% strain at 5%/s followed by 5 min relaxation, until reaching 25% strain. The equilibrium stress at each relaxation step was plotted to trace the stress-strain curves, the slope of which defines as the equilibrium modulus. The samples (5mm height, 14mm diameter) were immersed in phosphate buffered saline (PBS) during the test to avoid dehydration.

Dynamic shear stress

Torsional shear test was performed with Anton Paar rheometer on hydrogel samples prepared in 6-well plates (1 mL), using a plate-plate geometry with a rough upper plate to avoid sliding. An initial 10% compression was applied to make contact between the sample and the upper plate(Iatridis et al., 1996). The complex modulus of hydrogel was measured in the linear viscoelastic region at a constant strain of 1% and different frequencies (1, 10 and 100 rad/s). Sample height was (1.4 ± 0.1 mm) for SHC0.075PB0.02, (1.8 ± 0.4 mm) for SHC0.075BGP0.1 and (2 ± 0.2 mm) for SHC0.075PB0.04.

3.4.3.3 Hydrogels cytocompatibility

Osmolality measurements

The osmolality (Advanced® Micro Osmometer 3300, Advanced Instruments Inc.) was measured on hydrogel filtrates, obtained by pressing the hydrogels with 0.45 µm filters after 24h gelation at 37°C.

Cell isolation and culturing

NP cells were recovered from the NP region of the bovine coccygeal IVDs of healthy 22-28-month-old steers by sequential digestion with 0.125% Pronase and 0.2mg/mL Collagenase (Gawri et al., 2012). After isolation, the cells were expanded and used for study within passage 4 using Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, low glucose: 1g/L) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S).

For all cell experiments, gels containing cells were prepared by mixing the hydrogel solution and cell suspension, deposited in 48 well plates (0.5 mL per well) through a syringe (without a needle) and the culture medium was added after 3 minutes of gelation (Hydrogel/media 1:1 ratio). Hydrogels without cells were used as blanks. Culture media was changed every 3 days.

NP cells viability and metabolic activity in the hydrogels

Cell viability in the hydrogels (10^6 cells per mL) was investigated by LIVE/DEAD assay. After 14 days of culture, hydrogels were washed once with PBS, incubated with the LIVE/DEAD Cell Imaging Kit (Life technologies) reagent for 30 min, and then observed by confocal microscopy (Zeiss LSM confocal laser-scanning microscope equipped with 488 nm and 543 nm laser lines). Ten z-stacked images were merged representing 100 µm thickness. The ratio of live cells (green) to total number of cells (green and red) was calculated using the cell counter function in ImageJ (National Institute of Health, USA) in four merged images per condition.

The metabolic activity of the encapsulated cells was evaluated using Alamar Blue (AB) assay (Biotium, 10%v/v) after 3, 7 and 14 days of culture. Moreover, the hydrogels containing cells

were incubated with chitosanase solution (Sigma-Aldrich, 0.3U/mL in PBS+0.1%BSA, pH=5) for 24h at 37°C and the DNA content was measured in the solution using the PicoGreen assay (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher, Waltham, MA) according to the manufacturer instructions.

GAG synthesis and retention

The total amount of GAG synthesized (released in the media and retained in the gel) by the encapsulated cells in the hydrogels (4×10^6 cells per mL of hydrogel) was quantified using a modified 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB) dye-binding assay (Sigma-Aldrich) following 7 days of culture. The culture media was changed every third day, and the GAG released into the media was analyzed as cumulative GAG release. GAG retention in the hydrogels was evaluated at 7 days. Acellular hydrogels were used as controls. Absorbance was read at 570 nm, immediately following the addition of DMMB. Chondroitin sulfate A sodium salt from bovine trachea (Sigma-Aldrich) was used to create the standard curve. Samples were diluted to fall within the middle of the linear range of the standard curve.

3.4.4 Injectability in human NP

Two human lumbar IVDs were isolated from lumbar spines of two donors (51 and 52 years old). One of the best hydrogel formulations in terms of rheological and mechanical properties as well as GAG retention (i.e. SHC0.075PB0.02, see results section) was colored during preparation with a drop of toluidine blue (Sigma-Aldrich) to facilitate visualization. The hydrogel solution (0.5 mL for donor 1 and 0.3 mL for donor 2) was injected through 25-gauge needle into the center of the IVDs through AF. After 30 min incubation at 37°C, discs were transected, macroscopically graded (Thompson et al., 1990) and examined for hydrogel repartition and/or possible extrusion within the IVD.

3.4.5 Statistical analysis

Results are reported as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism (version 7.0; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) program. Differences between the gels were assessed with one-way or two-way repeated analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey's multiple comparison test.

3.5 Results

3.5.1 Rheological properties

Rheological properties were studied at RT to evaluate the injectability of the hydrogel solution and at body temperature to determine their gelation kinetics once injected. All tested hydrogel formulations showed relatively low complex viscosity immediately after mixing at 22°C (Figure 3.1 A). SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02 were the most stable (viscosity still less than 5 Pa.s after 30 min at RT) suggesting easy injectability of the hydrogel solution through small needles and catheters during all this period. In contrast, the viscosity of SHC0.075PB0.04, and more especially BGP0.4, increased more rapidly, suggesting a possible maximum delay for injection after mixing. This difference between the gels was confirmed by the evolution of their storage moduli (G') at 22°C (Figure 3.1 B).

The G' values of all hydrogels at 37°C increased at a much higher rate than at RT (Figure 3.1), confirming their thermosensitive character. While all tested hydrogels exhibited rapid gelation time ($G' = G''$ at $t < 15s$), their gelation kinetics slightly differed depending on their formulation (The intersection of G' and G'' is not shown in the figure as the first datapoint is taken at 15s). The initial storage moduli of BGP0.4 and SHC0.075PB0.02 was relatively low (less than 100 Pa), but rapidly increased as a function of time, reaching 1200 kPa and 2850 kPa after 1 h respectively. Both SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.04 presented higher initial G' , and reached more than 4000 kPa after 1h at 37°C.

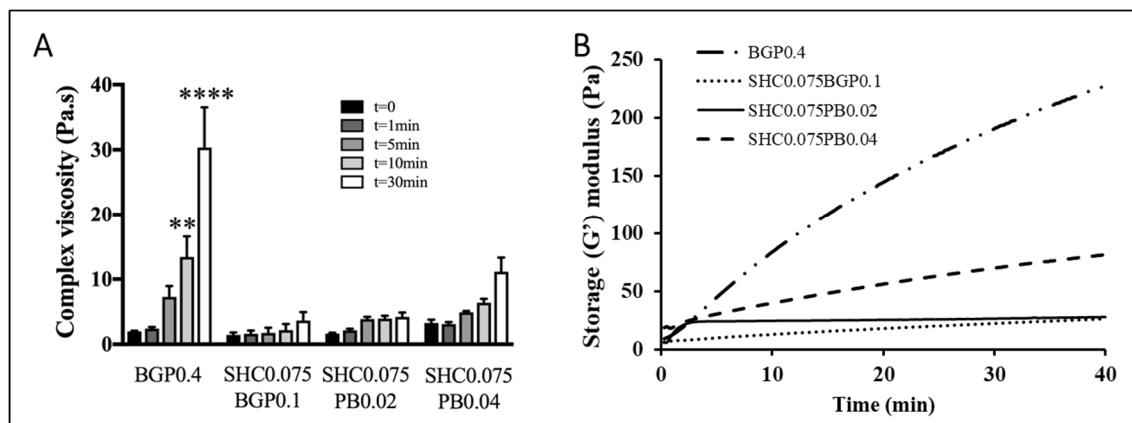


Figure 3.1 Novel hydrogel formulations are more stable at RT than BGP0.4 hydrogel. (A) Evolution of complex viscosity with time at 22°C immediately after mixing. Mean \pm SD ($n=3$). ** $p<0.01$, *** $p<0.0001$ compared to $t=15$ s for each formulation. (B) Evolution of storage modulus (G') with time at 22°C. Mean ($n=3$).

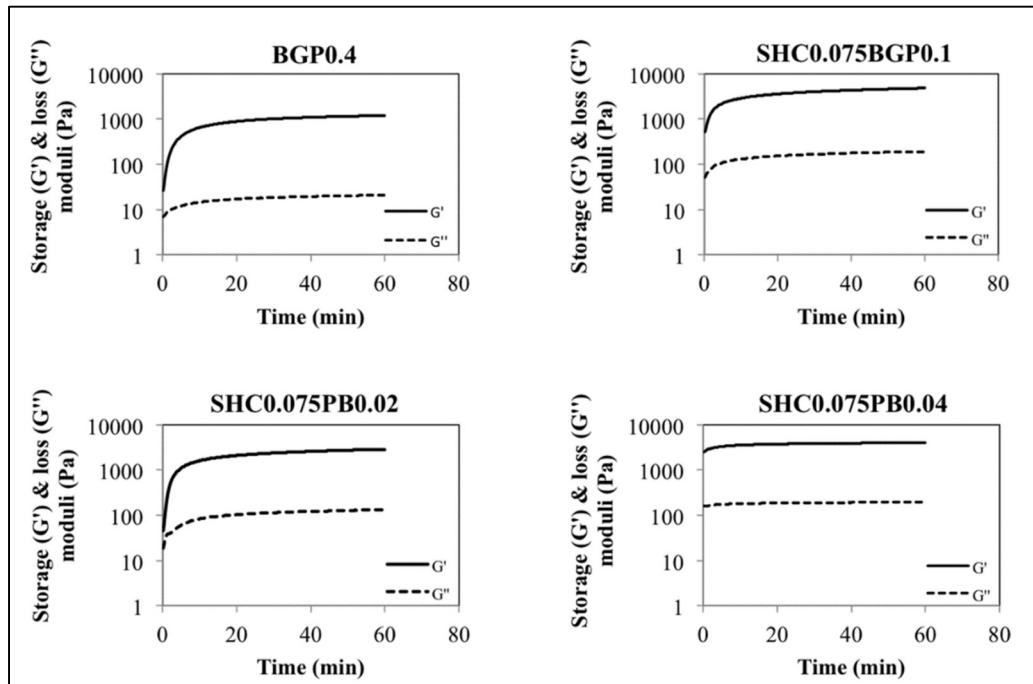


Figure 3.2 Chitosan hydrogels are thermosensitive with rapid kinetic of gelation. Evolution of storage (G') and loss (G'') moduli with time at 37 °C (strain 5%, frequency 1 Hz) immediately following preparation. Mean ($n=3-4$)

3.5.2 Mechanical properties of hydrogels using unconfined compression and dynamic shear

Unconfined compression test performed on fully formed hydrogels showed that the new hydrogel formulations presented strongly enhanced resistance to compression compared to BGP0.4 (A). Moreover, they withstood compressive forces up to 50% deformation without breakage, while BGP0.4 samples broke between 20% and 30% deformation.

Since the hydrogels presented a viscoelastic behavior, the secant modulus in compression was determined as the slope of a line connecting the point of zero strain to a point at a specified deformation (B). At 15% deformation (the maximum physiological deformation of the IVD (Joshi et al., 2006)), the secant moduli of SHC0.075BGP0.1, SHC0.075PB0.02 and SHC0.075PB0.04 hydrogels were respectively 5, 4 and 4 fold higher than that of BGP0.4 hydrogel. At 50% deformation, the secant moduli of SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02 (>120 kPa) were significantly higher ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$ respectively) compared to SHC0.075PB0.04 (≈ 95 kPa).

The incremental stress-relaxation unconfined compression test confirmed that SHC0.075BGP0.1 exhibited the highest mechanical properties, followed by SHC0.075PB0.02 (Figure 3.4). Both gels exhibited an equilibrium modulus similar to the human NP tissue (6.1 ± 1.7 kPa, in agreement with the values previously reported in the literature (5.2 ± 2.56 kPa (Cloyd et al., 2007))), while SHC0.075PB0.04 and BGP0.04 had significantly lower values ($p < 0.001$).

Finally, the complex shear moduli (G^*) of SHC0.075BGP0.1, SHC0.075PB0.02 and SHC0.075PB0.04 hydrogels were found to range from 7 to 14 kPa (Figure-A I- 1, Annexe 1). These values were similar to human NP (7-21 kPa (Iatridis et al., 1996) and over 14 to 25 fold higher than BGP0.4 ($P < 0.001$). No statistically significant differences were observed between the complex shear moduli measured at different angular velocities for each hydrogel.

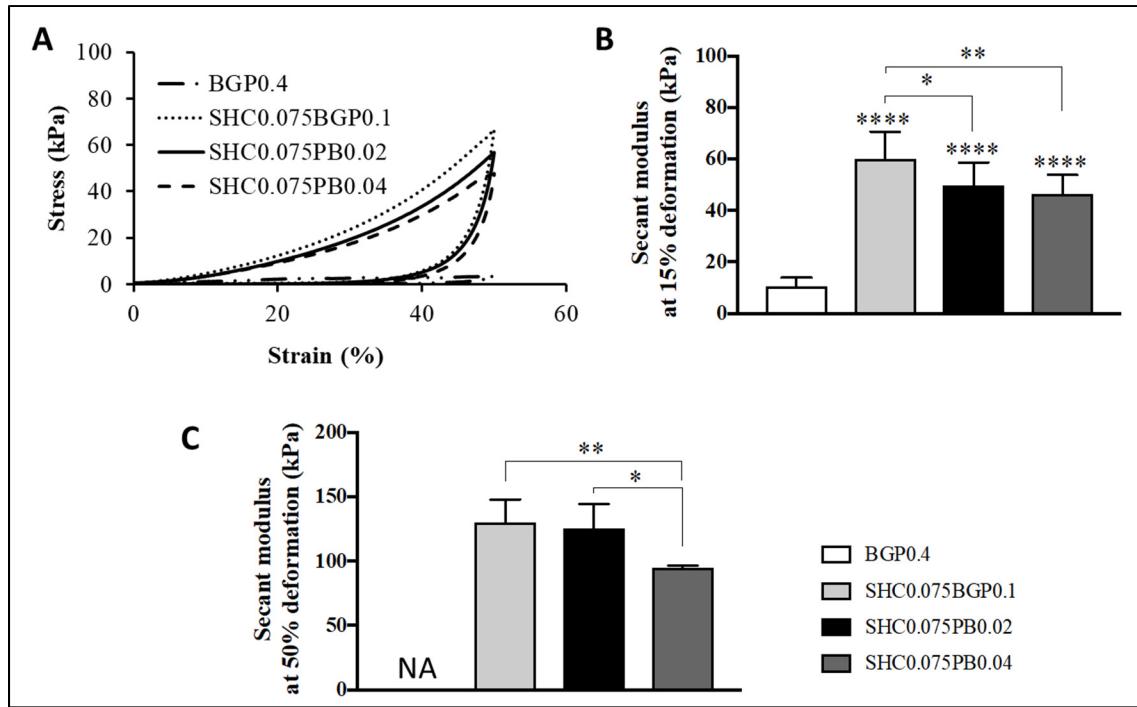


Figure 3.3 (A) Mean stress-strain curve of the hydrogels in unconfined compression test (after 24h at 37 °C) (n=3-5). (B) Secant modulus of the hydrogels in unconfined compression test at 15% deformation and (C) at 50% deformation (BGP0.4 hydrogels did not withstand 50% deformation and they are shown as not applicable (NA) in the graph). Mean \pm SD (n=3-5). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 compared to BGP0.4 and between hydrogels (using bars)

3.5.3 Osmolality

The BGP0.4 hydrogel was hypertonic (>800 mOsmol/L), while the osmolality of SHC0.075BGP0.1 was close to IVD osmolality (≈ 430 mOsmol/L) and other formulations were slightly hypotonic for IVD (<430 mOsmol/L) (Table 3.1) (van Dijk et al., 2011). Part of these values (estimated to 158 mOsmol/L) is due to the culture media added with the cells in the hydrogels (Ceccaldi et al., 2017).

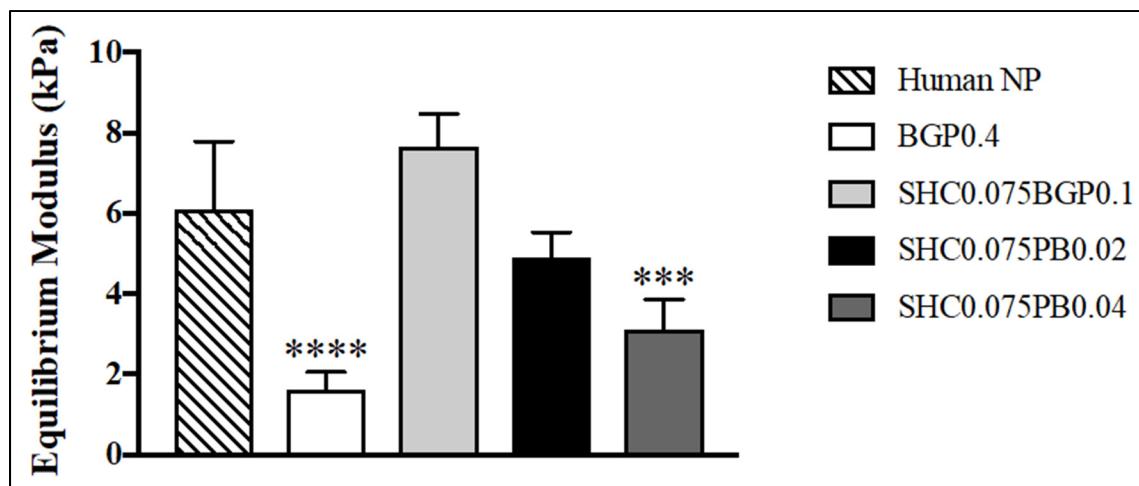


Figure 3.4 SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02 hydrogels show mechanical properties like human NP tissue. Equilibrium moduli of hydrogels measured using incremental stress relaxation during unconfined compression (Five steps of 5% strain at 5%/s, followed by 5min of relaxation in PBS). Mean \pm SD ($n = 5-6$). *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared to human NP tissue

3.5.4 Cytocompatibility of the hydrogels with disc cells

The cytocompatibility of the hydrogels was studied by monitoring the viability, metabolic activity and DNA content of NP cells encapsulated and maintained in culture for 14 days in the different hydrogel formulations. Figure 3.5A shows representative LIVE/DEAD images after 14 days and Figure 3.5B shows the percentage of viable cells. Very low viability (16%) was observed for cells encapsulated in BGP0.4 hydrogel after 14 days. Contrarily, NP cells demonstrated significantly higher levels of cell viability in the new hydrogel formulations. Cell survival was greater than 80% in SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02 hydrogels. Cells encapsulated in the new formulations also showed significantly higher metabolic activity (Figure 3.5C) and DNA content after 14 days of incubation (Figure 3.5D) compared to cells encapsulated in BGP0.4 hydrogel.

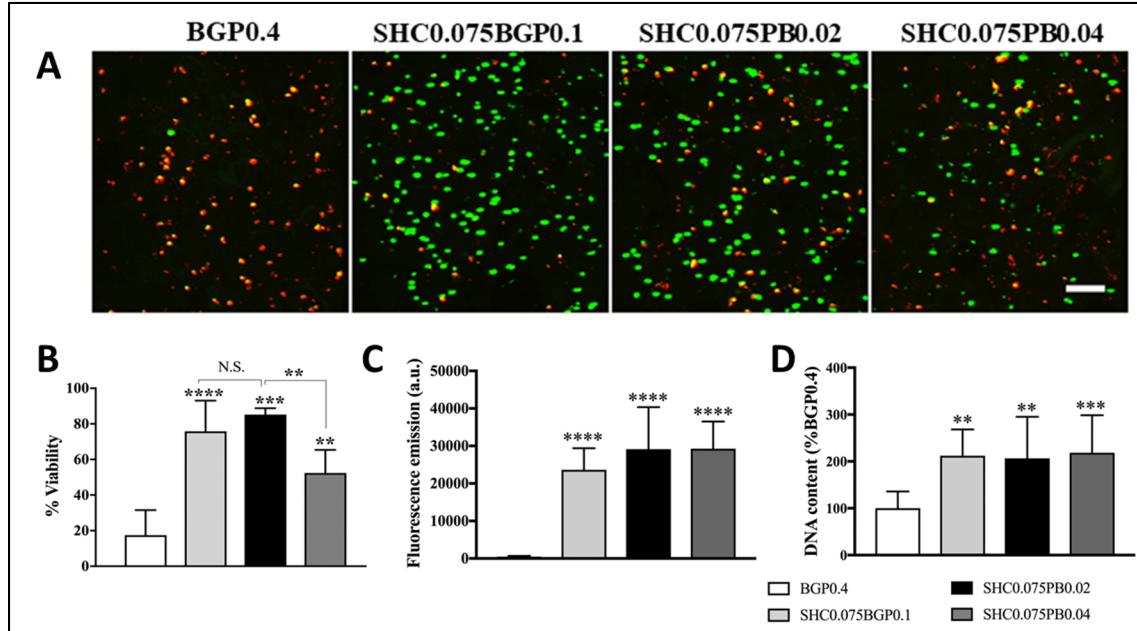


Figure 3.5 Cytocompatibility of the chitosan hydrogels. (A) LIVE/DEAD assay performed on cells encapsulated in hydrogels and cultured for 14 days. Scale bar represents 100 µm. (B) Percentage of viable cells according to cell counting on LIVE/DEAD images. Mean ± SD (n = 4). (C) Metabolic activity of the cells encapsulated in hydrogels after 14 days. Mean ± SD (n = 9). (D) DNA content in the cell-laden hydrogels after 14 days (expressed as percentage of DNA content in the BGP0.4 hydrogel). Mean ± SD (n = 9). ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 compared to BGP0.4 and between hydrogels (using bars)

In addition, Alamar blue assay performed after 3, 7 and 14 days showed that except BGP0.4 formulation which had a cytotoxic effect, no loss of metabolic activity was observed between day 3, 7 and 14 in the cells encapsulated in new the formulations indicating that they did not have any apparent cytotoxic effect on NP cells (Figure-A I- 2, Annexe 1).

3.5.5 GAG synthesis by the encapsulated NP cells

Proteoglycans are an integral component of the intervertebral disc. They are important in providing its unique mechanical properties and maintaining hydrostatic pressure. This is largely due to their glycosaminoglycan chains (Urban & Maroudas, 1980). To determine

whether our novel hydrogel preparations could generate a suitable scaffold for proteoglycan synthesis by NP cells, the constructs were cultured for 7 days and the content of extractable proteoglycans both released in the media and retained in the hydrogels was quantified by the DMMB assay (Figure 3.6). Cells encapsulated in SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02 produced significantly higher amounts of GAG compared to cells encapsulated in SHC0.075PB0.04 and BGP0.4 hydrogels (Figure 3.6 A). The total amount of GAG was higher in SHC0.075BGP0.1 hydrogel compared to SHC0.075PB0.02 (Figure 3.6B). Interestingly, both the SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02 hydrogels retained similar amounts of GAG (Figure 3.6B).

3.5.6 Hydrogels injectability in human NP

To confirm the feasibility of injecting the hydrogel into the NP through a ‘clinical size’ needle and observe how the hydrogel solution distributes into the clefts of degenerated human disks (Thomson grade 3), one of the best formulations, SHC0.075PB0.02 hydrogel was injected into two human cadaveric IVDs through a 25G syringe and incubated for 30 min at 37°C (Figure 3.7). Macroscopic observation of the disc shows that the hydrogel flowed into the nuclear clefts with no detectable leakage through the AF and out of the disc.

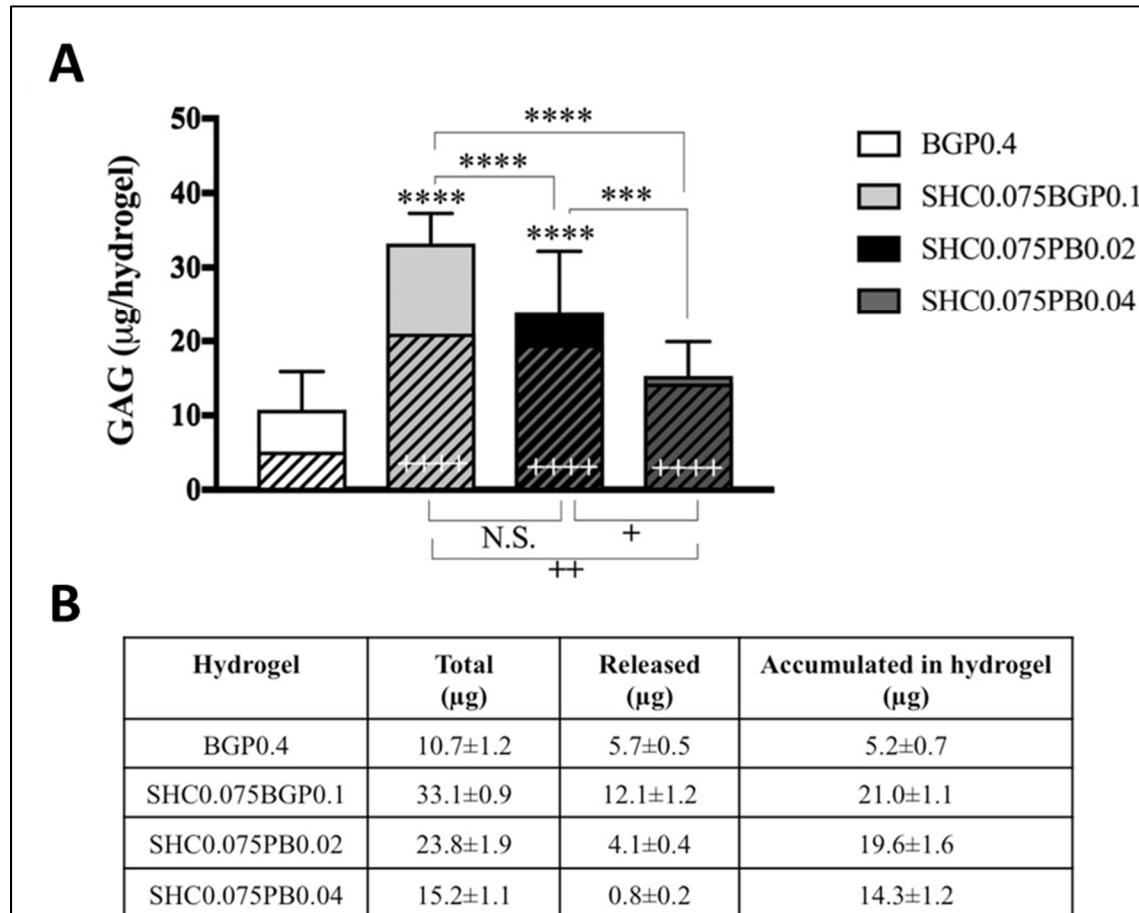


Figure 3.6 GAG production and retention in hydrogels. (A) Total GAG synthesized by encapsulated NP cells for 7 days (GAG accumulated in the hydrogels is presented as patterned area). Mean \pm SD ($n = 9$). (B) Table of Total GAG synthesized, accumulated in hydrogels and released in medium (measured in μg). Mean \pm SD ($n = 9$). For total GAG, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to BGP0.4 and between hydrogels (using bars). For accumulated GAG, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ and +++++ $p < 0.0001$ compared to BGP0.4 and between hydrogels (using bars)

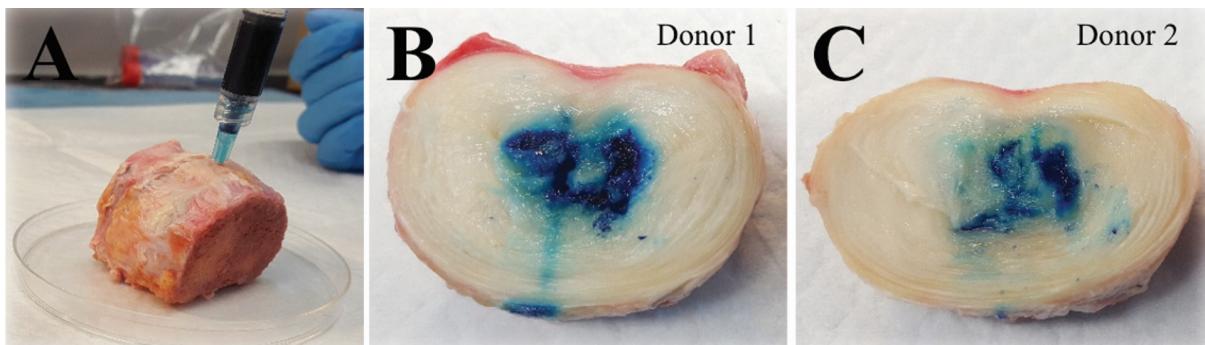


Figure 3.7 SCH0.075PB0.02 hydrogel was injected into human degenerated IVD. (A) Injection of the toluidine blue-stained hydrogel into the degenerated NP of human cadaveric degenerated IVD (grade 3) using a 25-gauge needle. (B&C) Macroscopic evaluation of an axially dissected disc following 30 minutes incubation at 37°C for donor 1 and 2. Note that the solution filled the nuclear clefts, and no evidence of hydrogel (blue) extrusion was observed

3.6 Discussion

Recent works have established the proof of concept of cell therapy for IVD repair in order to reestablish IVD homeostasis and reverse the degeneration process (Huang, Leung, Lu, & Luk, 2013; Sakai & Schol, 2017). Several clinical trials have been already performed or are in progress (Coric, Pettine, Sumich, & Boltes, 2013; Kumar et al., 2017; Noriega et al., 2017; Orozco et al., 2011; Tschugg et al., 2017; Yoshikawa, Ueda, Miyazaki, Koizumi, & Takakura, 2010), a few with injectable biomaterials as cell carrier (Kumar et al., 2017; Tschugg et al., 2017; Yoshikawa et al., 2010). Those carriers (i.e. atelocollagen, fibrin, hyaluronic acid and hyaluronic acid derivative gels) (Sakai & Schol, 2017), however, present very poor mechanical properties. As recently reviewed by Bowles and Setton (2017) (Bowles & Setton, 2017), promising results have been obtained with other biomaterials in vitro and in animal models (Hudson, Alimi, Grunert, Härtl, & Bonassar, 2013; Schutgens et al., 2015). Among them, several CH containing matrices have been reported (Cheng et al., 2010; Richardson et al., 2008; Roughley et al., 2006) which mostly present limited mechanical properties (Crevensten et al., 2004; Peroglio et al., 2013; Richardson et al., 2008; Vernengo et al., 2008) as well.

Therefore, the search for a suitable injectable scaffold which could not only increase cell retention but could also help initial restoration of disk height and mechanical properties is still ongoing. A few materials were capable of presenting both injectability and suitable mechanical strength. They are mostly multiple component networks, containing CH as well as other proteins, polymers and/or bioactive (Gullbrand et al., 2017; Smith et al., 2014; Zhu et al., 2017). In comparison, the injectable hydrogels presented in this study are simple, without protein, bioactive agent and/or chemical product, which may be an advantage in terms of FDA approval.

The three novel hydrogels tested in this work (SHC0.075BGP0.1, SHC0.075PB0.02, SHC0.075PB0.04) allowed injection in liquid form at RT, followed by rapid gelation at body temperature, reaching mechanical properties which were far above those of conventional CH-BGP thermogels (BGP0.4). Two of the new formulations (i.e. SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02) showed mechanical properties comparable to human NP tissue, both in compression and shear, suggesting their potential to restore the mechanical properties of the IVD, at least temporarily, before the injected cells create the new ECM.

Mimicking the mechanical properties of the native tissue is important, since a scaffold with lower mechanical properties cannot withstand IVD load, while a scaffold with higher mechanical properties may induce instability and increase the degeneration rate (Whatley & Wen, 2012).

These strong mechanical properties are one of the main advantages of these new scaffolds, as most of the physical injectable hydrogels, such as the previously studied CH-BGP hydrogels, are not mechanically strong enough for IVD regeneration requirements (Assaad et al., 2015; Roughley et al., 2006). Notably, the good mechanical properties of our hydrogels were obtained without any crosslinker. Previous work showed that this is due to the use of sodium hydrogen carbonate (SHC) at a precise concentration as gelling agent. CH-BGP physical hydrogel formation involves heat-induced protons transfer from CH to BGP. This results in CH chains neutralization, decreasing repulsive forces, and increasing attractive forces between

CH chains (Lavertu et al., 2008). In the case of SHC, the small size of the molecule and its decomposition in CO₂, may keep the chitosan chains closer during gelation, allowing formation of a stronger network. Its combination with either phosphate buffer or BGP enables to reach both good mechanical properties and rapid gelation kinetics (Assaad et al., 2015), making them advantageous compared to previously developed CH physical thermogels made with BGP alone, sodium hydrogen carbonate (Liu, Tang, Wang, & Guo, 2011) dibasic sodium phosphate (Li et al., 2011) or ammonium hydrogen phosphate (L. S. Nair, Starnes, Ko, & Laurencin, 2007). The absence of chemical initiators, crosslinkers, radiation and high temperature during gelation is favorable for cell survival and may facilitate clinical transfer, compared to many other hydrogel systems (Kumar et al., 2014; Priyadarshani, Li, & Yao, 2016; Thorpe et al., 2016; Xavier et al., 2015).

In the present study, we applied unconfined compression test to compare the mechanical properties of the hydrogels both among each other and with that of isolated human NP tissue. However, it should be noted that although unconfined compression test is widely applied in the literature to characterize the mechanical properties of the NP (Cloyd et al., 2007; Johannessen, Vresilovic, Seguritan, & Elliott, 2004; Smith et al., 2014), it can only partially represent the mechanical strength of the NP tissue. Ideally, both confined and unconfined compressions are required to fully characterize a potential replacement of the NP because despite the fact that the NP is restricted by the AF and endplate cartilage *in vivo*, compressive load on the NP can be transferred to the AF when it expands radially. Therefore, physiologically the NP is neither completely confined nor completely unconfined (Cloyd et al., 2007). In the future we plan to conduct ex-vivo tests with injected hydrogel which will be more effective and relevant to conclude about the capability of the hydrogel to restore the mechanical properties of the degenerated IVD.

Another advantage of our two best gels (i.e. SHC0.075BGP0.1 and SHC0.075PB0.02) is their relative stability in liquid form at RT, which facilitates mixing of cells and therapeutic agents and provides a suitable time frame for manipulation and injection of the hydrogel.

The novel CH thermogels also showed better cytocompatibility to the NP cells compared to conventional CH-BGP hydrogels, as shown by Live dead, AlamarBlue, DNA and GAG content. This improvement, previously observed with encapsulated fibroblastes(Ceccaldi et al., 2017), T lymphocytes (Monette et al., 2016) and mesenchymal stem cells (Ceccaldi et al., 2017), is likely due to the lower salt content of the new hydrogels. In the case of CH-BGP hydrogels, high concentrations of BGP are required to achieve rapid gelation kinetics, which results in cytotoxic effect on cells due to hyperosmolarity ($\geq 800\text{mOsm/L}$ for BGP0.4 gels) (Ahmadi & de Bruijn, 2008; Assaad et al., 2015). In the new formulations, the osmolality is close to physiological values (262 to 434 mOsm/L).

While knowing how the native cells would respond to the hydrogel is certainly a good first step, eventually the cytocompatibility of a more translationally relevant cell source (e.g. MSCs) will need to be evaluated prior to clinical translation.

The higher GAG production by NP cells observed in SHC0.075BGP0.1 (434mosm/L) compared to SHC0.075PB0.02 (262mosm/L) could be explained by its osmolality close to IVD's osmolality. Indeed, the intervertebral disc is hyperosmolar compared to other tissues (430-496 mOsm) (Ishihara, Warensjo, Roberts, & Urban, 1997; van Dijk et al., 2011). The expression level of aggrecan was shown to increase in hyperosmotic conditions (500 mOsm) in human NP and AF cells (Wuertz et al., 2007) as well as bovine NP cells (Neidlinger-Wilke et al., 2012). Spillekom et al. found that expression of brachyury, a phenotypic indicator of the NP, as well as aggrecan and GAG synthesis was at optimal levels when cells were cultured in medium adjusted to 400 mOsm/L(Spillekom et al., 2014). For this reason, even though SHC0.75PB0.02 also showed suitable kinetics of gelation, mechanical properties comparable to the human NP and, good cytocompatibility with the NP cells, SHC0.075GP0.1 showed in addition the ability to produce the highest GAG amount and therefore is the best of all tested hydrogel formulations for IVD repair.

The GAG production by encapsulated cells in three-dimensional hydrogels remains however considerably lower than in a mature NP (Smith et al., 2014). In a normal bovine NP, the

proteoglycan content increases with age from 3.1 to 4.7 mg/100 mg tissue (Alini et al., 2003). It was shown that 2×10^6 NP cells embedded in a collagen/hyaluronic scaffold cultured in DMEM supplemented by FCS and stimulated with TGF β 1/bFGF produce about 2% of the total GAG amount in mature NP after 20 days (Alini et al., 2003). Therefore, it would be very interesting to evaluate the effect of stimulating factors/agents that can augment proteoglycan synthesis by NP and stem cells on the GAG production of the encapsulated cells.

3.7 Conclusion

In summary, new CH hydrogels, synthesized by mixing CH solution with sodium hydrogen carbonate in combination with phosphate buffer and BGP, were evaluated for their potential for biological repair of the NP. These physical hydrogels, made of polysaccharide biopolymers without chemical products, are thermosensitive, injectable and biodegradable. One of the tested formulations (SHC0.075BGP0.1) exhibited mechanical properties similar to the human NP tissue, provided the most suitable environment to maintain NP cells alive and active and was able to induce the highest GAG amount produced by the encapsulated cells and retained in the hydrogel. This formulation is a particularly promising candidate towards the development of biological repair strategies for the treatment of degenerated IVD.

Acknowledgements

Authors would like to thank funding organizations CIHR and NSERC (Collaborative Health Research Program 508365), as well as Canada research chair program (SL). YA and AA also acknowledge scholarships by the Fonds de recherche du Quebec (FRQS and FRQNT, respectively) and NSERC.

Disclosure Statement

The authors have no competing financial interests to disclose.

CHAPITRE 4

INJECTABLE CHITOSAN HYDROGELS SUPPLEMENTED WITH GELATIN AND LINK N ENHANCE EXTRACELLULAR MATRIX DEPOSITION BY ENCAPSULATED CELLS IN A DEGENERATIVE INTERVERTEBRAL DISC ENVIRONMENT

Atma Adoungotchodo ^{1,2,3}, Laura Epure ³, Fackson Mwale ^{3,4}, Sophie Lerouge ^{1,2}

¹Laboratory of Endovascular Biomaterials (LBeV), Centre de recherche du CHUM (CRCHUM), 900 St Denis St, Montreal, QC, H2X 3H8, CANADA

²Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure (ETS), 1100 Notre-Dame West, Montreal, QC, H3C 1K3, CANADA

³Lady Davis Institute for Medical Research, SMBD-Jewish General Hospital, 5790 Ch de la Côte-des-Neiges, Suite H-421, Montreal, QC, H3S 1Y9, CANADA

⁴Division of Orthopaedic Surgery, McGill University, 1650 Ave. Cedar, Montreal, QC, H3G 1A4, CANADA

Article publié dans European Cells & Materials, Mai 2021

4.1 Mise en contexte

L'article 1 a permis de sélectionner la formulation SHC0.075BGP0.1 comme la meilleure formulation pour la régénération du NP. Cette formulation remplit en effet les spécifications requises pour l'application c'est-à-dire : elle est injectable, elle présente des propriétés mécaniques similaires à celles du NP humain et elle confère aux cellules un environnement approprié à leur survie et sécrétion de matrice extracellulaire. En revanche, la quantité de GAG produite par les cellules NP encapsulées reste sous optimale comparativement aux valeurs observées *in vivo*. L'article 2 qui répond à l'objectif 2 de la thèse a pour but de trouver des stratégies pour augmenter la production de GAG par les cellules sans négativement affecter les propriétés mécaniques du gel. Deux avenues ont été explorées. En premier l'ajout de la gélatine à la formulation du gel. La gélatine, comme mentionnée dans la section 1.3.3.2, est connue pour avoir de très bonnes propriétés en termes de viabilité et d'adhésion cellulaires. Nous

posons l'hypothèse que l'ajout de cette molécule à l'hydrogel pourrait améliorer l'activité de synthèse des cellules encapsulées. La seconde stratégie a été d'ajouter le peptide Link N dans le milieu de culture des cellules. Comme mentionné plus haut, de nombreux travaux ont montré que ce peptide améliore la synthèse de GAG par les cellules du disque. Tous les tests de cet article ont été réalisés par A. Adoungotchodo et l'article a été publié dans la revue eCells & Materials journal en Mai 2021.

4.2 Abstract

Injectable therapies for intervertebral disc (IVD) repair is gaining much interest. We have recently developed a chitosan (CH) based injectable scaffold which has similar mechanical properties to human nucleus pulposus (NP) and provides a suitable environment for encapsulated NP cell survival and proteoglycan production. The hypothesis of this study was that the biological response of the encapsulated cells can be further increased by adding gelatin and Link N (LN, a naturally occurring peptide present in cartilage and IVD extracellular matrix), known to increase cell adhesion and proteoglycan production, respectively. The effect of gelatin on the mechanical properties of CH hydrogel was evaluated through rheological and compressive mechanical tests. Production of proteoglycan (assessed as glycosaminoglycan, GAG) by encapsulated NP cells was determined in the presence or absence of gelatin in normal or degenerative medium supplemented with LN. Normal and degenerative media replicate the healthy and degenerative disc environment, respectively. Gelatin slightly reduced the gelation rate of CH hydrogel but improved its final mechanical properties in compression. LN had minimal effect in normal media but induced significantly higher GAG production in degenerative media ($p < 0.001$, 4.7-fold superior to the control), reaching similar results as TGF- β (used as a positive control). GAG production was further increased in CH gelatin hydrogel, confirming an additive effect of LN and gelatin in a degenerative environment. The results support the concept that CH/gelatin hydrogels supplemented with LN can help restore the function of the NP during the early stages of IVD degeneration.

4.3 Introduction

Intervertebral disc degeneration (IVDD) is a leading cause of chronic back pain and loss of function. It is a multifactorial disease, characterized by the loss of extracellular matrix, specifically proteoglycan and collagen, tissue dehydration, fissure development and loss of disc height, inflammation, endplate sclerosis, cell death and hyperinnervation of nociceptive nerve fibers (Freemont, 2009). There are no therapeutics for IVDD and the current first line treatment modalities are focused on pain management, but none target the underlying causes. Inadequately controlled pain is the major reason for invasive procedures such as discectomy, laminectomy, disc replacement and spinal fusion (Wu, Kim, & Jang, 2020). Over 1.6 million instrumented surgical procedures are performed annually in the United States (iData Research, 2018). Yet, despite the frequency of the most common procedure, spinal fusion, clinical success varies from 50 - 70%. Pain relief is often short-lived and the altered biomechanics can lead to adjacent disc degeneration (Lee, Shirahama, Cho, & Tan, 2015; Nguyen, Randolph, Talmage, Succop, & Travis, 2011). Consequently, there is an unmet need for better and efficacious approaches that deal directly with the pathological state of the degenerated IVD.

One of the most important changes caused by IVDD is the loss of proteoglycans residing in the nucleus pulposus (NP). These proteoglycans are hydrophilic glycoproteins responsible for attracting and retaining water molecules inside the disc (Shapiro & Risbud, 2013). Their high-water concentration confers important compressive capacity to NP tissue which is able to absorb and adequately distribute compressive loads to the spine (Gilchrist, Darling, Chen, & Setton, 2011; O'Halloran & Pandit, 2007). Due to age and not well-known causes, NP proteoglycan content decreases gradually (Raj, 2008) leading to a reduction in the osmotic pressure of the discal matrix and an inadequate load redistribution leading to IVDD. Since it is difficult for the native NP to achieve self-renewal, any treatment which can enhance proteoglycan content in the NP may help to slow or stop the degeneration process and eventually regenerate the biomechanical properties of the disc (Iatridis, Nicoll, Michalek, Walter, & Gupta, 2013).

Injectable cell therapy targeting the central gelatinous NP is a promising approach for biological repair. Various studies were intended to design injectable scaffolds containing cells and eventually a bioactive agent to optimize their function (Frith et al., 2013; Smith et al., 2014; Thorpe et al., 2016). An ideal injectable scaffold should provide a suitable environment for encapsulated cells to survive and produce extracellular matrix (ECM) components while exhibiting similar mechanical properties to native tissue. We have recently developed a scaffold which fulfills these requirements. Our scaffold is an injectable thermoresponsive chitosan (CH)-based hydrogel that rapidly gels at body temperature. Thanks to the use of a combination of sodium hydrogen carbonate (SHC) and β -glycerophosphate (BGP) (Assaad et al., 2015), it presents similar mechanical properties as human NP and provides a suitable environment for the survival of encapsulated NP cells. However, our previous results have shown a suboptimal synthesis of proteoglycans (Alinejad et al., 2019).

A strategy to increase PG synthesis by encapsulated cells is the addition of cell adhesive components in the hydrogel. Gelatin, obtained by denaturation of collagen (Gentile et al., 2016), is well known to increase cell proliferation (Xia et al., 2004) and adhesion through binding motifs recognized by cell integrin receptors(Huang, Onyeri, Siewe, Moshfeghian, & Madihally, 2005; Zheng et al., 2018). Gilchrist et al, have shown that human disc cells attach to the collagen present in ECM through alpha integrin receptors (Gilchrist, Chen, Richardson, Loeser, & Setton, 2007). They have also demonstrated the impact of mechanical properties and ECM ligands on NP cell activity. Indeed, in this study it was hypothesized that the presence of appropriate ECM ligands such as collagen and laminin in a suitable mechanical environment can lead to higher proteoglycan production (Gilchrist et al., 2011). Based on those studies, and the fact that gelatin is non-immunogenic (Jaipan, Nguyen, & Narayan, 2017), we postulated that adding gelatin in the CH hydrogel will improve cell attachment to the scaffold, increase cell survival and lead to enhanced proteoglycan synthesis.

In addition to cell adhesive components, growth factors such as transforming growth factor (TGF- β), growth differentiation factor 5 (GDF-5), bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), insulin-like growth factor-1(IGF), osteogenic protein 1 (OP-1 or BMP-7) have been shown to

increase the production of proteoglycans by discs cells (Alini et al., 2003; Bach et al., 2017; Kim et al., 2003; Smith et al., 2014). However, these bioactive agents may not be suitable for clinical applications, due to their risk of tumogenicity (Brahmkhatri et al., 2015) and prohibitive cost. We therefore propose Link N (LN) peptide as an alternative.

LN is a naturally occurring 16 amino acid peptide representing the N-terminal region of link protein, an endogenous glycoprotein that binds hyaluronic acid and aggrecan in both the IVD and articular cartilage, and stabilizes the resulting proteoglycan aggregates (Melching & Roughley, 1985). Our previous studies have demonstrated that LN meets the criteria for an ideal treatment for IVDD as it acts as an anabolic agent, reversing structural degradation of the IVD due to the disease and blocs the inflammatory and pain-producing pathways (Antoniou et al., 2012; Bach et al., 2017; Gawri et al., 2012; Gawri et al., 2014; Mwale et al., 2011; Noorwali et al., 2018).

The objective of this study was to design an injectable therapy for IVD repair by associating the CH thermosensitive hydrogel with gelatin and LN as bioactive agents and investigate the effect of gelatin or/and LN addition on proteoglycan synthesis by encapsulated NP cells in CH hydrogels *in vitro*. First, rheological, and compressive mechanical properties were conducted to assess the potential effect of gelatin on mechanical and gelation properties. Secondly, gelatin or/and LN effects on encapsulated NP cells survival and proteoglycan synthesis were evaluated in a condition replicating a healthy or degenerative disc environment.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Source of chitosan, gelatin, and Link N

CH powder (Kitomer, PSN 32850, Mw 250 kDa, 95% deacetylated) was supplied by Marinard Biotech (Rivière-au-Renard, Canada), while gelatin powder from porcine skin was obtained from Sigma-Aldrich (gelatin type A, G1890, Oakville, Canada). Link N (DHLSDNYTLDHDRAIH) was synthesized with a purity > 98% by CanPeptide (Pointe Claire, QC, Canada).

4.4.2 Preparation of CH and CH/gelatin hydrogels

CH powder with or without gelatin was solubilized in 0.1 M of hydrochloric acid. Obtained CH or CH/gelatin solutions were autoclaved (121°C for 20 min) and stored at 4°C until use. A gelling agent solution consisting of BGP (β -glycerophosphate disodium salt hydrate, G9422, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and SHC (sodium hydrogen carbonate, EMD Millipore Corporation, Burlington, USA) was prepared with deionized water and filtered through 0.22 μ m membrane. Hydrogel solutions were prepared by mixing CH or CH/gelatin solutions with the gelling agent solution at a volume ratio of 3:2 using two syringes and a Luer Lock syringe connector as previously described (Assaad *et al.*, 2015). Tested formulations contained constant chitosan 2% w/v and gelling agent concentrations (75mM SHC + 100mM BGP), with various concentrations of gelatin (0, 1, 1.5 and 2% w/v).

4.4.3 Hydrogels gelation kinetic

Two different rheological tests were performed on a Physica MCR 301 rheometer (Anton Paar, Ostfildern, Germany) equipped with coaxial cylinder geometry (CC10/T200). First, the stability at room temperature and the thermoresponsivity of the hydrogels were evaluated. Just after preparation, 1.5 ml of hydrogel solution was poured in the rheometer. Storage (G') and loss (G'') moduli were monitored for 20 min at room temperature (22°C), followed by 20 min at body temperature (37°C). For the second test, the hydrogel solution was placed in the sample holder beforehand heated to 37°C and gelation kinetic at body temperature was assessed by monitoring the evolution of the storage and loss moduli for one hour. Both oscillatory tests were performed in the linear viscoelastic range (LVE), at 1 Hz frequency and 1% strain (for stability test) or 5% strain (for gelation kinetic test).

4.4.4 Unconfined compression

CH and CH/gelatin hydrogels solutions were prepared, poured into cylinders (14 mm internal diameter) and left to gel at 37°C for 24 h. The hydrogel discs obtained (approximatively 9 mm height) were used to measure unconfined compression properties. Compression tests were

performed on each sample with a Mach-1TM Micromechanical System (Biomomentum, Laval, Canada) equipped with a 250 N load cell. A deformation rate of 100%/min (approximatively 0.15 mm/s) was applied until 70% deformation to obtain stress-strain curves and to assess the secant modulus. The 15% secant modulus was calculated as the slope of a line connecting the point of zero strain to the 15% deformation point.

4.4.5 Isolation of NP cells

Bovine NP cells were isolated from fresh coccygeal IVDs obtained from 2-4 years old steers within 24 h of slaughter as previously described (Alinejad et al., 2019; Gawri et al., 2012). Briefly, IVDs were dissected from the adjacent vertebral bodies and washed in PBS containing 100 µg/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin, 50 µg/mL gentamicin, and 0.25 µg/mL fungizone (Wisent Bioproducts, Montreal, QC, Canada). The NP regions were ~~where~~ separated from the IVDs and cut into approximately 2 mm pieces. NP cells were enzymatically isolated from the tissue pieces by sequential digestion with 0.125% Pronase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 30 min followed by 16 h incubation of Collagenase I 50U/mL (Cat. C-9891, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 37°C. The obtained solution was filtered with a 75 µm nylon cell strainer and the supernatant was centrifuged at 1000 ×g for 10 min. The cellular pellet was washed twice in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) prior to seeding.

For all experiments, NP cells were expanded until passage 3 in DMEM (1 g/L glucose, 319-010-CL, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin, with culture medium changed every 3 days.

4.4.6 Encapsulation of cells in CH and CH/gelatin gels

Bovine NP cells were encapsulated in the hydrogels as follows: 0.6 mL of CH or CH/gelatin solutions were first mixed with 0.2 mL gelling agent solution with two syringes connected with a Luer Lock. Obtained mixture was then mixed with 0.2 mL cell suspension (10^6 cells/mL as final cell density for cell viability or 10^7 cells/mL for GAG production assessment). Final composition thus remained 2% w/v chitosan, 100mM BGP and 75mM SHC with 0, 1, 1.5 or

2% w/v gelatin, as in mechanical characterization tests. This solution was then placed in a 48-wells plate (200 µL/well) and incubated for 3 min at 37°C. Culture media (500 µL/well) was further added in each well and the plate was maintained in the incubator at 37°C, 5% CO₂.

Two different culture media were tested: a normal medium (PrimeGrowthTM disc cells medium, 319-515-CL, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Canada) and a degenerative medium (PrimeGrowthTM degenerative disc cells medium, 319-513-CL, Wisent Inc.), supplemented with 1 ng/mL IL-1β (Interleukin-1 beta, Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, USA; cat# SRP3083). Each medium was supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin. The normal medium is characterized by a physiological pH and high osmolarity and was developed to ensure optimal disc cells growth and functionality during *in vitro* culture while the degenerative medium was designed to simulate the biochemical composition of a degenerative disc (lower pH and osmolarity, higher mineral content, presence of inflammatory cytokine such as IL-1β).

4.4.7 Link N diffusion in the gel

Before testing the effect of LN on cells, we first confirmed LN diffusion in the CH and CH/gelatin hydrogels when added to the media. To that purpose, 50 µg of fluorescent LN (LN labelled with 5-Carboxyfluorescein, CP08245F, CanPeptide Inc., Pointe Claire, Canada) in 500 µL of complete culture medium was incubated with 200 µL of hydrogel in 48-wells plate. After 1, 3, and 24 hours incubation at 37°C, LN concentration remaining in the medium was determined using a spectrophotometer in fluorescence mode (EX485/EM520) and a calibration curve. The amount of LN diffused in the gel was then determined by subtracting the remaining LN in the medium from the initial LN quantity. The LN concentration in the gel was then compared to the concentration expected in the case of equilibrium (71 µg/mL), calculated by dividing the quantity of LN added in each well (50 µg) by total volume in the well (hydrogel + medium (700 mL)).

4.4.8 Effect of gelatin and Link N on encapsulated NP cells

To study the effect of gelatin on NP cells viability and GAG production, NP cells encapsulated either in CH or CH/gelatin hydrogels were cultured in normal medium for 14 days. To evaluate the effect of LN and select the optimal concentration, NP cells encapsulated in CH hydrogel were cultured in normal or degenerative medium supplemented with various concentrations (0, 10, 25, 100 µg/mL) of human LN for 14 days. Then, possible additive benefit of gelatin and LN was studied by encapsulating NP cells in the CH or CH/1% gelatin hydrogels and cultured in either normal or degenerative medium supplemented with 100 µg/mL LN. TGF-β (Transforming Growth Factor β1, PHG9204, Invitrogen, Carlsbad USA) at 50 ng/mL was used as a positive control.

Cells viability was assessed by Live/dead assay at day 1 and 14 on NP hydrogel scaffolds. Briefly, the hydrogel was washed with PBS and incubated with serum-free media supplemented with 2 µM ethidium homodimer-3 and 1 µM calcein AM (LIVE/DEAD Cell imaging kit reagents, R37601, Life Technologies, Carlsbad, USA) for 45 min at 37°C. The hydrogel was again washed with PBS and immediately observed by an inverted fluorescent microscope (Leica DM IRB, Feasterville, USA). Cell viability was calculated as the ratio of live cells (green) to total cells number (green and red). The *Analyse particles* function in ImageJ (National Institute of Health, USA) was used for the counting.

GAG production (released in the media and retained in the construct) was analyzed using the Dimethyl Methylene Blue (DMMB) assay (Garnjanagoonchorn *et al.*, 2007).

DNA content in the gel was measured at 14 days using PicoGreen assay (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher, Waltham, USA) following manufacturer's protocol.

4.4.9 Statistical analysis

The results are presented as mean and standard deviation. Statistical analysis was performed by using 1-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test for studies comparing separately the effect of gelatin or LN concentrations on GAG production. Two-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparison test was used to analyze simultaneously the effect of gelatin, LN, TGF- β , and medium type on GAG production. A $p < 0.05$ was considered significant. Each experiment was replicated a minimum three times.

4.5 Results

4.5.1 Effect of gelatin on rheological and unconfined compression properties of CH hydrogels

We recently demonstrated that our CH hydrogel presented suitable mechanical properties for NP repair, i.e. quick gelation, and compressive properties close to human NP tissue (Alinejad *et al.*, 2019). However, GAG production by encapsulated NP cells was suboptimal compared to *in vivo* levels. In this study, gelatin, a biodegradable and biocompatible protein, was added to the hydrogel, because of its cell adhesion properties which may increase ECM deposition by NP cells. Gelatin was also chosen because of its nonantigenic characteristics when compared to collagen (Liang *et al.*, 2004) and its physicochemical performances that can be modulated appropriately. However, adding gelatin to CH hydrogels can affect their mechanical properties which are already suitable for the application. Therefore, the first step of this project consisted in evaluating the effect of various concentrations of gelatin (1–2 w/v%) on the scaffold gelation kinetics and compressive properties (Figure 4.1).

All hydrogel formulations showed relatively stable storage modulus (G') at room temperature and sudden increase of G' when the temperature was increased up to 37°C, confirming that they are all thermosensitive (Figure 4.1a). However, gelatin had a dose-dependent impact on the rheological properties. Initial G' (and viscosity, data not shown) at 22°C increased slightly with gelatin concentration. Moreover, the increase of G' with temperature was slower for

CH/gelatin hydrogels, suggesting that gelatin addition slows down the gelation at 37°C. However, the 1% gelatin formulation presented comparable gelation profile with the CH hydrogel.

These results were confirmed by the time sweep experiments performed directly at 37°C (Figure 4.1b), which better represent the hydrogel behavior when injected in the disc at body temperature. CH/gelatin hydrogels presented a rapid increase of G' with time at 37°C. The addition of gelatin decreased the rate in a dose-dependent way, but gelation was rapid for all tested formulations (crossover of storage modulus G' and loss modulus, G" in less than 15 seconds).

Interestingly, unconfined compressive properties (Figure 4.1c and 1d) increased significantly in the presence of gelatin. The secant modulus, calculated at 15% deformation (corresponding to physiological loading conditions (Johannessen *et al.*, 2006) was significantly higher for the formulations with gelatin compared to control (Figure 4.1d) ($p < 0.05$). In addition, failure stress was significantly higher in the presence of gelatin compared to control ($p < 0.0001$, $p = 0.01$ and $p = 0.02$ for 1, 1.5 and 2% w/v gelatin, respectively), with the highest value obtained for 1% w/v gelatin formulation (stress at failure = 99 ± 6 kPa for control vs 142 ± 12 kPa for 1% w/v gelatin). Hydrogel breakage occurred at similar deformation rate for all formulations ($64 \pm 2\%$).

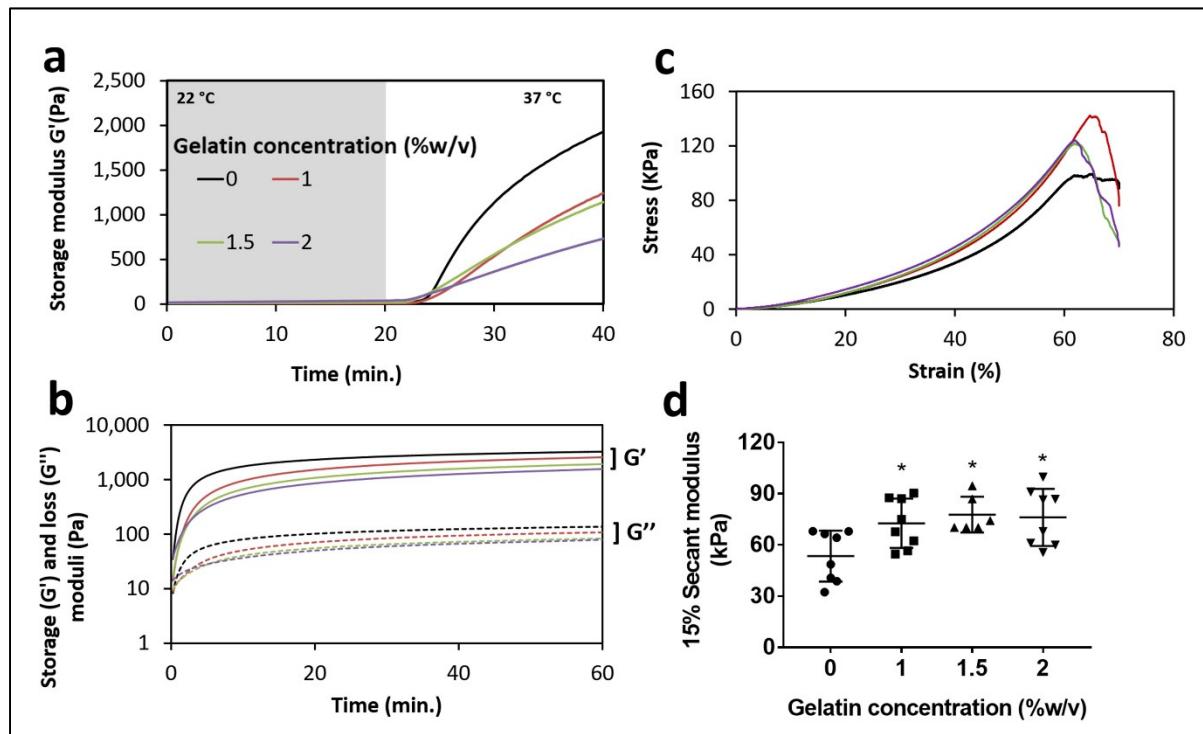


Figure 4.1 Effect of gelatin concentration on rheological and unconfined compression properties of chitosan hydrogels. (a, b) Time sweep experiments of chitosan hydrogel solutions as a function of gelatin concentration (0, 1, 1.5, and 2% w/v) (a) Evolution of storage modulus with time at 22° C (to confirm stability at room temperature) followed by temperature increase to 37° C (strain 1%, frequency 1 Hz, data shown as mean, n=3) (b) Evolution of storage modulus with time at 37° C (strain 5%, frequency 1 Hz, data shown as mean, n = 3) (c, d) Unconfined compression : (c) Mean stress versus strain curves (up to 70% of deformation at 100%/min, n = 4); (d) Secant modulus of hydrogels at 15% deformation (Mean \pm SD n = 8, *p< 0.05 compared to control). Tests were performed on cylindrical samples (14 mm diameter, 9 mm height) left to gel for 24 hours at 37° C.

4.5.2 Effect of gelatin on the viability and GAG production of cells encapsulated in CH hydrogels

As shown in Figure 4.2, a high cell viability (between 89 – 92% viability) was observed for all tested formulations at day 1, indicating no substantial cell death during NP encapsulation. Cell viability remained unchanged until day 14, indicating that gelatin addition did not affect NP cell survival. In fact, the DNA content was also similar for all formulations after 14 days in

culture (data not shown). However, NP cells by the end of 14 days presented a spindle like shape in CH gelatin hydrogels suggesting a better cell-matrix adhesion when compared to CH hydrogel (Figure 4.2).

After 14 days in normal medium, total GAG synthesis (in the construct and released in the media) was assessed. The results revealed that the NP cells encapsulated in CH/gelatin hydrogels produced significantly higher GAG content after 14 days when compared to the control ($p < 0.0001$) (Figure 4.3a). This increase was observed for all gelatin concentrations. GAG production per DNA (Figure 4.3b) was also significantly higher ($p < 0.01$) in the presence of gelatin suggesting that gelatin increases cell activity.

Based on these results (NP cells respond similarly for all gelatin concentrations, but greater mechanical and rheological properties for gelatin 1%), 1% w/v gelatin was found to be the most appropriate concentration to supplement the chitosan hydrogel. Thus, we selected this formulation (CH/1% gelatin) for all following experiments.

4.5.3 Diffusion of LN within the hydrogel

To evaluate the effect of LN on encapsulated cells, it is important to first verify that LN would diffuse through the CH hydrogel. To test this, CH hydrogel with or without gelatin was incubated in culture medium supplemented with fluorescent LN (with N terminal 5-FAM). The rapid diffusion of the fluorescent peptide in the gel confirmed that LN rapidly reaches the encapsulated cells (Figure 4.4). After 24 h, LN concentration was close to equilibrium ($71\mu\text{g/mL}$) in both CH ($67 \pm 5 \mu\text{g/ml}$) and CH/ 1% gelatin ($67 \pm 7 \mu\text{g/ml}$) hydrogels.

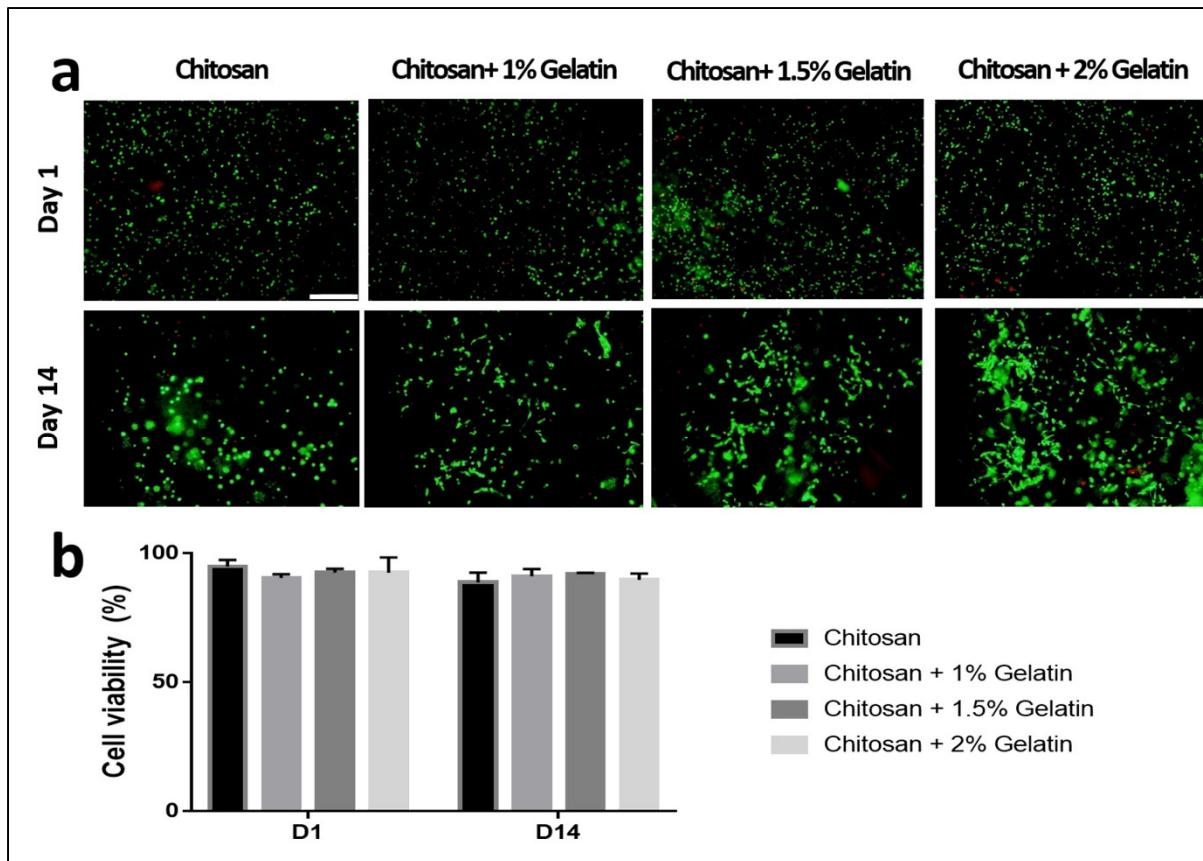


Figure 4.2 Viability of nucleus pulposus (NP) cells encapsulated in CH and CH/gelatin hydrogels using a) Live/Dead assay performed after 1 or 14 days in culture. No significant differences were observed between conditions in terms of cell viability. Scale bar represents 300 μ m (green for living cells and red for dead cells) b) Percentage of viable cells according to cell counting on LIVE/DEAD \circledR images. Data are shown as Mean \pm SD, $n = 3$

4.5.4 Effect of LN on GAG production by cells encapsulated in CH hydrogel

To evaluate the potential of LN to promote proteoglycan content in hydrogels, NP cells encapsulated in CH hydrogel (without gelatin) were incubated in either normal medium or degenerative medium mimicking healthy or degenerated disc environments, respectively. NP cells encapsulated in CH hydrogel were exposed to 10, 25 and 100 μ g/mL LN or media alone for 14 days. GAG production and GAG/DNA ratio were assessed as a function of LN concentration and culture medium (Figure 4.5).

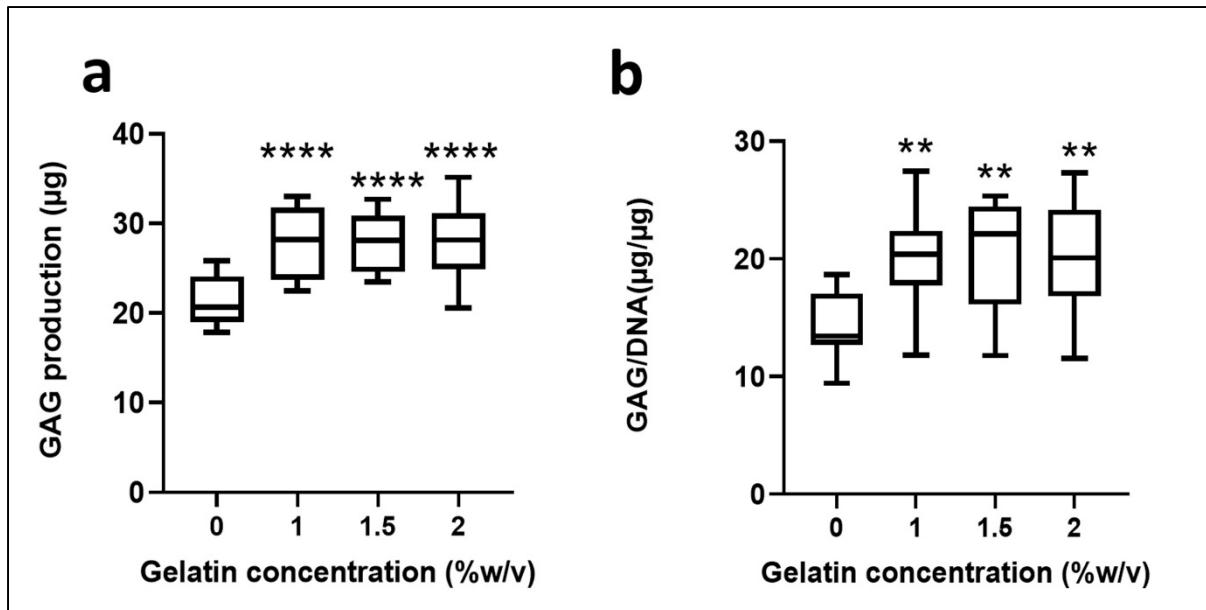


Figure 4.3 Glycosaminoglycan (GAG) production by encapsulated nucleus pulposus (NP) cells in CH or in CH/gelatin hydrogels. NP cells were encapsulated in CH or in CH/gelatin (1, 1.5 and 2% w/v) hydrogels and cultured in normal medium for 14 days. (a) Total GAG production (in construct and released in the media) was analyzed by the DMMB assay (b) GAG production was normalized to DNA quantity (measured by PicoGreen assay (n = 12-14, **** p < 0.0001, ** p < 0.01)

As expected, in the degenerative media, GAG synthesis by NP cells was 3-fold decreased compared with NP cells incubation in normal medium ($p = 0.003$). This significant difference could be explained by the lower cell viability observed in the degenerative (56±8%) compared to normal medium (81±3%) (data not shown).

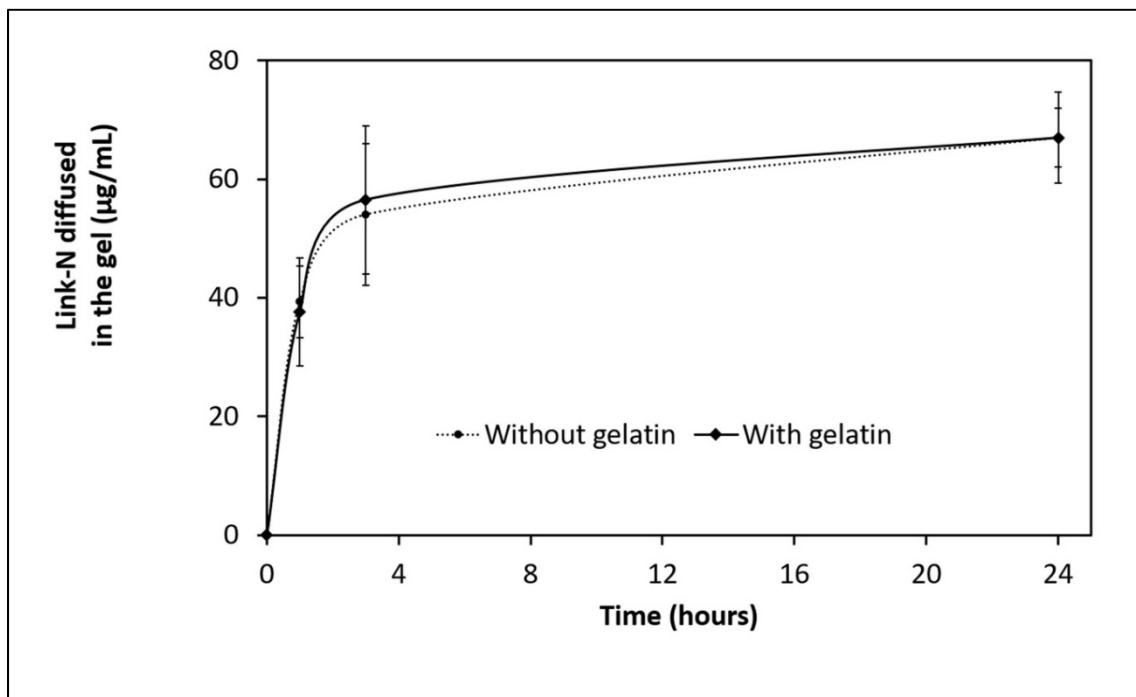


Figure 4.4 Link-N (LN) diffusion within the CH and CH/1% gelatin hydrogels. 5-FAM conjugated LN was placed on top of the chitosan hydrogels with or without gelatin. The media was retrieved and analyzed spectrophotometrically to quantify the remaining LN in the media at each time point. This amount was subtracted from the initial LN content to assess the amount of LN that diffused in the gel. LN concentration in the gel after 1, 3 and 24 H are shown as Mean \pm SD, $n = 4-6$)

LN did not elicit any significant effect on GAG content when constructs were cultured in normal medium (Figure 4.5 a, c). However, when the cells were cultured in degenerative medium, the results were strikingly different, showing a statistically significant dose-dependent increase in proteoglycan content in response to LN supplementation, with maximal response at the highest dose of LN ($p < 0.0001$) (Figure 4.5 b, d). Thus, when the degenerative medium was supplemented with 25 μ g/mL and 100 μ g/mL LN, GAG synthesis was increased by 3.1-fold and 4.7-fold, respectively, compared to the degenerative medium alone (Figure 4.5b), reaching similar or higher levels of GAG synthesis compared to normal conditions. DNA content was similar for all LN concentrations (data not shown), suggesting that the

increase in GAG production is due to increased cell activity, not cell proliferation. Indeed, similar trends were obtained when GAG production was normalized to DNA content (3.3-fold and 4.6-fold superior to the control) (Figure 4.5d). However, no difference was observed at low dose of LN (10 µg/mL).

4.5.5 Additive effect of LN and gelatin on GAG production in normal and degenerative environment

To determine the additive benefit of gelatin and LN on GAG production, NP cells encapsulated in CH or CH/1% gelatin hydrogels were cultured for 14 days in the normal or degenerative medium supplemented with 100 µg/mL LN or 50 ng/mL TGF-β1 (Figure 4.6). TGF-β was used as a positive control due to its confirmed role in promoting GAG production (Smith *et al.*, 2014).

Notwithstanding the media used, TGF-β significantly increased GAG synthesis in NP cells ($p < 0.0001$) compared to the control (Figure 4.6a and b). GAG production in the presence of TGF-β was significantly greater in CH/1% gelatin compared to CH hydrogel, in both normal (Figure 4.6a, $p = 0.02$) and degenerative medium (Figure 4.6b, $p < 0.0001$), suggesting a potential additive effect of TGF-β and gelatin on NP cell activity. However, GAG synthesis in the presence of TGF-β was reduced in the degenerative compared to normal medium by over 41% and 30% in the CH and CH/1% gelatin hydrogels, respectively.

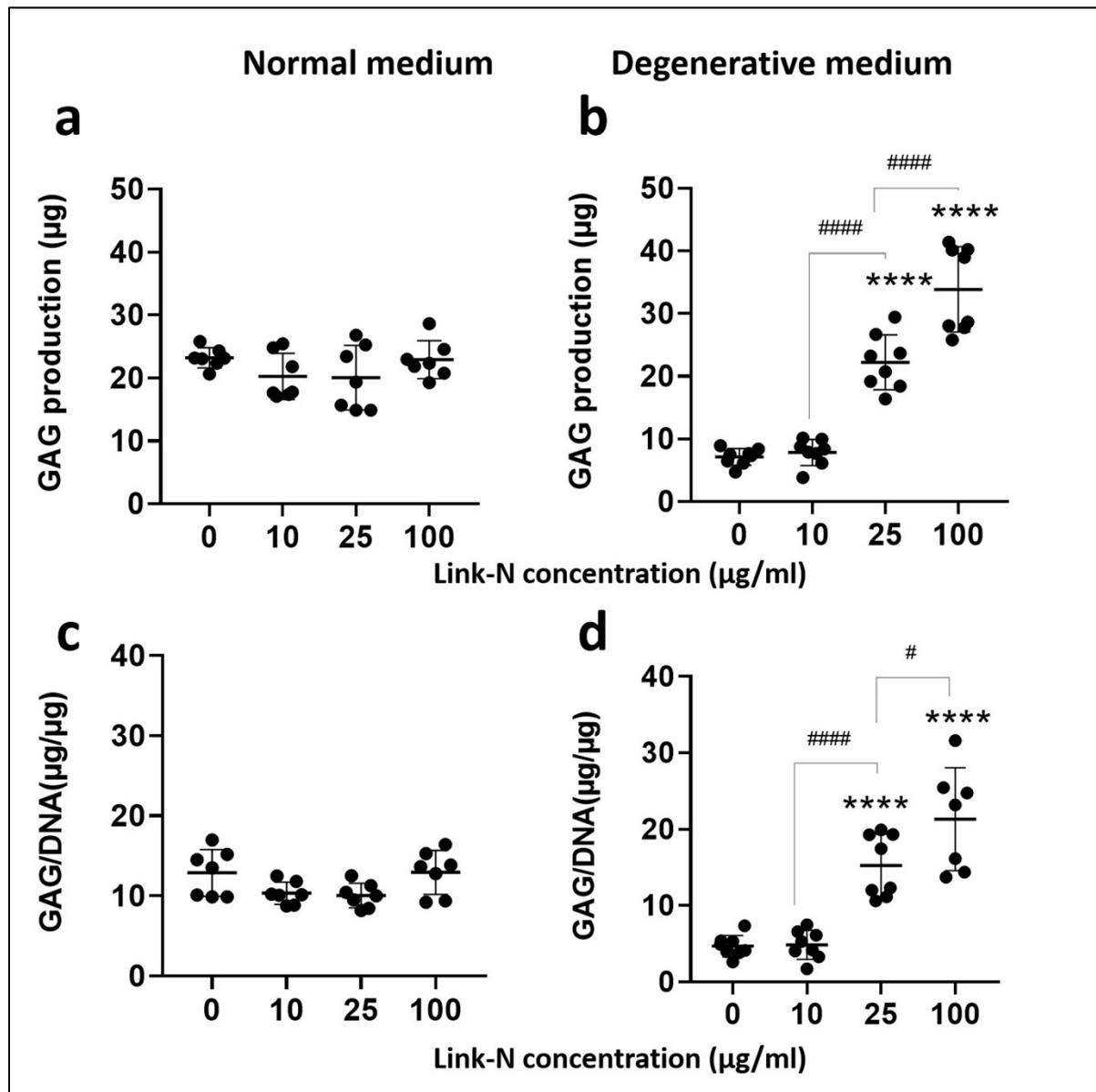


Figure 4.5 Proteoglycan (GAG) production by encapsulated NP cells treated with LN.

Bovine NP cells were encapsulated in CH hydrogels and cultured in either normal or degenerative media in the presence of LN (10, 25 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or media without peptide supplementation for 14 days. Glycosaminoglycan (GAG) content was taken as a measurement of proteoglycan. Total GAG production per construct in (a) normal and (b) degenerative media. GAG production per 1 μg DNA in (c) normal and (d) degenerative media. Data are expressed as Mean \pm SD, Anova One Way followed by Turkey Test, n = 7; *** p<0.0001 (compared to control)

GAG concentrations in constructs cultured in normal media supplemented with LN were similar to that in controls (Figure 4.6a). In contrast, a significant increase was observed when incubated in degenerative medium, ($p < 0.0001$ for LN without gelatin; $p = 0.003$ for LN with gelatin; Figure 4.6b). Since there was no difference in DNA content between conditions after 14 days (data not shown), a similar trend was observed for GAG production per DNA (Figure 4.6c. and d). Interestingly, in degenerative medium, GAG production in the presence of LN was higher than in normal medium ($p = 0.0007$ for CH and CH/1% gelatin hydrogels) and reached similar levels to that in the presence of TGF- β . Gelatin addition to the hydrogel tended to further increase GAG production. This difference was significant in the degenerative ($p = 0.03$) but not in normal medium. The observations were similar when analysing GAG production per DNA (GAG/DNA) in the normal (Figure 4.6c) and degenerative medium (Figure 4.6d). This indicates that in early disc degeneration, LN alone has the potential to restore proteoglycan content and that an additional benefit is achieved by including gelatin in the construct.

4.5.6 Cell viability of encapsulated NP cells supplemented with either LN or TGF- β .

To verify that supplementation of 50 ng/mL TGF- β or 100 μ g/mL LN in normal or degenerative medium was not detrimental to the cells, cell viability was assessed. Cell viability was maintained at $> 80\%$ when NP cells were encapsulated in CH or CH/1% gelatin hydrogels supplemented with either LN or TGF- β in normal conditions after 14 days. In contrast, at day 14 (Figure 4.7) the incubation in degenerative medium induces relatively high cellular death ($52 \pm 11\%$ viability) in CH hydrogel indicating that the medium used in these studies mimics the degenerative disc environment where cell death is commonly observed (Trout *et al.*, 1982). However, CH/1% gelatin hydrogel incubated in the degenerative media supplemented with LN ($76 \pm 11\%$) showed higher cell viability compared to TGF- β and control ($50 \pm 12\%$), suggesting that LN may have a protective effect against cell death in the presence of gelatin.

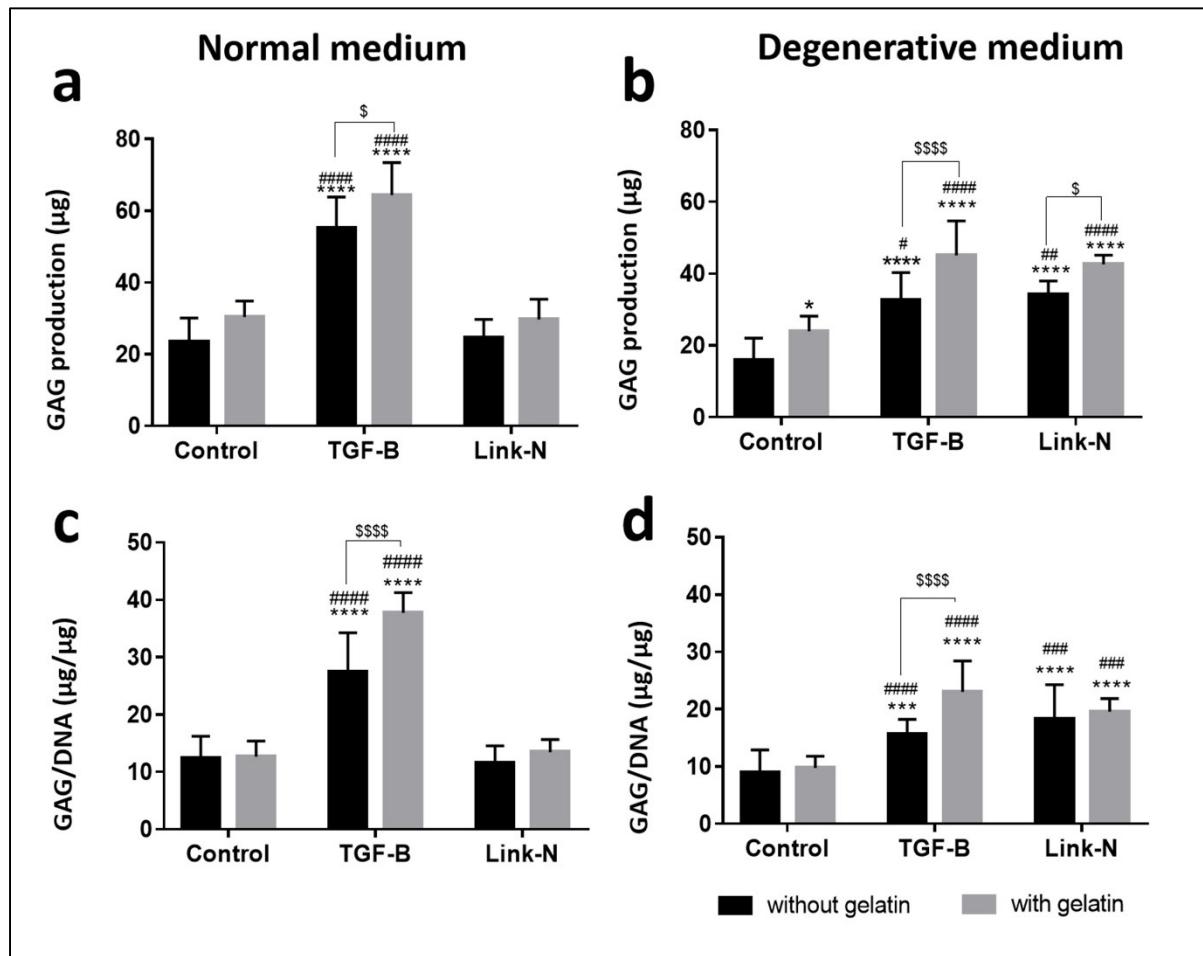


Figure 4.6 Proteoglycan production by encapsulated NP treated with either LN or TGF- β . NP cells were seeded in CH or CH/1%gelatin hydrogel and cultured in (a, c) normal or (b, d) degenerative media in the presence of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LN, 50 ng/mL TGF- β or media without peptide supplementation for 14 days. Glycosaminoglycan (GAG) content was taken as a measurement of proteoglycan. Data shown as Mean \pm SD, Two- Way ANOVA followed by Turkey post-hoc comparison, (* $p<0.05$, *** $p<0.0001$ compared to control without gelatin, ##### $p<0.001$, ##### $p<0.0001$ compared to control with gelatin, \$ $p<0.05$, \$\$\$ $p<0.001$, \$\$\$\$ $p<0.0001$, n = 8-16)

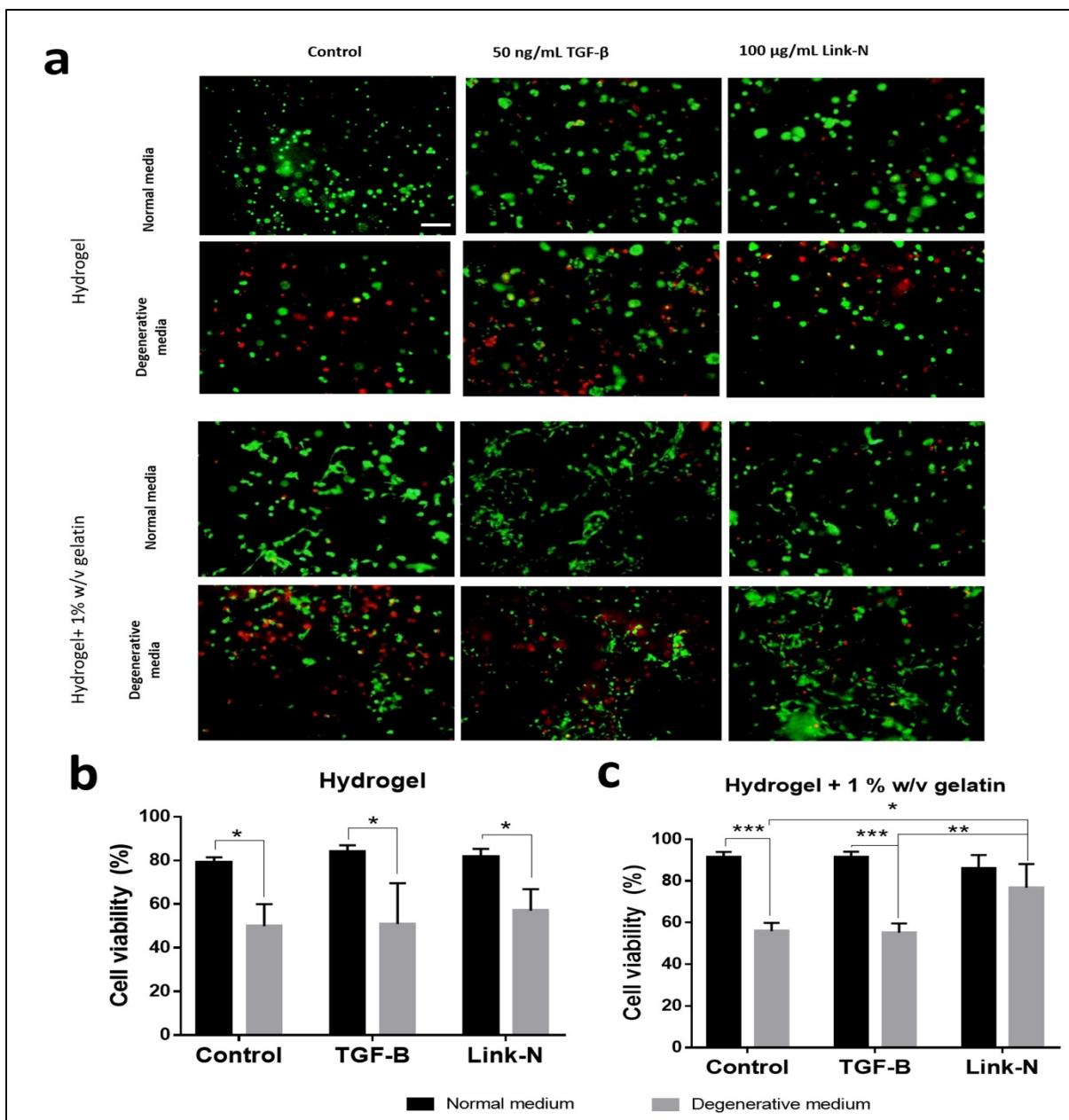


Figure 4.7 Effect of LN or TGF- β supplementation on bovine nucleus pulposus (NP) cell viability encapsulated in CH or CH/1% gelatin scaffolds. (a) Live/dead \circledcirc assay performed at 14 days on NP cells encapsulated in hydrogel with or without gelatin in normal and degenerative media alone (control), supplemented with 50 ng/mL TGF- β or 100 μ g/mL LN. Scale bar represents 200 μ m. Green for living cells and red for dead cells. (b, c) Percentage of viable cells according to cell counting on LIVE/DEAD \circledcirc images. Data are shown as Mean \pm SD, n = 3, Two-Way ANOVA followed by Turkey post-hoc comparison. * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001.

4.6 Discussion

To our knowledge, this is the first study evaluating an injectable therapy for IVD repair in conditions simulating the degenerative disc microenvironment. We have previously developed a thermosensitive injectable CH hydrogel which has shown adequate mechanical properties and cell survival for IVD repair (Alinejad et al., 2019), but a suboptimal synthesis of proteoglycans. Since the loss of proteoglycans is one of the most notable changes with IVD degeneration, the primary goal of this investigation was to evaluate the potential of LN and gelatin to increase proteoglycan production by encapsulated NP cells in CH hydrogels, in a degenerative IVD microenvironment.

Our present data indicate that CH hydrogel supplemented with 1% w/v gelatin increased significantly GAG production by NP cells while showing adequate gelation profile and a significant increase of compressive mechanical properties. Gelatin has been already used by several researchers in combination with chitosan to form 2D membranes or 3D scaffolds for tissue engineering. It has been used either to form polyelectrolytes with (Huang et al., 2005; Mao, Zhao, Yin, & Yao, 2003; Ng, Yeong, & Naing, 2016) or to reinforce CH-BGP (chitosan- β -glycerophosphate) gels with limited mechanical properties (Cheng et al., 2010). Cheng et al., have shown that 1% w/v gelatin decreased the gelation time of CH-BGP gels from more than 10 min to less than 1min and increased their storage modulus from <10Pa to ~500Pa after 10 min at 37°C. In our study, CH is mixed with SHC and BGP as gelling agents, to increase drastically the mechanical properties and shorten gelation time, while allowing for better cytocompatibility due to the lower BGP content (Ceccaldi et al., 2017). As expected, our results confirmed a much greater G' values at 10min (1700 and 1300 Pa respectively for CH and CH/ 1% gelatin) and a shorter gelation time for all CH gelatin formulations (< 15 sec at 37°C). Our results are also in agreement with Cheng et al. in regard to increased mechanical properties in the presence of gelatin. However, gelatin tends to reduce the gelation rate (as shown by slower increase of G' and lower G' after 1h at 37°C). This result may be explained by gelatin charge. Indeed, at physiological pH, both gelatin type A and CH molecules are positively charged (Van Vlierberghe, Graulus, Keshari Samal, Van Nieuwenhove, & Dubrule,

2014). The mechanism of CH thermogelation is related to CH chain's neutralization by BGP and SHC, followed by proton transfer when increasing the temperature (Lavertu et al., 2008). The presence of positively charged gelatin in the solution may have reduced the degree of neutralization of chitosan chains and delay the proton transfer to the base. This may explain why after 1h, the viscoelastic properties of CH-gelatin hydrogels are lower than those of CH hydrogel.

However, the compressive properties of CH/gelatin hydrogels after 24h gelation are improved, especially the mechanical strength which increased from 99 to 142 kPa (with 1% gelatin). It is known that gelatin chains are able to form hydrogen bonds when mixed together (M. Cheng et al., 2003; Ng et al., 2016). Thus, gelatin addition may have transformed CH hydrogel from a simple physical hydrogel network to a reinforced interpenetrating polymer network (IPN) (Karak, 2012). In our previous work, we had shown that CH hydrogel presented compressive properties very similar to human NP (Alinejad et al., 2019). In the present study, we showed that the rigidity in compression was slightly increased by the addition of gelatin, but remained in the same range, which allows us to conclude that the CH/gelatin hydrogels also present compressive properties close to human NP.

In addition to this mechanical benefit, gelatin has induced higher GAG production by encapsulated NP cells. As shown in our Live/dead images, CH hydrogel supplemented with gelatin has increased NP cells adhesion to the scaffold. Indeed, gelatin provides amino acid sequences similar to collagen to help facilitate cell adhesion (Huang et al., 2005; Zheng et al., 2018) which can stimulate GAG production. Besides, through some structural changes in the hydrogel, gelatin may have increased the amount of nutrient and oxygen inside the gel which can be also translated into an increase in GAG production (Xia et al., 2004).

TGF- β is among the several growth factors, including GDF-5, OP-1, that have been previously investigated and showed promising results in restoring the proteoglycan content and stimulating new disc matrix formation (Masuda & An, 2004). Although these strategies have reached animal studies and been approached in the clinic (<https://clinicaltrials.gov/>

NCT01182337), some may have delayed or reduced pain, but none have achieved biological repair of a diseased IVD (Hodgkinson et al., 2019). TGF- β is one of the most potent growth factors for promoting matrix production. Activation of TGF- β plays a critical role in mechanical signaling transduction to regulate IVD cell function and homeostasis (Bian et al., 2017). TGF- β can increase GAG production through increase of mRNA expression and inhibition of proteases that induce ECM protein degradation (Bassols & Massague, 1988; Roberts, McCune, & Sporn, 1992). However, TGF- β was found not suitable for clinical applications due to its tumorigenicity (Brahmkhatri et al., 2015) and high cost. It was used in our study only as a positive control.

Compared to other growth factors, known for their involvement in osteogenesis and unwanted and uncontrolled side effects (Lebrun, 2012), LN action is specific to chondrogenic tissues such as IVD and cartilage (Mwale et al., 2014). Our previous studies have demonstrated that LN acts as an anabolic agent in the IVD, increasing the expression and synthesis of structural matrix proteins and reversing the structural deterioration (Antoniou et al., 2012; Bach et al., 2017; Gawri et al., 2012; Mwale et al., 2011). It inhibits both, the expression of pro-inflammatory cytokines and pain-associated factors (Noorwali et al., 2018) and the co-administration of MSCs and LN synergistically enhances the repair of IVDs in a disc degeneration model (Mwale et al., 2014). Therefore, LN meets the criteria for an ideal treatment for IVDD, reversing structural degradation of the IVD and blocking the inflammatory and pain-producing pathways.

Most of the studies testing the effect of bioactive agents on NP cells were conducted either in chemically controlled medium (Smith et al., 2014) or medium simulating normal culture conditions (Gawri et al., 2012; Masuda, 2008; Miyamoto et al., 2006). In fact, IVD represents a very harsh microenvironment even in its healthy state (low oxygen levels, high osmolarity, nutritional deficits and high mechanical loading). During degeneration, these conditions are further aggravated by numerous factors such as nutritional deficits, increased matrix acidity and inflammation, which can affect cell survival, behavior, and ECM production. The degenerative medium used in our study, by composition, mimics closely degenerative IVD

environment. This medium has a lower pH and osmolarity, and a selectively higher mineral content including supplementation with the inflammatory cytokine IL-1 β , representing the conditions of a degenerative disc (van Dijk et al., 2011) targeted by our current therapy.

Our present data indicate that, in conditions mimicking the degenerative disc environment, LN induces a strong increase in GAG production by NP cells. This finding is in an agreement with our earlier data (Alaqueel et al., 2020), showing that LN can restore GAG production to healthy control levels in human osteoarthritic cartilage when exposed to IL-1 β , an inflammatory cytokine known for its catabolic activities in cartilage and IVD (Masuda & An, 2004; W. Yang et al., 2015). The strong effect of LN observed in these conditions can be partly explained by the fact that LN inhibits IL-1 β signaling pathways (Alaqueel et al., 2020). Interestingly, our findings demonstrate that in a degenerative medium, the level of GAG achieved with LN reached similar levels to those observed with TGF- β .

LN, however, did not stimulate GAG production in normal media. Previous work has also demonstrated that LN had no apparent effect in the medial tibial plateau of a rabbit model of osteoarthritis (Antoniou et al., 2019). It was reported that this may be related to the low-grade of cartilage pathology occurring at this site in the model. This observation raises the possibility that LN exerts its influence once matrix degradation exceeds turnover (Alaqueel et al., 2020; Antoniou et al., 2019). In contrast, TGF- β increases GAG production in both normal and degenerative conditions.

Interestingly NP cell survival appears to be stimulated by LN in the presence of gelatin in degenerative medium. In contrast, supplementation with TGF- β does not affect cell viability in a similar manner. Antoniou et al. have demonstrated that LN has chondroprotective properties (Antoniou et al., 2019) which may have been enhanced in the presence of gelatin, protecting NP cells against the harmful composition of the degenerative medium. Furthermore, in a degenerative environment, LN and gelatin have induced higher GAG production compared to LN and gelatin used separately, suggesting an independent additive benefit. This could be explained by the fact that LN and gelatin do not affect the cells in the same manner. Gelatin

improves GAG production by inducing a change in cell adhesion and organization while LN improves GAG synthesis through stimulation of Sox9 expression and inhibition of inflammatory protein (Antoniou et al., 2012).

Despite the significant benefit of gelatin and LN, the amount of synthetized GAG is still lower (10%) compared to what is quantified in healthy human disc (Alini et al., 2003). In further work, a prolonged incubation time, an increase in cells density in the gel and a mechanical stimulation during the culture may help increase GAG production close to *in vivo* level.

However, our study established the proof of concept that LN embedded in CH or CH/gelatin scaffolds can increase the activity of encapsulated cells. Further investigations are required to define how exactly LN should be incorporated in the gel for clinical transfer. The first strategy may be to add LN in the cell suspension before encapsulation. Rapid diffusion of LN is then expected but should not be an issue *in vivo* since the released LN will stay in the disc and may stimulate native disc cells surrounding the injected scaffold. Another option may be to embed LN in nanoparticles before encapsulation to better control the release profile.

This study was performed with NP cells to determine the effectiveness of the technology. Next *ex vivo* and *in vivo* steps will be performed to validate our findings with a clinically available cell source such as human stem cells, to facilitate the translation of the technology.

4.7 Conclusions

LN and gelatin were evaluated as bioactive agents in order to establish whether they are capable of increasing the viability and activity of NP cells encapsulated in 3D CH thermosensitive hydrogels. LN increased GAG production in a degenerative medium to the same level as TGF- β . Addition of 1% gelatin in CH hydrogel further increases GAG production and interestingly improves the mechanical resistance of CH hydrogel, which elasticity is similar to native NP tissue. The results support the concept that CH hydrogel supplemented

with LN and gelatin may be an ideal scaffold for cell-based supplementation to help enhance the function of the NP during the early stages of IVD degeneration.

Acknowledgements

The authors would like to thank funding organizations CIHR and NSERC (Collaborative Health Research Program 508365), as well as Canada research chair program (S.L.). A.A. also acknowledge scholarships by NSERC.

All authors have no financial or non-financial conflicts of interest to disclose.

CHAPITRE 5

EFFECT OF COCCYGEAL LEVELS, INTER-SPECIMEN VARIABILITY, STORAGE CONDITIONS, AND DEGENERATION ON MECHANICAL PROPERTIES OF BOVINE CAUDAL INTERVERTEBRAL DISCS

Atma Adoungotchodo ^{1,2,4}, Eric Wagnac ^{2,3}, Elisabeth Laroche ^{2,3}, Yvan Petit ^{2,3}, Fackson Mwale ^{4,5}, Sophie Lerouge ^{1,2}

¹ Laboratory of Endovascular Biomaterials (LBeV), Centre de recherche du CHUM (CRCHUM), 900 St Denis, H2X 3H8, Montreal, CANADA

² Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure (ÉTS), 1100 Notre-Dame West, H3C 1K3, Montreal, CANADA

³ Research Center, Centre Intégré Universitaire de Santé et de Services Sociaux du Nord-de-l'Île-de-Montréal (CIUSSS-NIM), 5400 Gouin Blvd., H4J 1CD5 Montreal, CANADA

⁴ Lady Davis Institute for Medical Research, SMBD-Jewish General Hospital, 5790 Ch de la Côte-des-Neiges, H3S 1Y9, Montreal, QC, CANADA

⁵ Division of Orthopaedic Surgery, McGill University, 1650 Ave. Cedar, H3G 1A4, Montreal, CANADA

Article soumis pour publication, Juin 2022

5.1 Mise en contexte

L'objectif de cette partie de la thèse était d'injecter la formulation sélectionnée dans un disque bovin dégénéré afin d'évaluer sa capacité à restaurer les propriétés mécaniques du tissu. Au début de nos expérimentations, nous nous sommes rendu compte que les propriétés mécaniques des disques bovins utilisées variaient beaucoup selon le niveau vertébral et les conditions de stockage et de test. Les résultats dans l'article 3 présentent donc une étude qui met en lumière pour la première fois comment le choix des échantillons peut influer sur la variabilité des résultats et constituer un frein pour conclure sur la performance d'un modèle de disque dégénéré ou la performance d'une matrice injectable. Ces résultats ont également permis de montrer les défis associés à l'utilisation d'une technique de dégénérescence enzymatique telle que la papaïne. Nous n'avons pas pu évaluer les propriétés du gel dans le disque dégénéré mais

nous avons mis au point un protocole qui pourra servir dans le futur à faire cette évaluation de façon plus fiable. Cette étude a été effectuée au centre de recherche de l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal en collaboration avec le Laboratoire d'imagerie orthopédique de l'ÉTS. Tous les tests ont été effectués par A. Adoungotchodo sauf les tests de mobilité qui ont été réalisés par E. Laroche. L'article a été soumis pour publication dans le *Journal of Biomechanical Engineering*.

5.2 Abstract

Minimally invasive cell therapy treatments of intervertebral discs require injectable scaffolds that help to restore the biomechanics of the disc and enable excellent survival of encapsulated cells. While in vitro tests are useful for comparing the mechanical properties of a scaffold to native tissue, more realistic tests are required to confirm its ability to withstand mechanical stress and restore its biomechanics in physiological conditions. Explanted bovine discs represent interesting ex vivo models for this evaluation. However, inter-animal variability, coccygeal levels, testing, and storage conditions may influence the mechanical properties of the discs and lead to data misinterpretation. In this study, we have shown that the disc properties vary significantly from animal to animal, and as a function of the coccygeal level except for discs Cd1-Cd2 and Cd2-Cd3 which showed a similar behavior in unconfined compression and may therefore be used to compare two groups in the same animal. Papain, used to induce the disc degeneration, increased the range of motion and the neutral zone of the discs in flexion/extension and bending. However, the same tendency was also observed as a function of time on healthy samples when simply stored, showing that storage conditions may affect the mechanical properties of the sample. It is important to take all these observations in consideration when evaluating a degeneration model or the capacity of an injectable hydrogel to restore the mechanical properties of degenerated intervertebral discs.

5.3 Introduction

Low back pain is a major health problem that affects more than 90% of people over 60 (Teraguchi et al., 2014). Intervertebral disc (IVD) degeneration is the leading cause of this pain (DePalma et al., 2011). IVD degeneration is initiated by a gradual decrease in proteoglycans quantity (Raj, 2008). Proteoglycans are responsible for the high water content of the disc, and thus strongly determine the mechanical properties of the tissue in terms of compressive properties, osmotic pressure, and range of motion in flexion, extension, lateral bending, and torsion (Galbusera et al., 2014; Iatridis et al., 2013). During the degeneration process, a shift in the biochemical composition of the disc generates alterations in the mechanical properties of the tissue, especially a decrease in compressive resistance and osmotic pressure (Urban & McMullin, 1985) and an increase in the range of motion in flexion (Oxland et al., 1996).

To avoid the drawbacks of current highly invasive surgical techniques, studies are in progress to design minimally invasive therapies to repair degenerated IVDs. Cell delivery in the disc is an interesting approach to stimulate IVD repair (Ganjun et al., 2011; Sakai & Schol, 2017). However, several studies suggest that the cells should be encapsulated in an injectable scaffold (Francisco et al., 2013; Neidlinger-Wilke et al., 2005; Rosenzweig et al., 2017; Sakai et al., 2003; Smith et al., 2014) to provide a tridimensional support for the cells and improve their retention and survival. Moreover, this scaffold should help restore the biomechanical properties of the nucleus pulposus (NP), the central part of the disc, where the degeneration process starts (Frith et al., 2013; Smith et al., 2014; Wiltsey et al., 2013).

A complete mechanical characterization of these injectable scaffolds is essential to confirm their capacity to restore the biomechanics of the spine (Balkovec, Vernengo, & McGill, 2013). In addition to in vitro tests, which aim to compare the mechanical properties of the scaffold to those of native tissue, more realistic tests are required to confirm its ability to withstand mechanical stress and restore the biomechanics in physiological conditions. Ex vivo degenerated disc models (degeneration models) have proven useful in terms of achieving this aim. (Newell et al., 2020). Among such models, explanted bovine caudal discs are of particular

interest for such screening tests due to their similarity with human IVD (Patel, Kepler, Schaer, & Anderson, 2014; Demers, Antoniou, & Mwale, 2004), and they have been used extensively for that purpose (Growney Kalaf, Pendyala, Bledsoe, & Sell, 2017; Hom et al., 2019; Malonzo et al., 2015; Thorpe et al., 2017). Notwithstanding the fact that it is recognized that some variability may spring from samples used and testing conditions (Michalek & Iatridis, 2012; Newell, Grigoriadis, Christou, Carpanen, & Masouros, 2017), no study has evaluated the effect of those parameters and their consequences on the way mechanical differences between healthy, degenerated or treated discs can be interpreted.

The objective of this study was therefore to evaluate the effects of coccygeal levels, animal variability and testing conditions on the mechanical properties of caudal bovine IVD to determine how these effects should be considered when studying the impact of a degeneration or treatment on the mechanical properties of the disc.

First, we evaluated an enzymatic degeneration model with papain, as described by Chan et al. (Chan, Bürki, Bonél, Benneker, & Gantenbein-Ritter, 2013). A histology analysis was performed to select the papain concentration and incubation time suitable for >grade 3 degeneration (Kotwal, Mohan, Bahadur, & Bal, 2002). Healthy bovine motion segments isolated from different animals and at various coccygeal levels were used to evaluate the inter-specimen variability and testing conditions effects on mechanical properties. In a second step, the mechanical properties of the degenerated samples were compared to healthy discs in unconfined compression, flexion, extension and bending.

5.4 Material and methods

5.4.1 Sample preparation

For unconfined compression test

Seven bovine tails were bought frozen and stored at -80°C until use. The tails were thawed in a fridge at 4°C for 24h. Whole tails were immersed in povidone 10% for 15 minutes. Soft tissues (muscles and ligaments) were removed. Motion segments, consisting of discs with the

adjacent vertebrae, were isolated by cutting through the vertebrae to ensure parallel surfaces. Only motion segments (19 in total) from coccygeal levels Cd1-Cd2 to Cd4-Cd5 were extracted (Figure 5.1).

For flexibility test

Six motion segments composed of the second (Cd2) and the third (Cd3) proximal vertebrae were extracted from six different tails by cutting through discs Cd1-Cd2 and Cd3-Cd4 (Figure 5.1, solid line rectangle). In contrast to the compression test samples, the complete adjacent vertebrae were kept to ensure a good gripping during the test. Therefore, only one motion segment was isolated per tail for this test. After removing all processes, both extremities of the motion segments were potted in a two-part epoxy resin (Bondo, 3M, St. Paul. MN). Gauzes soaked in saline solution were wrapped around the motion segment's disc to keep it hydrated while the resin hardened. Each sample was placed in a hermetic plastic container filled with PBS and stored at 37°C overnight in a water bath.

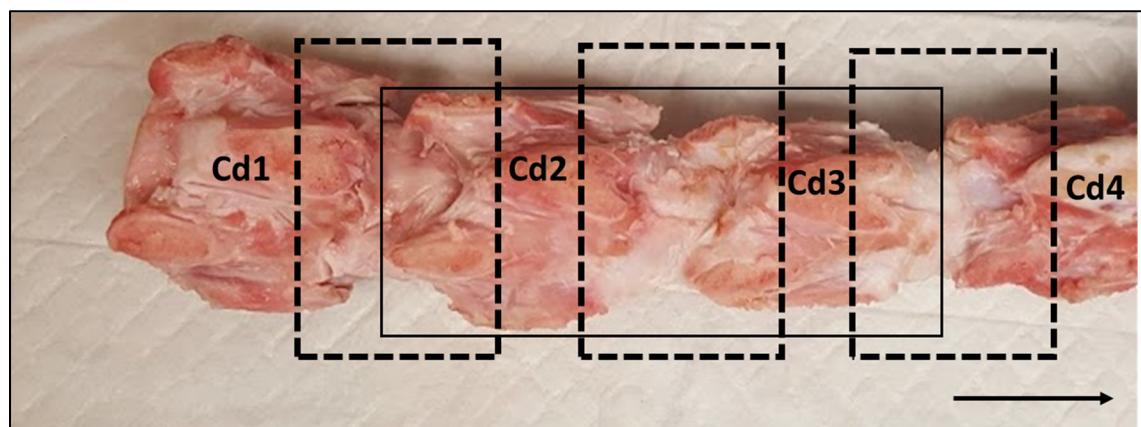


Figure 5.1 Preparation of samples for mechanical characterization. Soft tissues were removed from the tail and 3 to 4 motion segments (delimited by the dotted rectangles) were extracted by cutting through adjacent vertebrae for unconfined compression test.

The coccygeal level is labelled from Cd1 to Cd4 in the cranio-caudal direction (indicated on the figure by the arrow). For the flexibility test, one motion segment (solid line rectangle) was extracted per tail by cutting through Cd1-Cd2 and Cd3-Cd4 intervertebral discs

5.4.2 Degeneration model

Enzymatic degeneration was performed on the samples using papain according to the protocol of Chan et al. (Chan et al., 2013). First, a buffer consisting of 150mM cysteine hydrochloride (Sigma-Aldrich, 30120), 5mM sodium citrate (Sigma-Aldrich, W302600), and 5mM Ethylenediaminetetraacetic acid (USB, 15701) was prepared. Papain powder (Sigma-Aldrich, P3375) was added to the buffer solution to obtain 60 or 150 units (U) of papain per mL. The pH of each solution was adjusted to 7 by using 5M sodium hydroxide (ACS, BDH9292). A volume of 100µL of the degeneration solution was injected in the NP through the AF using a 22G needle. In other discs, a saline solution (PBS 1X) was injected to create a control group. After the injection, each sample was immersed in PBS and stored at 37°C for 24 or 72h to evaluate the effect of papain. 100µl of ebselen solution (E3520, Sigma-Aldrich) prepared at a ratio of 1µM per 60U of papain, was then injected to stop the papain effect according to Malonzo et al. (Malonzo et al., 2015).

5.4.3 Histology

Histology was performed to evaluate the biochemical changes induced by the degeneration model. Samples (control and degenerated) that had been incubated for 24 or 72h were retrieved from the incubator. Different incubation times were tested because the effect of papain on the disc is time-dependant (Chan et al., 2013). Each disc was cut transversely in the middle to expose the NP and the annulus fibrosus (AF). The samples were fixed in formalin 10% at room temperature. They were then embedded in paraffin and 4µm transversal sections were stained with Hematoxylin and eosin (H&E) or Safranin O (S-O). Pictures of the stained samples were taken with an optical microscope (Leica DM LB2, Germany).

5.4.4 Mechanical testing

Unconfined compression protocol

Unconfined compression tests were performed on the motion segments using an MTS 858 Mini Bionix II testing machine. Samples were placed in the sample holder filled with PBS.

The sample holder was large enough to allow the samples to deform freely in all directions (Figure 5.2A). Contact between the samples and the upper plate of the machine was ensured by applying a stress of 0.06MPa. The thickness of the disc was determined by measuring the gap between two needles placed at its extremities and was used to calculate the deformation. An initial deformation of 3% was applied at 0.1%/sec on the sample followed by 10 cycles between 3 and 6% as a pre-loading step. A first relaxation step of 10 min was then applied, followed by 4 incremental steps of 3% deformation (0.1%/sec), each separated by a 10 min relaxation (Figure 5.2B). The equilibrium modulus was calculated as the slope of the ‘equilibrium stress versus deformation’ curve. The equilibrium stress was the stress at the end of each relaxation step (Cloyd et al., 2007), calculated by dividing the measured force by the initial cross-sectional area of the disc. The cross-sectional area of the human disc is almost elliptical in shape (Pooni, Hukins, Harris, Hilton, & Davies, 1986). The major and minor diameters of the surface were measured with a digital calliper and used to calculate the area.

Flexibility protocol

Flexibility tests were performed with the torsional motor of a Bose Flexiforce 3220-AT mounted on a custom frame (Figure 5.2C). Moments were recorded at a 5 Hz frequency with a 5.7 N/m load cell. The samples were tested in flexion/extension and lateral bending using a custom translation table to ensure pure moment. 15 cycles were performed for both movements (Figure 5.2D). For each cycle, a moment of 1.5 Nm is generally imposed at 1 °/s from the neutral position (0 Nm), and the rotation is reversed until it reaches -1.5 Nm. The cycle ends when the sample returns to its neutral position. During the tests, saline water was sprayed on the samples to prevent dehydration. Between the two tests, the samples were returned into their PBS containers and stored at 37°C.

Three parameters were calculated from the data of the 15th cycle: the total range of motion (ROM), the stiffness (s), and the size of the neutral zone (NZ). The ROM was counted as the total angular amplitude between the peak moments reached at 1.5 Nm and -1.5 Nm. The stiffness was calculated using the end points (at 1.5 Nm and -1.5 Nm) of the applied moment versus angular displacement curves. The stiffness, in Nm/°, corresponds to the rate of variation

of the straight line passing through these points. NZ was calculated as described by Wilke et al (Wilke, Krischak, Wenger, & Claes, 1997).

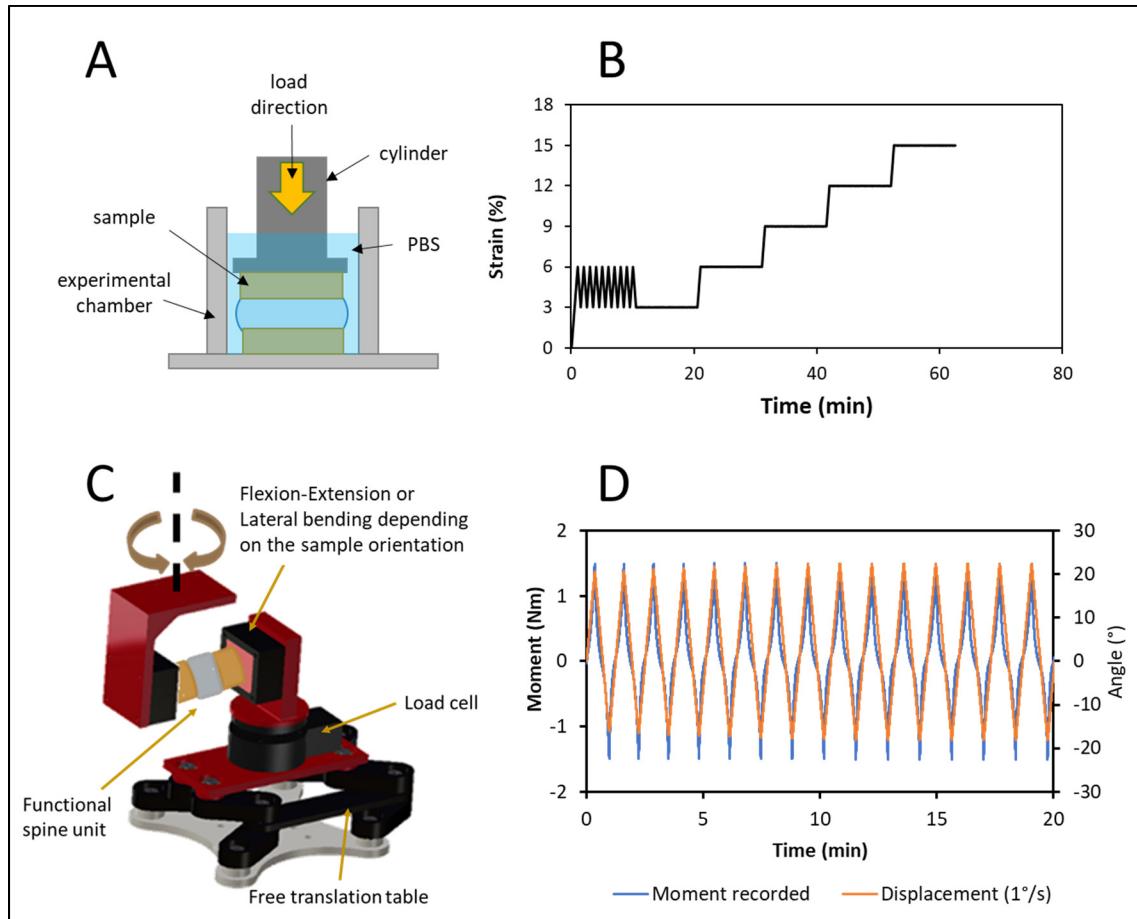


Figure 5.2 Unconfined compression and flexibility tests on motion segment (disc with adjacent vertebrae) A) Samples for compression were placed in a custom chamber filled with PBS 1X on MTS 858 Mini Bionix II testing machine B) Incremental stress relaxation test was performed on samples in unconfined compression (10 cycles of preconditioning followed by 5 series of 3% deformation, each followed by 10 min of relaxation) C) Samples for flexibility were tested in flexion/extension and lateral bending using the torsional motor of a Bose Flexiforce 3220-AT and a custom translation table to ensure pure moment. D) Fifteen cycles were performed for each movement. A cycle starts at the neutral position of the sample (0 Nm), a rotation is imposed at $1^{\circ}/\text{s}$ until a moment of 1.5 Nm is reached, then the rotation is reversed until it reaches -1.5 Nm. The cycle ends when the sample returns to its neutral position

5.4.5 Effect of inter-specimen variability, coccygeal levels, and incubation time on healthy disc mechanical properties

To effectively compare healthy and degenerated samples, the first step of this study was to evaluate the mechanical properties of healthy discs from the same or different tails to assess if all the discs, independently of the tails or coccygeal level, could be considered similar in terms of mechanical properties. Motion segments from Cd1-Cd2 to Cd4-Cd5 were isolated from three different tails. The samples were incubated in PBS for 24h for complete hydration and a first compression test was performed using the unconfined compression protocol described earlier. The equilibrium moduli of the different samples were compared to evaluate the variability between animals and coccygeal levels.

The samples were incubated for another 24h (incubation time for selected degeneration model, as will be explained in the results section), and a second compression test was performed to evaluate the effect of incubation time and of repeating tests on the mechanical properties of the discs.

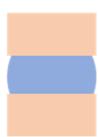
5.4.6 Effect of the degeneration model on discs' mechanical properties

The effect of the degeneration model (150 U/mL of papain for 24h) on the mechanical properties of the discs was evaluated in unconfined compression and through a flexibility test.

Unconfined compression

Based on the results of the previous test, only motion segments with discs Cd1-Cd2 and Cd2-Cd3 were used to evaluate the effect of the degeneration model on the discs' mechanical properties. The degeneration model was selected based on histology results and consisted of 150U/mL of papain and a 24h incubation time, as presented in Table 1. Due to the variability of the coccygeal levels, the control group consisted of healthy Cd2-Cd3 motion segments while the degenerated group was composed of degenerated Cd1-Cd2 motion segments. The experimental protocol for this test is presented in Table 5.1.

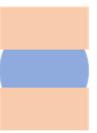
Table 5.1 Experimental protocol to evaluate the effect of the degeneration model on the discs' mechanical properties in unconfined compression

	Control 	Degenerated 
Day 0: Sample preparation and injection	Injection of 100µL of PBS	Injection of 100µL of papain
Day 1 (24h): Enzyme inhibition	Injection of 100µL of PBS	Injection of 100µL of ebselen
Day 2 (48h): Mechanical test	Incremental relaxation test in unconfined compression	

Flexibility

For the flexibility test, one motion segment was used per tail. To eliminate the inter-specimen variability, each sample was used as its own control, and therefore underwent several tests, as summarized in Table 5.2. A first test was performed at day 1, 24h after sample preparation, followed by the injection of the papain solution. The samples were incubated for 24h and a second test was performed at day 2 to evaluate the effect of the degeneration solution. After this second test, ebselen was injected into the samples to stop the effect of the degeneration solution. The samples were then incubated for an additional 24 h. A third and a fourth test were performed respectively at day 3 and day 4 to evaluate if the degeneration stopped after ebselen injection. A control group with healthy samples (no treatment) was used to evaluate the effect of the incubation time and repeated tests on the mechanical properties and to ensure that all the differences observed really came from the degeneration process. All the samples were immersed in PBS and stored in a water bath at 37°C between tests. The PBS solution was changed every day.

Table 5.2 Flexibility test protocol

	Control 	Degenerated 
Day 0	<ul style="list-style-type: none"> - Sample preparation - Samples were immersed in PBS and stored in a water bath at 37°C 	
Day 1	<ul style="list-style-type: none"> - Flexibility test 1 - Incubation at 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> - Flexibility test 1 - Papain injection - Incubation at 37°C
Day 2	<ul style="list-style-type: none"> - Flexibility test 2 - Incubation at 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> - Flexibility test 2 - Ebselen injection - Incubation at 37°C
Day 3	<ul style="list-style-type: none"> - Flexibility test 3 - Incubation at 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> - Flexibility test 3 - Incubation at 37°C
Day 4	<ul style="list-style-type: none"> - Flexibility test 4 	<ul style="list-style-type: none"> - Flexibility test 4

5.5 Results

5.5.1 Degeneration model

The degree of an enzymatic degeneration is a function of the concentration (U/mL) of the enzyme and the length of incubation. Two concentrations of papain (60U/mL or 150U/mL) incubated for 24 hours, or 3 days were evaluated to select a proper degeneration model. The histology pictures presented in Figure 5.3 show the state of the tissue after some incubation conditions. The H&E stains the cells nuclei in dark blue and extracellular matrix in pink. S-O stains the proteoglycans of the tissue in red. The redder the tissue, the richer it is in proteoglycans (Camplejohn & Allard, 1988). No significant change was observed for the control samples (CTL) from day 1 to day 3, suggesting that the incubation itself did not induce significant change in the tissue's composition (Figure 5.3). In contrast, the S-O staining showed that, as expected, the NP exposed to papain contains a significantly lower quantity of

proteoglycans than the controls. This is well known as a disc degeneration marker (Shapiro & Risbud, 2013). The inner AF of the samples also showed a decrease in proteoglycans, suggesting that even if the papain was injected only in the NP, it diffused and affected the AF tissue as well. H&E staining also showed that the structure of the fibers was less organized for the degenerated samples as compared to the AF of control samples.

Figure 5.3 shows dispersed cells (black arrows) in NP as well as AF for the control samples. The cells were dispersed (a few per lacuna) in the AF of the degenerated samples, but formed clusters (many cells per lacuna) in NP for 60U/mL samples, suggesting >grade 1 degeneration (Kotwal et al., 2002). Fewer cells were present in the NP of 150U/mL degenerated samples.

It is important to mention that the NP was completely digested in certain spots and created cavities in the tissue (as shown by the red squares in Figure 5.3). These cavities will allow hydrogel injection in the tissue. The degree of degeneration with 150U/mL incubated for 24h was greater than with 60U/mL incubated for 3 days for the NP tissue. However, the effect of both conditions was quite similar with respect to the AF. Because of this faster degeneration, 150U/mL of papain and a 24h incubation time were used for the rest of the study.

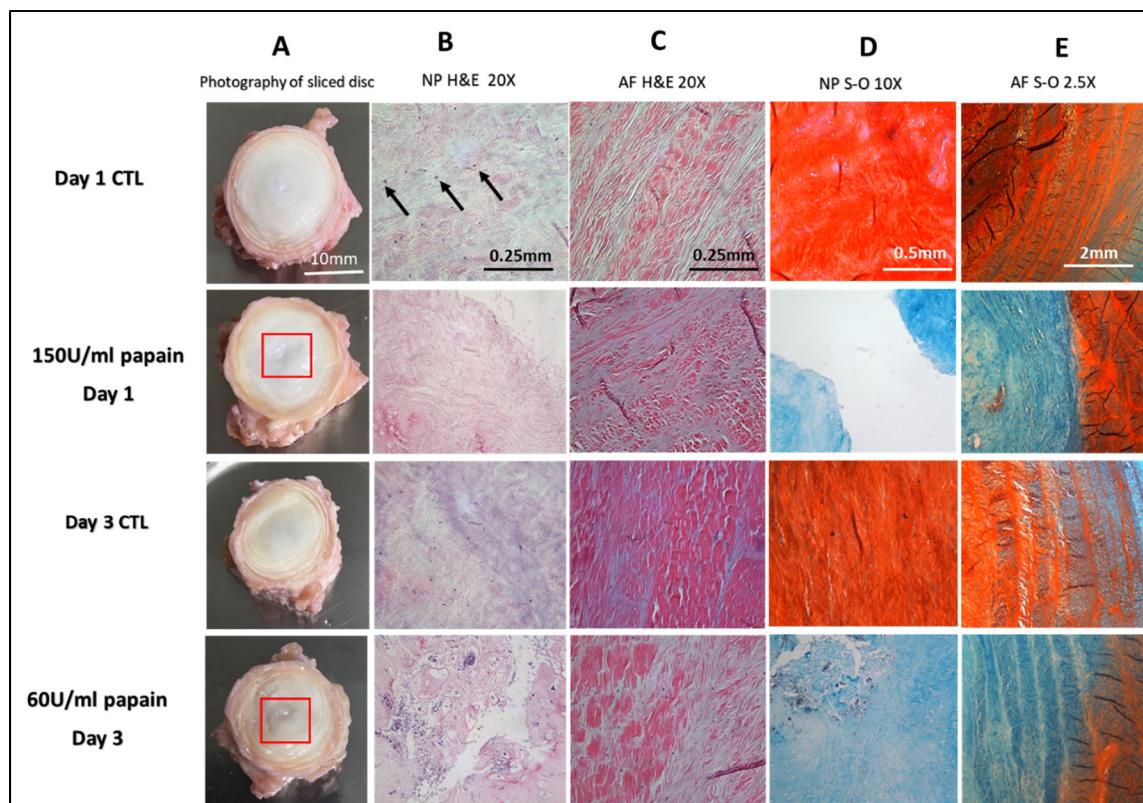


Figure 5.3 Papain induces time- and dose-dependant degeneration on bovine discs. Papain solution injected (60U/mL or 150U/mL) in the NP through AF and incubated at 37°C for 1, or 3 days. A) Macroscopic picture of the discs cut after 1 or 3 days of incubation. B) NP and C) AF tissues stained with hematoxylin eosin (H&E) D) NP and E) AF stained with safranin-O (S-O) (red squares show the hole created in the tissue by the degeneration process)

5.5.2 Effects of coccygeal levels, previous testing, and storage conditions on the mechanical behavior of discs in compression

Before assessing the effect of the degeneration model on the discs' mechanical properties, compression tests were performed on healthy discs to evaluate the variability due to coccygeal levels, storage conditions, the repetition of tests, and variability between subjects. Results are presented in Figure 5.4. Moreover, the equilibrium moduli for all tested discs after the first test are presented in Table 5.3.

A comparison between discs from same tails showed that discs Cd1-Cd2 presented similar compressive properties as did discs Cd2-Cd3. Indeed, the difference in equilibrium modulus between Cd1-Cd2 and Cd2-Cd3 discs was $11\pm3\%$. Discs Cd3-Cd4 and Cd4-Cd5 presented lower mechanical properties as compared to Cd1-Cd2 and Cd2-Cd3. The difference in equilibrium modulus was more than 30% for the Cd2-Cd3 discs versus the Cd3-Cd4 discs as well as for the Cd3-Cd4 discs versus the Cd4-Cd5 discs.

Figure 5.4 and Table 5.3 also show that the mechanical properties also varied strongly between the subjects. Discs from tail 1 were stiffer ($85\pm0.1\%$ difference) as compared to discs from tail 3, which were stiffer ($63\pm4\%$ difference) than discs from tail 2.

This variability between the discs makes it difficult to evaluate the effect of degeneration or treatment protocols. Using only Cd1-Cd2 and Cd2-Cd3 discs to compare a treatment to a control group is a solution. Another solution to this problem could be to use each sample as its own control. This required that a test be performed on the sample in its healthy state, and to then proceed to the degeneration and perform a second test to evaluate the effect of the treatment. To assess if the time and repetition of the test themselves may affect the result, we performed a second round of compression tests after 24h on the same healthy discs (incubated in PBS at 37°C for 24h, but without papain). The equilibrium modulus was lower at test 2 as compared to test 1 for all samples (Figure 5.4D). These results suggest that repeating tests and storing the samples for 24h at 37°C affects the mechanical properties of the tissue.

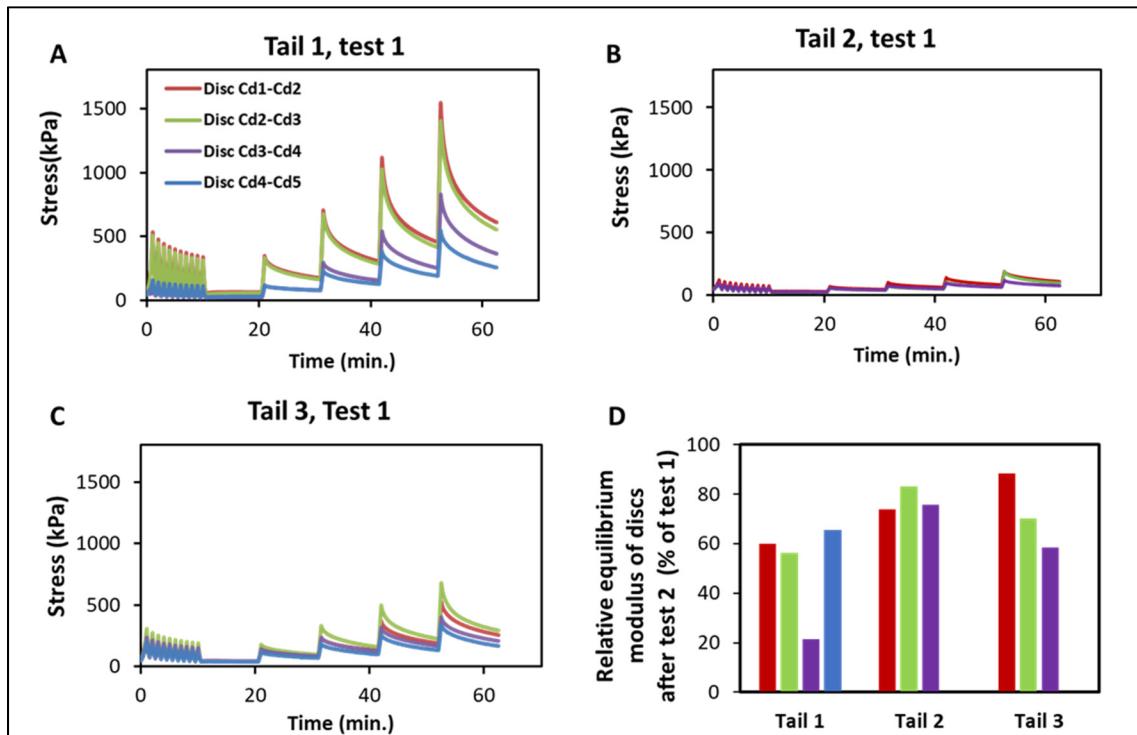


Figure 5.4 The mechanical behavior of discs from the same bovine tails under unconfined compression varies depending on the disc level and decreases with time and when repeating the tests. A, B, C) 3-4 motion segments per tail were tested in unconfined compression 24h after sample preparation; D) Relative equilibrium was obtained after testing the same discs a second time (48h after sample preparation) in unconfined compression (test 2 was not performed on disc Cd4-Cd5 for tail 3)

Table 5.3 Equilibrium modulus of disc after a first round of unconfined compression test

	Equilibrium modulus (MPa)		
	Tail 1	Tail 2	Tail 3
Cd1-Cd2	4.5	0.65	1.78
Cd2-Cd3	4.1	0.59	2.11
Cd3-Cd4	2.8	0.41	1.37
Cd4-Cd5	1.9	-	1.07

5.5.3 Comparison between degenerated and healthy discs

Under compression

Based on the observed variability, it was decided to perform a degeneration on discs Cd1-Cd2 and to compare their mechanical properties to healthy Cd2-Cd3 discs. This avoids performing several tests on the same samples and inducing variations due to parameters other than the degeneration process. Results show that degenerated samples presented lower equilibrium moduli as compared to healthy discs (control group, Figure 5.5A).

The equilibrium modulus of the degenerated samples was also presented as relative change compared to control group data (Figure 5.5B). Presenting the data in this form eliminates variations between animals and reduces the standard deviation. The mean equilibrium modulus of the control samples was 2-fold higher as compared to the degenerated discs.

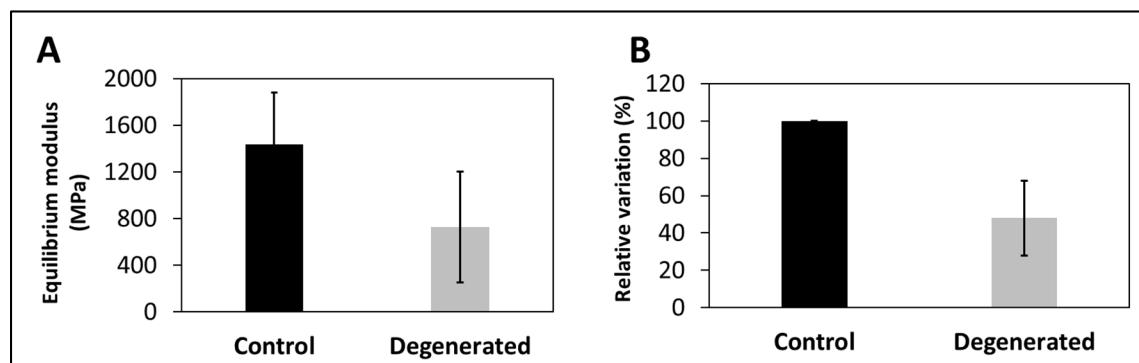


Figure 5.5 Papain degeneration model induces a decrease of the equilibrium modulus in compression in bovine discs. Papain solution was injected in the NP, and after 24h of incubation at 37°C, ebselen was injected to stop the papain effect. The control group (healthy disc) was submitted to similar steps, but the solutions were replaced by PBS.

A) Equilibrium modulus was calculated from incremental test performed on the samples 24h after ebselen injection. Discs Cd1-Cd2 were used for degenerated group and discs Cd2-Cd3 for the control group. B) Relative variation of equilibrium modulus was calculated by dividing the value of each sample by its own control. Data shown as mean \pm std, n=4

mean \pm std, n=4

During flexibility tests

Flexibility results are presented in Figure 5.6. Each sample's mechanical properties were initially evaluated at day 1 (test 1), with each respective sample used as its own control for the following tests. The ROM remained unchanged 24h after injection of papain (Figure 5.6A, test 1 versus 2), suggesting that the effect of the degeneration was negligible in both tested movements. However, the ROM seemed to increase 24h after ebselen injection (test 3) for the degenerated samples. Indeed, the relative amplitude increased by 25% and 35% respectively for degenerated samples in flexion/extension (flex/ext) and lateral bending (LB), with respect to previous data (test 1 and 2), while data remained unchanged for the control group. This suggests that the ebselen did not stop the papain, which continued to degenerate the sample at a level which induced changes in the amplitude of movement of the joint. This observation was confirmed by test 4 results, which show that ROM continued to increase during that timepoint. The control group also presented a slight increase of ROM for test 4, but to a lesser extent, suggesting a natural degeneration of the tissue during the timepoint.

The same observation was made in the neutral zone (NZ) results, where the data remained similar for the initial test (test 1) and after papain injection (test 2, 5% difference between the two tests for all groups). The degenerated discs showed a considerable increase in the NZ (71 and 133% increase in flex/ext and LB, respectively) 24h after ebselen injection (48h after papain injection, test 3). However, the control group discs showed an increase in the NZ at the same timepoint (Figure 5.6B test 3 and test 4), suggesting that the storage conditions had induced some changes in the flexibility properties of the discs as well. Indeed, NZ after test 4 also showed an increase for the control group.

A slight decrease in stiffness (<10% at day 4, Figure 5.6C, D) was observed for the control group, while it was around 20% for degenerated discs.

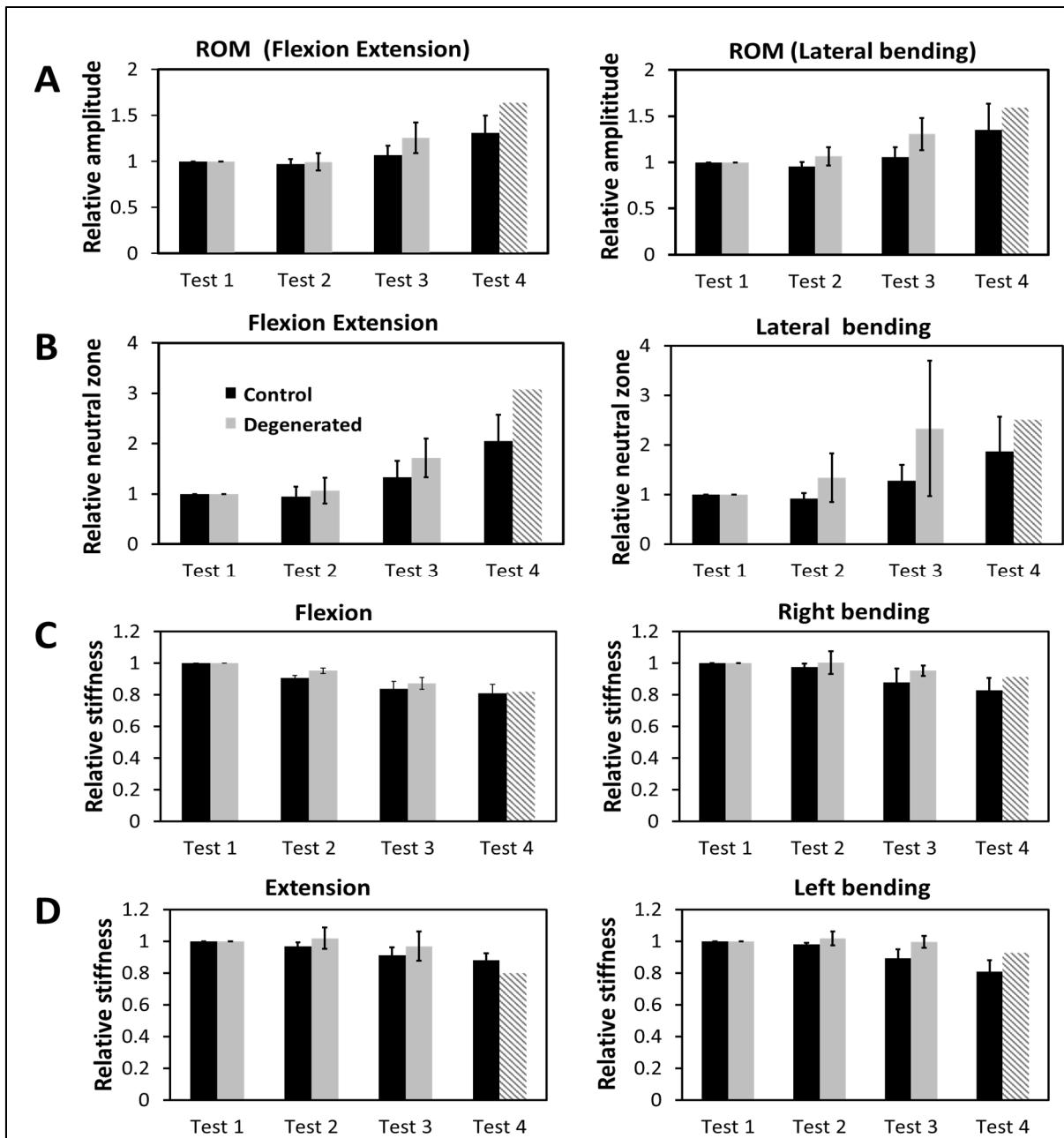


Figure 5.6: Papain and storage conditions induce modifications to the discs' mechanical properties in flexion/extension and lateral bending. A) Range of motion (ROM); B) Neutral zone; C, D) Stiffness in flexion, extension, and lateral bending for degenerated disc (gray column) and control disc (black column) at the following timepoints: Initial (Test 1); 24h after papain injection (test 2); 24h after ebselen injection (test 3); 24h later (test 4). In the control group, samples were only incubated at 37°C without injection. Results are expressed relative to the results of test 1. Data are shown as mean \pm std, n=3. One sample in the degenerated group broke during the fourth test and was not included in the data for this test (n=2 instead of 3)

5.6 Discussion

Due to the complexity of the intervertebral disc, simple in vitro compression tests are not sufficient to reproduce the mechanical loading and estimate the capacity of a scaffold or treatment to restore or reinforce the mechanical properties of the disc (Chan et al., 2013). Explanted bovine discs represent an interesting and much less costly, alternative to in vivo tests, allowing to fully evaluate the mechanical behavior of an injectable scaffold in a degenerated disc (Alini et al., 2008). However, proper protocols must be defined to avoid factors leading to variability and inconclusive data. In this study, we have demonstrated that the mechanical properties of bovine intervertebral discs changed with subjects, coccygeal levels, storage conditions and repeated testing, and we proposed a methodology to circumvent these challenges.

A strong variation was observed between animals, and to a lesser extent, between the coccygeal levels (from Cd1-Cd2 to Cd4-Cd5), according to unconfined compression results. However, the first two discs presented a similar compressive behavior. This observation led us to consider only discs Cd1-Cd2 and Cd2-Cd3 from the same animal in evaluating our degeneration model. To the best of our knowledge, we are the first to report this variation in bovine disc mechanical properties as a function of the coccygeal levels.

This inter-specimen variability or variability due to coccygeal levels may hide the real effect of the treatment, and may therefore at least partially explain why most of the previous ex vivo studies struggled to confirm the efficiency of their scaffold (Gullbrand et al., 2017) even when they have demonstrated that the hydrogel tested separately in vitro possess similar mechanical properties to NP tissue (Gullbrand et al., 2017). A blind classification of samples into control or degenerated group may generate a difference between the study groups even before the treatments are applied. It is therefore important to use two discs from the same animal which present similar behavior, as we did with Cd1-Cd2 and Cd2-Cd3 discs to evaluate the impact of our degeneration model by papain injection.

One way to avoid the inter-specimen difference is to use each sample as its own control but repeated testing and natural degradation of the samples with time may affect the mechanical properties of the samples. As presented in this paper, performing a second test on a sample after 24h (incubation at 37°C) lead to a decrease on the compressive properties of the discs. Results of flexion extension tests confirm this observation, where a healthy sample tested 4 times in 4 days also presents gradual increase of the ROM of the motion segment, as occurs in the degeneration process (Gullbrand et al., 2017). A control group subjected to all-but-one same steps (i.e. here except the degeneration protocol) is therefore of outmost importance if one decides to consider each sample as its own control. In this study, the small number of samples (3-4) prevented us to confirm a statistically significant difference between the degenerated and control group, but this could be achieved by increasing the sample number. Moreover, using fresh instead of frozen samples may help to reduce this natural degeneration process. Indeed, the use of frozen samples is a limitation of our study since the congelation may affect the tissue properties.

One of the challenges related to enzymatic degeneration models lies in stopping the enzyme effect after a given time period. In the present study, papain was used to degenerate the disc, and ebselen to stop the degeneration, but degeneration continued to progress after ebselen injection, despite using similar amounts of papain and ebselen as Malonzo et al. This ratio was optimized to choose an ebselen concentration that is not toxic for cells (Malonzo et al., 2015). Further investigation should be performed to determine the optimal protocol for ebselen to stop papain. Nikawa stated that 0.75 mol of ebselen is enough to inhibit 1 mol of papain. However, this quantity of papain is difficult to reproduce because the author did not publish the amount of the enzyme units present in 1mol of their degeneration solution (Nikawa, Schuch, Wagner, & Sies, 1994). Trypsin is an alternative enzyme that can be used to degenerate the disc since it can be stopped by FBS, which is used for cell culture (Roberts, Menage, Sivan, & Urban, 2008). However, the degeneration speed of trypsin is lower than that of papain. Accordingly, trypsin requires a longer incubation time, which increases the effect of natural degeneration of the tissue.

We observed a decrease of equilibrium modulus of about <50% 24h after 150U/mL papain injection. This is similar to the effect observed by Chan et al. when incubating their samples for 10 days with the same papain concentration (Chan et al., 2013). This high decrease in mechanical properties may be explained by the fact that the degeneration models do not usually affect only the NP tissue as expected. This is particularly true in the case of enzymatic degeneration, where the solution injected in the NP may diffuse and affect the AF. This hypothesis was confirmed by our histology results, which showed a decrease in the GAG content of AF tissue for degenerated tissue even if the papain solution was injected only in the NP. Chan et al. arrived at the same conclusion in their study. Their data showed that papain induces AF tissue degeneration and leads to a significant decrease of mechanical properties in cyclic compression (Chan et al., 2013).

Using a nucleotomy degenerative model may be an interesting alternative. Many studies have retrieved a part of the NP to simulate tissue degeneration (Growney Kalaf et al., 2017; Hom et al., 2019; Lin et al., 2019). Performing nucleotomy through the vertebrae instead of the AF limits the effect on the AF (Joshi et al., 2006), but the samples must be selected to limit the variability effect discussed above.

5.7 Conclusion

In this study, we describe variabilities of the mechanical properties of healthy bovine discs induced by difference in coccygeal levels, sample storage and testing conditions. Our data suggest that only discs Cd1-Cd2 and Cd2-Cd3 should be used when formulating group tests to evaluate a degenerative disc model or the mechanical performance of an injectable scaffold aimed at restoring the mechanical properties of the NP tissue. Papain solution used to create degeneration in the NP part diffuses as well on the AF and induces a decrease in the mechanical properties of the whole disc, and therefore constitutes a challenge when it comes to evaluating the performance of a scaffold targeting only an NP mechanical repair. In addition, the natural degeneration of bovine tissues was also evaluated, and must be considered for mechanical screening tests.

Despite the small sample number, this study provides quantitative data on how intrinsic parameters and testing and storage conditions can affect characterization studies of ex vivo mechanical properties and thus help define adequate protocols. These are crucial for the evaluation and screening of injectable therapies for intervertebral disc regeneration.

Acknowledgements

The authors would like to thank the CIHR and NSERC (Collaborative Health Research Program 508365) funding organizations as well as the Canada Research Chair program (S.L.). A.A. also acknowledges scholarships by NSERC and by ÉTS.

All authors have no financial or non-financial conflicts of interest to disclose.

CHAPITRE 6

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES : VIABILITÉ ET PRODUCTION DE PROTÉOGLYCANES PAR LES CELLULES STROMALES MÉSENCHYMATEUSES (MSC) ENCAPSULÉES DANS LES GELS DE CHITOSANE

6.1 Mise en contexte

Les cellules du NP sont une source cellulaire intéressante pour évaluer une thérapie injectable pour le DIV. Cependant, ces cellules ne sont pas disponibles pour une utilisation clinique (O'Halloran & Pandit, 2007). Les MSC, quant à elles, sont cliniquement disponibles puisqu'elles peuvent être prélevées soit dans la moelle osseuse, soit dans le tissu adipeux. Cependant, elles ont besoin d'un environnement approprié pour se différencier.

Les MSC sont des cellules pluripotentes qui peuvent se différencier en différents types cellulaires en fonction de la composition du milieu ou de l'environnement de culture. De nombreuses études ont confirmé la capacité des MSC à se différencier en cellules de type NP. Divers facteurs sont connus pour induire cette différenciation. Parmi ces facteurs, nous avons l'hypoxie (Kumar et al., 2014; Risbud, Schipani, & Shapiro, 2010; Stoyanov et al., 2011; Thorpe et al., 2016), l'utilisation de facteurs de croissance chondrogéniques tels que le TGF- β (Smith et al., 2014) et la coculture avec des cellules du disque (Richardson et al., 2006; Sobajima et al., 2008; Watanabe et al., 2010). Cependant, Richardson et al ont démontré que les cellules MSC encapsulées dans des gels de chitosane BGP sont capables de se différencier en cellules NP dans un milieu de culture standard sans facteur de différenciation en normoxie (Richardson et al., 2008).

Nous avons donc posé l'hypothèse que les MSC seraient capables de se différencier en cellules NP quand elles sont encapsulées dans la meilleure formulation de nos gels de chitosane

(SHC0.075MBGP0.1M) en produisant des protéoglycane. Cette activité de synthèse serait améliorée en présence du Link N.

Nous présentons ici les résultats de production de protéoglycane (caractérisée selon la production de glycosaminoglycane (GAG)) par les MSC, la viabilité de ces cellules encapsulées et les démarches effectuées pour améliorer la survie de ces cellules dans les gels de chitosane.

6.2 Viabilité et production de GAG par les MSC encapsulées dans les gels de chitosane en présence du Link N

6.2.1 Objectif

La production de GAG par les cellules est un marqueur important d'une activité de synthèse appropriée pour la régénération du NP. Comme premier objectif, nous avons évalué la production de GAG par les cellules MSC encapsulées dans le gel de chitosane et cultivées dans le milieu dégénératif et en présence du Link N.

6.2.2 Méthodologie

Les MSC humaines (PT-2501, Lonza) ont été encapsulées dans 2 % de chitosane avec SHC0.075M BGP0.1M. 200 μ L d'hydrogel ont été placés dans des puits d'une plaque de 48 puits avec 500 μ L de milieu.

Après 14 jours de culture, le test de DMMB a été utilisé pour évaluer la quantité de GAG produite par les cellules. Il faut noter que la concentration des cellules dans les gels était de 2,5 millions de cellules/mL, donc 500 000 cellules par puits.

Des tests de viabilité ont été effectués après 1, 7 ou 14 jours de culture avec les gels cultivés dans les mêmes conditions, mais avec une densité cellulaire de 1 million/mL (200 000 cellules par puits). Les cellules en 2D ont été cultivées avec les mêmes milieux afin de définir l'effet

du gel sur la viabilité. Le taux de viabilité cellulaire a été calculé en divisant le nombre de cellules vivantes par le nombre total de cellules. Le comptage a été fait grâce au logiciel Image J.

Les hydrogels ont été cultivés dans divers milieux de culture :

- **α -mem** (alpha minimum essential medium, Gibco): Ce milieu est utilisé pour cultiver les MSC et ne contient aucun composant pouvant induire de la différenciation chondrogénique. Nous l'avons utilisé comme contrôle afin de définir la quantité de base de GAG produite par les MSC.
- **DM** est le milieu dégénératif commercial, conçu pour reproduire l'environnement d'un disque dégénéré. PrimeGrowthTM degenerative disc cells medium, 319-513-CL, Wisent Inc.
- **DM+IL** est le milieu dégénératif complété par 1 ng d'IL-1 β (interleukine 1 bêta) qui est une cytokine inflammatoire présente dans le disque dégénératif. Cette condition est celle qui se rapproche le plus des conditions *in vivo* d'un disque dégénéré.
- **DM+IL+AA:** DM complété par IL et 50 μ g/mL d'acide ascorbique (AA). L'acide ascorbique est connu pour améliorer la viabilité cellulaire et la production de matrice extracellulaire de façon générale.
- **DM+IL+AA+Link-N** : DM additionné d'IL, AA et 100 μ g/mL Link-N (concentration optimale basée sur les résultats de l'article 2)

Tous les milieux ont été complétés avec 10% de FBS et 1% de pénicilline-streptomycine.

6.2.3 Résultats et discussion

Les résultats présentés sur la Figure 6.1A montrent que les MSC produisent des GAG dans le milieu α -mem qui ne contient aucun constituant pouvant stimuler cette production. Ceci suggère que l'environnement 3D du gel de chitosane stimulerait une certaine forme de différenciation chondrogénique comme précédemment montré par les résultats de Richardson (Richardson et al., 2008). La production de GAG est similaire dans le milieu dégénératif (DM) complété avec l'IL avec ou sans l'acide ascorbique. De façon intéressante, la quantité de GAG

obtenue dans le milieu dégénératif en présence du Link N est significativement plus importante comparativement aux autres conditions. Ce qui confirme encore une fois la capacité du Link N à stimuler les cellules à produire plus de GAG. Ces résultats sont similaires quand on normalise la quantité de GAG par l'ADN (Figure 6.1B).

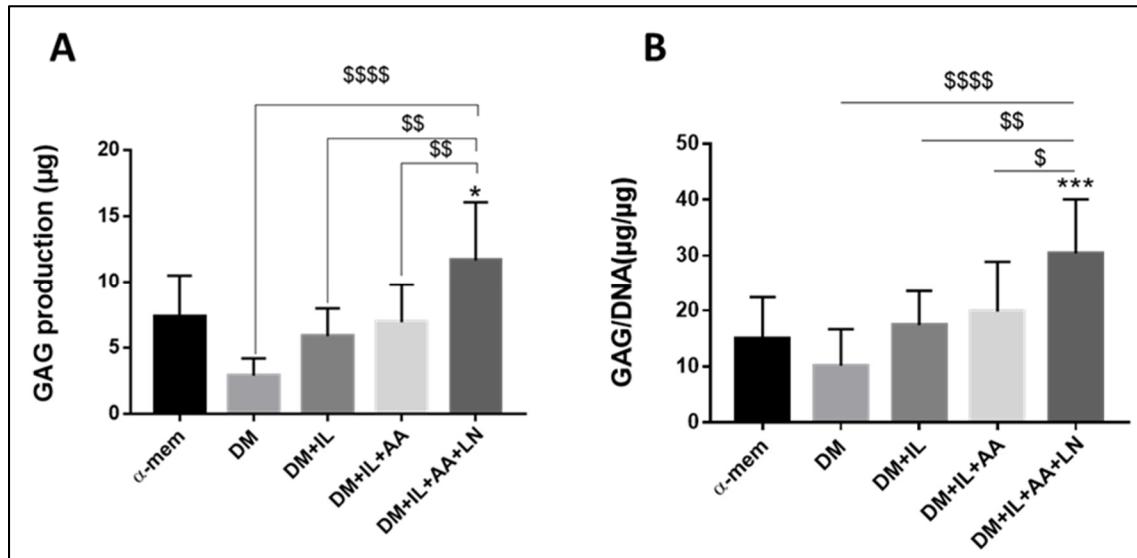


Figure 6.1 Le Link N stimule une production plus accrue de GAG par les MSC dans le milieu dégénératif. Les MSC ont été encapsulées dans le gel de chitosane et cultivées dans différents milieux pendant 14 jours. A) La quantité totale de GAG produite a été évaluée par le test de DMMB B) La quantité de GAG normalisée à celle de l'ADN a été obtenue en divisant la quantité de GAG par la quantité d'ADN (évalué par le test de PicoGreen). Les données sont montrées en tant que moyenne \pm écart-type, n=7-10
\$ \$p<0.01, \$\$\$\$ p<0.0001 comparativement à la condition avec le Link N, *p<0.05,
***p<0.0001 comparativement à la condition $\alpha\text{-mem}$

Malgré la production intéressante de GAG, les résultats de test de viabilité (Figure 6.2) montrent que les MSC encapsulées dans le gel de chitosane présentent une viabilité relativement faible dans tous les milieux de culture étudiés. En effet, le taux de viabilité s'établit à 90% pour toutes les conditions après la première journée de culture et baisse à 40% après 7 jours et baisse encore davantage à 14 jours. Cependant, les MSC cultivées en 2D avec les mêmes milieux de culture montrent une viabilité à presque 100% après 7 jours. Nous avons

donc procédé à une investigation afin de comprendre cette mortalité des MSC dans les gels de chitosane. Les démarches et les résultats sont présentés dans la section suivante.

6.3 Comment peut-on améliorer la viabilité des cellules MSC dans les gels de chitosane

Comme montré dans la section précédente, les MSC produisent une quantité significativement plus élevée de GAG dans le milieu dégénératif en présence du Link N comparativement au milieu de culture classique (α -mem). Cependant, le pourcentage de viabilité de ces cellules dans les gels demeure sous optimale. Plusieurs stratégies ont été explorées afin de comprendre et d'améliorer cette viabilité des MSC encapsulées : 1) l'effet des produits de relargage du gel, 2) l'effet de la méthode d'encapsulation, 3) l'impact du milieu de culture utilisé.

6.3.1 Est-ce que le gel relargue des produits nocifs pour les MSC ?

6.3.1.1 Contexte et objectif

Notre équipe a démontré que les gels de chitosane permettent une viabilité cellulaire intéressante pour différents types cellulaires tels que les NP (Adoungotchodo, Epure, Mwale, & Lerouge, 2021), les fibroblastes (Alinejad et al., 2018; Ceccaldi et al., 2017) et les lymphocytes (Monette et al., 2016) démontrant que l'environnement des gels ou les produits qu'ils relarguent ne sont pas toxiques pour les cellules en général. En revanche, la viabilité est faible pour les MSC. Dans cette section, nous avons évalué si les produits de relargages du gel pourraient expliquer la faible viabilité des MSC observée dans le milieu dégénératif, par le biais de tests en cytotoxicité indirecte et directe.

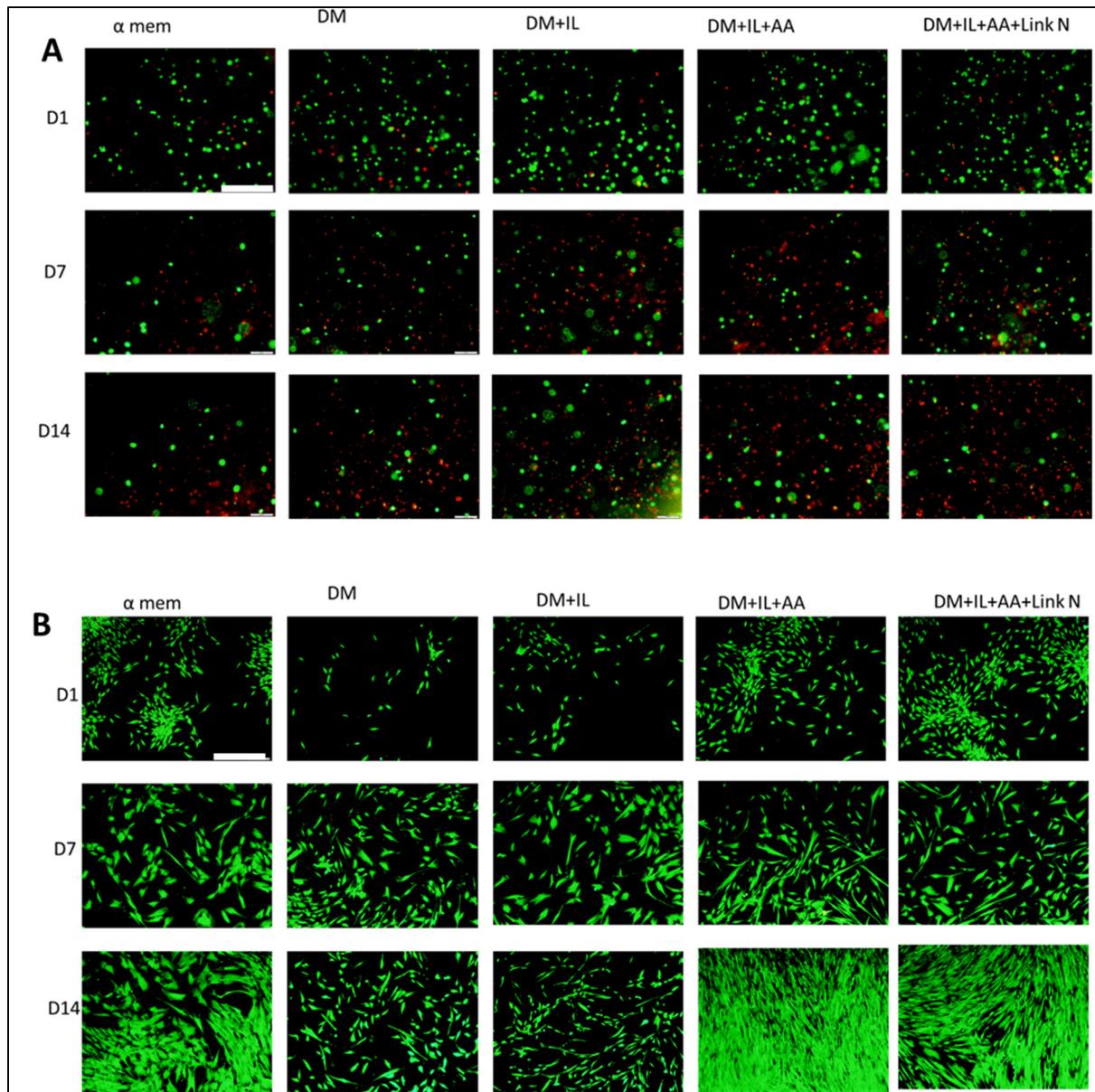


Figure 6.2 Les MSC encapsulées dans les gels de chitosane présentent une viabilité relativement faible. Les MSC sont A) encapsulées dans le gel de chitosane ou B) cultivées en 2D dans différents milieux. La viabilité des cellules a été évaluée par Live/Dead après 1, 7 ou 14 jours de culture. La barre d'échelle représente 200 μ m. Les cellules vivantes sont en vert et les mortes en rouge

6.3.1.2 Méthodologie

Cytotoxicité indirecte

Des gels de chitosane ont été préparés et immersés dans du milieu dégénératif avec 10% de FBS (200µl de gel pour 500µl de milieu). Le milieu de culture a été retiré après 24h ou 3 jours de culture et des cellules MSC adhérentes sur des pétris en 2D ont été incubées avec le milieu conditionné pendant 24h ou 3 jours. La viabilité a été testée par Live/Dead, comparativement à du milieu similaire non conditionné.

Cytotoxicité directe

La mortalité des MSC encapsulées dans le gel pourrait s'expliquer par une accumulation des produits relargués dans le milieu de culture dans lequel elles sont incubées, par manque de nutriment ou une trop faible porosité des gels. En effet le premier changement de milieu se fait habituellement après 3 jours de culture. Pour éliminer cette hypothèse, la viabilité cellulaire a été évaluée en procédant à un changement de milieu chaque jour durant les 5 premiers de culture. La viabilité a été évaluée après 24h et 7 jours de culture.

6.3.1.3 Résultats et discussion

Les résultats de cytotoxicité indirecte (Figure 6.3) montrent que les cellules cultivées en 2D avec le milieu incubé avec le gel pendant 24h ou 3 jours montrent une excellente viabilité cellulaire (aucune cellule morte) et confirme donc que le gel ne relargue rien de toxique pour les MSC.

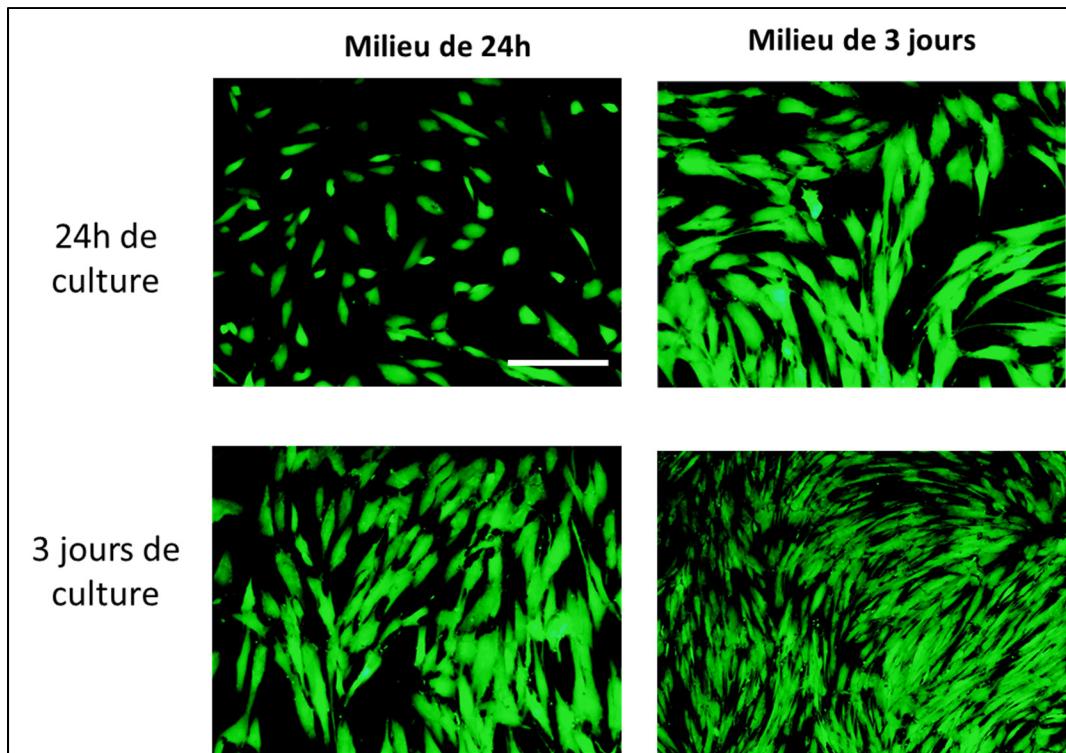


Figure 6.3 Les MSC cultivés en 2D avec des milieux incubés avec le gel présentent une excellente viabilité. Les MSC ont été cultivées pendant 24h ou 3 jours avec le milieu incubé avec le gel pendant 24h (gauche) ou 3jours (droite). La barre d'échelle représente 200 μ m. Les cellules vivantes sont en vert et les mortes en rouge

Cependant, la viabilité des MSC encapsulées dans le gel demeure faible malgré un changement de milieu quotidien (Figure 6.4). La faible viabilité n'est donc pas due à une accumulation de composants nocifs pour les cellules.

6.3.2 Est-ce que la méthode de culture serait trop restrictive pour les MSC ?

6.3.2.1 Contexte

Pour tous les tests de culture cellulaire, 500 μ l de milieu ont été utilisés pour 200 μ l de gel contenant 200 000 cellules dans des puits d'une plaque de 48 puits, de façon statique. Cette

méthode de culture peut limiter la diffusion et la quantité des nutriments présents dans le gel et disponible pour les cellules. Une autre méthode moins restrictive a donc été évaluée.

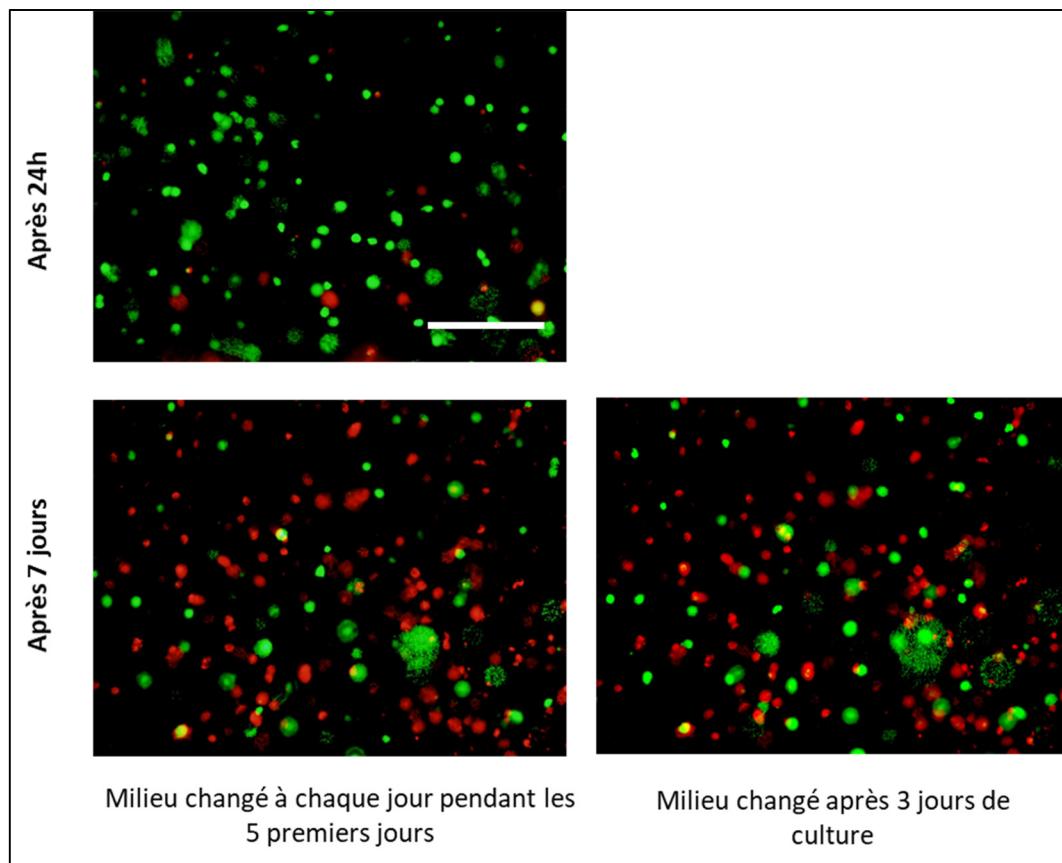


Figure 6.4 Les MSC présentent une faible viabilité dans le gel malgré un changement de milieu plus fréquent. La barre d'échelle représente 400 μ m. Les cellules vivantes sont en vert et les mortes en rouge

6.3.2.2 Méthodologie

Les MSC ont été encapsulées dans le gel de chitosane à 1.5 et 2% de chitosane et cultivées dans des plaques de 24 ou 48 trous. La surface d'un trou est de 1,82cm² pour la plaque de 24 trous et de 0.64cm² pour la plaque de 48 trous. 500 μ L de milieu ont été ajoutés au gel pour les plaques de 48 trous et 2mL par trou pour les plaques de 24 trous. Les cellules dans les plaques de 24 trous ont donc une surface de diffusion plus élevée et une quantité de nutriments plus

importante. La quantité de chitosane a été diminuée afin d'évaluer si le gel était trop dense et donc potentiellement avec une porosité réduite.

6.3.2.3 Résultats et discussion

Les résultats présentés sur la Figure 6.5 montrent que la viabilité est toujours inférieure à 50% malgré la diminution de la concentration de chitosane, l'augmentation de la quantité et la diffusion des nutriments. La mortalité observée n'est donc probablement pas due à un manque de diffusion des nutriments ou de porosité. Le problème pourrait donc provenir plutôt d'un manque de motifs d'adhésion cellulaire dans le gel ou du milieu utilisé (milieu dégénératif +10% FBS) qui bien que non problématique pour la culture 2D pourrait ne pas être favorable pour la survie des MSC dans une culture 3D. Nous avons donc évalué d'une part l'impact de l'ajout de la gélatine connue pour améliorer l'adhésion cellulaire et d'autre part l'effet d'un milieu commercial réputé efficace pour la survie et la prolifération des MSC.

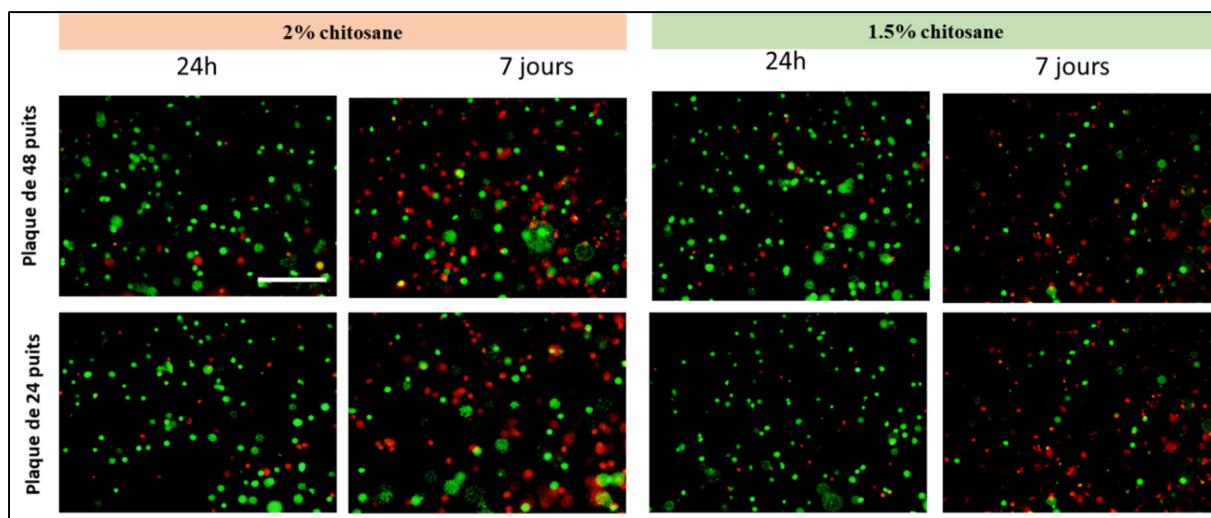


Figure 6.5 Les MSC présentent une faible viabilité cellulaire indépendamment de la concentration de chitosane dans le gel, la quantité de milieux et la surface de culture utilisés. Les MSC ont été encapsulées dans le gel de chitosane avec 1.5 ou 2% de chitosane et cultivées dans des puits de plaque de 24 ou 48 puits avec 2 ou 0.5mL de milieu dégénératif (+10% FBS) respectivement. La barre d'échelle représente 400µm.
Les cellules vivantes sont en vert et les mortes en rouge

6.3.3 Effet de l'ajout de la gélatine sur la viabilité des MSC

6.3.3.1 Contexte

Comme montré dans le chapitre 4 (article 2) l'ajout de la gélatine améliore l'adhésion cellulaire des cellules NP dans les gels de chitosane. Les MSC présentent une meilleure viabilité et prolifération quand elles sont cultivées sur des substrats leur permettant une bonne adhésion (Gustafsson et al., 2012). Nous avons donc posé l'hypothèse selon laquelle l'ajout de la gélatine pourrait améliorer l'adhésion des MSC dans le gel et donc possiblement leur viabilité.

6.3.3.2 Méthodologie

Les MSC ont été encapsulées dans le gel de chitosane avec 1% de gélatine A et cultivées dans le milieu dégénératif. Un gel constitué uniquement de collagène (PureCol) a été utilisé comme contrôle. Ce gel de collagène (5mg/mL) présente des propriétés mécaniques beaucoup plus faibles que le gel de chitosane et a été utilisé afin d'évaluer le comportement des MSC dans un gel qui contient uniquement des molécules adhésives, le collagène dans ce cas.

6.3.3.3 Résultats et discussions

Les résultats présentés sur la Figure 6.6 montrent que l'ajout de la gélatine n'améliore pas la viabilité des MSC. Il faut également noter que les cellules ont gardé leur forme ronde dans le gel de chitosane /gélatine alors qu'elles présentent une forme allongée après 7 jours de culture dans le gel de collagène où la viabilité est très élevée. Ces résultats confirment en effet l'importance des structures adhésives pour la viabilité des MSC. Il faut mentionner que des études antérieures ont évalué la possibilité de former en gel en associant le gel de chitosane et le gel de collagène. Les résultats (non publiés) ont montré que cette association faisait baisser significativement les propriétés mécaniques du gel sans aucun impact significatif sur la viabilité cellulaire.

De plus, l'augmentation du ratio collagène/protéoglycane est un marqueur de la dégénérescence du disque. Il serait donc contreproductif de former un gel avec du collagène pour le NP. Ceci conduirait systématiquement à une augmentation du taux de collagène dans le tissu.

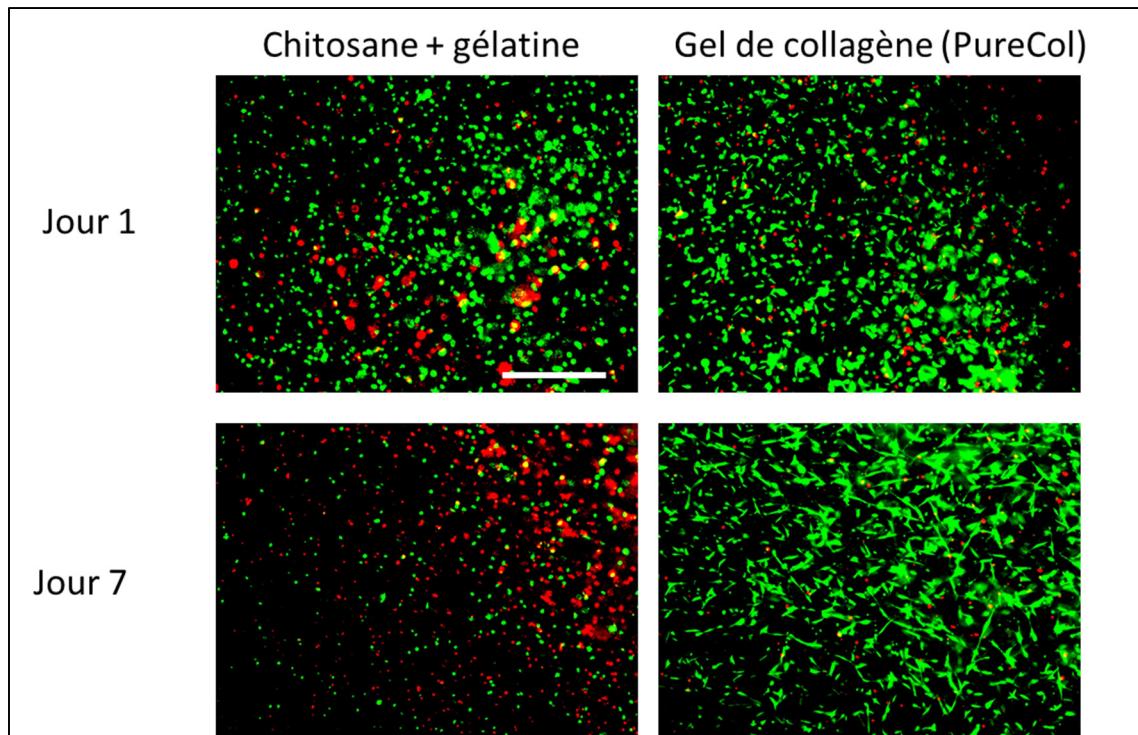


Figure 6.6 Les MSC présentent une meilleure viabilité quand elles sont encapsulées dans un gel de collagène comparativement à quand elles le sont dans un gel de chitosane/gélatine. La barre d'échelle représente 200 μ m

6.3.4 Milieu de culture optimale pour la culture 3D des MSC

6.3.4.1 Contexte

Les résultats précédents montrent que la densité du chitosane, les produits potentiellement relargués par le gel, le ratio volumique hydrogel/milieu de culture et la surface de culture ne sont pas responsables de la faible viabilité des MSC dans le gel cultivé dans le milieu

dégénératif. Cependant, il est précoce d'affirmer d'emblée que le gel de chitosane n'est pas approprié pour la survie des MSC. Une dernière étape de cette étude a été faite en cultivant les gels dans un milieu commercial conçu pour permettre une très bonne viabilité et prolifération des MSC. C'est ce milieu qui est utilisé d'ailleurs pour expandre rapidement les MSC avant les étapes d'encapsulation. Ce milieu, est un milieu avec une formulation exacte, sans sérum et commercialisé par Biological Industries. La composition exacte n'est pas publiée et la compagnie n'a pas voulu nous donner une idée générale du contenu de leur produit malgré notre insistance. Le milieu est vendu en kit comprenant un milieu basal sans sérum (MSC NutriStem® XFBasal Medium, 05-200-1) et un supplément (MSC NutriStem® Supplement Mix, 05-201-1).

6.3.4.2 Méthodologie

Les cellules ont été encapsulées dans le gel de chitosane et cultivées dans le milieu dégénératif avec du FBS ou dans le milieu NutriStem® pendant 1 ou 7 jours. La viabilité a été évaluée par Live/Dead.

6.3.4.3 Résultats et discussions

Les résultats présentés sur la Figure 6.7 montrent que les cellules présentent une très bonne viabilité ($>80\%$) au jour 1 dans les deux milieux, mais la viabilité baisse à 40% pour le milieu dégénératif et à 77% pour le NutriStem®. Ce dernier assure donc une meilleure viabilité pour les cellules en 3D. Malgré le manque de structures adhésives, il est donc possible d'avoir une bonne viabilité des MSC dans le gel de chitosane. Il faut mentionner que les cellules ont gardé leur forme ronde dans le milieu commercial, donc l'amélioration de la viabilité dans ce milieu n'est pas due à une amélioration des propriétés adhésives.

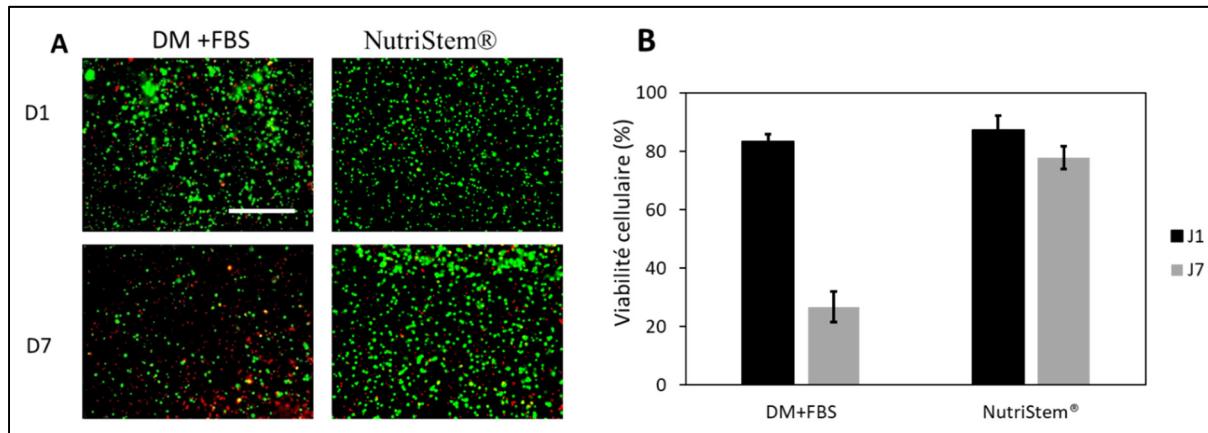


Figure 6.7 Les MSC encapsulées dans le gel présente une meilleure viabilité dans le milieu NutriStem® Les MSC humaines encapsulées dans le gel de chitosane 2% SHC0.0075MBGP0.1M. A) La viabilité a été évaluée par live/Dead et le B) taux de viabilité a été calculée en faisant le ratio entre les cellules vivantes (vertes) et le nombre total de cellules. Les cellules mortes sont représentées par les points rouges. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type, n=4. La barre d'échelle représente 200 μ m

CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE

La thérapie cellulaire est une approche prometteuse pour restaurer les propriétés biomécaniques du DIV, mais nécessite des matrices injectables permettant d'augmenter la rétention, la survie et l'activité de synthèse des cellules et d'apporter un soutien mécanique durant la régénération (Panebianco et al., 2020). Ces matrices qui sont généralement des hydrogels injectables doivent alors présenter des propriétés mécaniques adéquates tout en procurant aux cellules encapsulées un environnement approprié pour leur rétention, survie et production de matrice extracellulaire. L'objectif de cette thèse était donc de mettre au point un hydrogel bioactif injectable qui permettra la restauration des propriétés mécaniques du NP dégénéré tout en stimulant la production de matrice extracellulaire nécessaire pour l'obtention d'un néotissu fonctionnel.

Le premier objectif principal de cette thèse était d'évaluer et sélectionner les meilleures formulations d'hydrogels de chitosane injectables et évaluer leur potentiel pour la régénération du NP. À cet effet, un hydrogel physique de chitosane thermosensible a été mis au point et évalué. Les résultats résumés dans l'article 1 montrent qu'en variant les agents gélifiants (SHC, BGP et PB) et leur concentration, il est possible de créer une formulation (CH2%, SHC0.075M BGP0.1M) qui présente une gélification rapide et des propriétés mécaniques proches de celles du NP humain en compression et en torsion (après complète gélification). De plus, les cellules NP encapsulées sont en mesure de survivre à plus de 80% après quatorze jours de culture et de produire des protéoglycans, les composantes les plus importantes pour le maintien des propriétés en compression du disque.

Le second objectif principal était de mettre au point des stratégies pour augmenter l'activité de synthèse des cellules du NP encapsulées dans les gels de chitosane, notamment la production de protéoglycans. Cet objectif a pu être atteint avec la gélatine et le Link N. En effet, tel que

montré dans l'article 2, l'ajout de la gélatine dans le gel de chitosane et l'ajout du Link N dans le milieu de culture permettent de stimuler une production plus importante de protéoglycanes tout en préservant les propriétés mécaniques du gel.

En vue d'une caractérisation dans des conditions plus proches des conditions physiologiques, le troisième objectif du projet était : 1) d'évaluer les paramètres pouvant induire de la variabilité pour les résultats de tests mécaniques effectués sur des modèles de disque bovins et 2) comment en tenir compte afin d'évaluer de façon fiable l'effet d'un modèle de dégénérescence et éventuellement l'efficacité du gel à restaurer les propriétés mécaniques du disque. En effet, nous avons démontré qu'uniquement les premiers niveaux vertébraux (Cd1-Cd2 et Cd2-Cd3) présentaient des propriétés mécaniques similaires en compression. De plus, le stockage des échantillons sur plusieurs jours induisait une dégénération naturelle des tissus et une modification des propriétés du disque dans des tests de mobilité.

Afin de prouver le potentiel de transfert clinique de la technologie, le comportement des MSC encapsulées dans le gel a été évalué. Nous avons montré que la présence du Link N stimule une production plus accrue de protéoglycanes par les MSC encapsulées. Cependant ces cellules présentent une viabilité relativement faible étant donnée le manque de motifs d'adhésion cellulaire dans le gel de chitosane.

Les avantages et limites de notre solution sur les plans mécaniques et de biocompatibilité au regard des objectifs et de l'état de l'art seront discutés dans les sections suivantes. Les recommandations pour la suite du projet seront aussi exposées.

7.1 Des propriétés mécaniques proches de celles du NP

Les altérations biochimiques qui surviennent lors du processus de dégénérescence du disque induisent d'importantes modifications au niveau des propriétés biomécaniques du tissu notamment en compression et en cisaillement (Inoue & Oriás, 2011). Plus la dégénérescence évolue, moins le disque résiste aux contraintes et sa hauteur diminue (Urban & Roberts, 1995).

Il est donc important que la matrice injectable possède des propriétés mécaniques similaires au tissu natif afin de pouvoir restaurer, au moins temporairement, ses propriétés mécaniques. Dans le cadre de nos travaux, nous avons comparé essentiellement les propriétés mécaniques des hydrogels à celles du NP en compression et en cisaillement. Il faut rappeler que la technologie vise le NP, la partie centrale et gélatineuse du disque étant donné que la dégénérescence commence à ce niveau.

Le gel physique présente des propriétés mécaniques en compression non confinée et en cisaillement proches de celles du NP humain

Les résultats présentés dans l'article 1 montrent que la formulation sectionnée présente des propriétés mécaniques en compression non confinée proches de celles du NP humain. Le module d'équilibre dans un test de relaxation en compression non confinée de notre matrice est de 7.65 ± 0.82 kPa alors que celui du NP est de 6.1 ± 1.7 kPa. De plus, le module complexe en cisaillement est de 12 à 13 kPa (selon la fréquence de déformation) pour le gel et se situe entre 7 et 21 kPa pour le NP humain (Iatridis et al., 1997). Aux meilleures de nos connaissances, **c'est le tout premier gel physique qui présente des propriétés similaires au NP humain en compression et en cisaillement.**

En effet, parmi les hydrogels physiques que nous avons présentés dans la revue de littérature, aucun ne présente des propriétés mécaniques aussi élevées. Ce sont uniquement quelques formulations de gels chimiques qui présentent des performances mécaniques intéressantes. On peut citer entre autres le gel de chitosane/dextrane/teleostean de Smith et al. qui présente un module d'équilibre en compression de 9.48 ± 2.06 kPa (Smith et al., 2014) et un gel de carboxyméthylcellulose avec un module d'équilibre entre 8 et 16 kPa (Varma et al., 2018). Plusieurs autres gels chimiques sont présentés par leurs auteurs comme possédant des propriétés mécaniques similaires au NP, cependant, il est difficile de comparer les performances mécaniques de ces formulations à la nôtre à cause des différences dans les protocoles de caractérisation (Gan et al., 2017; Sivan et al., 2014; Vernengo et al., 2008; Wiltsey et al., 2013). En effet, la nature viscoélastique du disque, du NP en particulier, fait en sorte que les paramètres mécaniques obtenus varient beaucoup selon le type de test, les

conditions du test, la vitesse de déformation... Il serait donc important de trouver un consensus au sens de la communauté scientifique pour définir un test standard permettant de comparer les études les unes aux autres.

Il faut rappeler que l'un des avantages de notre gel physique comparativement aux gels chimiques est la simplicité de sa production. En effet, comme mentionné dans l'état de l'art les gels chimiques qui présentent pour la plupart de bonnes propriétés mécaniques utilisent des modifications et procédés chimiques complexes susceptibles de constituer un frein pour leur utilisation dans un contexte clinique (Chou et al., 2009).

L'AF crée un environnement confiné autour du NP

En dehors de la compression non confinée et la torsion, certaines études caractérisent également les propriétés du NP en compression confinée (Johannessen & Elliott, 2005; Périé, Korda, & Iatridis, 2005; Smith et al., 2014) pour mimer les conditions du NP qui est au centre du disque et entouré de l'AF, qui est plus rigide. Nous n'avons pas évalué le comportement mécanique des formulations en compression confinée pour plusieurs raisons. Tout d'abord parce qu'un test de compression purement confinée ne nous semblait pas bien reproduire l'état de confinement du NP qui est partiel puisque l'AF est plus rigide que le NP, mais se déforme tout de même. Nous avons donc cherché à évaluer le gel dans un système qui mime davantage le confinement partiel et la complexité géométrique et de composition des disques intervertébraux, c'est-à-dire dans un modèle *ex vivo* de disques dégénérés. Un tel modèle nous semble plus approprié pour vérifier si l'hydrogel permet de restaurer les propriétés mécaniques des disques.

Caractériser la performance mécanique des gels dans des modèles *ex vivo*

C'est dans cet objectif que les travaux de l'article 3 ont été effectués, afin d'évaluer si les disques bovins et la dégénérescence avec la papaïne pourraient être utilisés pour évaluer la performance mécanique des matrices. Malheureusement, la solution de papaïne injectée dans le NP pour créer de la dégénérescence diffusait aussi dans l'AF et rendait difficile l'évaluation de la capacité du gel à restaurer les propriétés mécaniques du NP. De plus, l'ebselen qui devait

stopper la papaïne ne fonctionnait pas comme prévu selon les résultats de nos tests de mobilité (flexion et extension). La dégénérescence continuait dans le temps et la présence de la papaïne pouvait compromettre l'injection du gel étant donné que c'est une enzyme qui digère également le chitosane. Pour ces raisons, nous n'avons pas pu finalement étudier le comportement mécanique du gel dans les disques dégénérés. Néanmoins, les travaux *ex vivo* nous ont permis de mettre en place un protocole pour continuer ces caractérisations dans les prochaines étapes du projet.

Dans les travaux présentés dans l'article 3, **nous avons mis en évidence pour la première fois comment les niveaux vertébraux, les conditions et les protocoles de tests pourraient affecter les conclusions sur l'impact d'un modèle de dégénérescence enzymatique sur les propriétés mécaniques du disque et potentiellement donc la capacité d'un hydrogel à restaurer ces propriétés.** En effet, il a été démontré que même si les disques caudaux bovins sont intéressants pour tester la capacité d'un hydrogel à restaurer les propriétés mécaniques d'un disque dégénéré, il existe des variabilités dues aux niveaux vertébraux des échantillons utilisés, aux conditions de test ainsi que la dégénérescence naturelle du tissu qui pourraient affecter l'interprétation des résultats. Nous avons remarqué à travers les tests de compression non confinée que les propriétés mécaniques des disques variaient selon les niveaux vertébraux. Sur les disques d'une queue, seuls les deux premiers (Cd1-Cd2 et Cd2-Cd3) présentaient des propriétés mécaniques proches et pouvaient donc être considérés comme pareils pour former les groupes de tests. Ce qui nous a permis de valider l'effet de la papaïne sur les propriétés en compression du tissu.

Une autre conclusion importante de cet article provient des résultats des tests en flexion/extension qui démontraient que le tissu subit également de la dégénérescence naturelle dans le temps compte tenu du fait qu'il n'était plus vivant. Ce qui fait en sorte qu'il est nécessaire d'avoir un groupe contrôle sans aucun traitement, stocké dans les mêmes conditions que le groupe traité si le protocole de test devait se faire sur plusieurs jours.

Recommandations pour évaluer de façon fiable les propriétés mécaniques de disques bovins dans des tests *ex vivo* :

- Utiliser les niveaux vertébraux Cd1-Cd2 et Cd2-Cd3 pour les tests de compression
- Évaluer et sélectionner la concentration optimale d'ebselen à injecter pour stopper l'effet de la papaïne
- Évaluer la concentration, le volume de la solution de papaïne et le temps d'incubation optimal pour limiter la diffusion de l'enzyme vers l'AF
- Utiliser les tissus frais (obtenus quelques heures après l'abattage) pour limiter l'effet de la dégradation du tissu et l'altération de leurs propriétés mécaniques lors de la congélation

Une autre manière de réaliser ces caractérisations serait de concevoir des modèles de disque par impression 3D par exemple afin de répliquer les propriétés mécaniques du tissu vivant dans son état normal et/ou dégénéré. Ainsi, les variabilités entre les échantillons seraient minimisées et rendraient donc les tests mécaniques évaluant la capacité des hydrogels à restaurer les propriétés mécaniques du disque plus fiables.

Étant donné que les disques caudaux bovins ne sont pas soumis aux mêmes contraintes mécaniques que les disques humains, il est important de mentionner que ce modèle animal ne représente pas parfaitement les mêmes caractéristiques que les disques humains. L'extrapolation des conclusions obtenues avec le modèle de disques bovins aux disques humains doit être fait avec précaution.

Les hydrogels doivent être évalués dans un test de fatigue

Pour conclure quant à la similarité du gel avec le disque, il serait également nécessaire d'effectuer des essais cycliques. En effet, une caractéristique importante du DIV est sa capacité à subir de façon répétée des déformations dans le temps. Il est donc important que la matrice qui a pour but de le renforcer mécaniquement soit capable de résister à des tests de fatigue.

Tel que présenté dans la revue de littératures, il serait intéressant d'évaluer également les propriétés viscoélastiques et poro-élastiques du gel telles que la perméabilité, la pression de gonflement et le module d'agrégat et les comparer à celles du NP (Recuerda, Coté, Villemure, & Périé, 2011).

Des tests cycliques en contrôlant la contrainte

Wilke et al., dans un test *in vivo* sur un sujet humain vivant, ont mesuré la pression dans le disque durant différentes activités quotidiennes en introduisant un capteur de pression dans le NP du disque lombaire L4-L5. Ils ont ainsi pu mesurer la pression dans le NP qui varie entre 0.53 et 0.65MPa durant la marche par exemple (Wilke, Neef, Caimi, Hoogland, & Claes, 1999). Certaines études considèrent ces données comme des valeurs de compression en les utilisant comme amplitudes de contrainte dans des tests cycliques sur le disque (Smith et al., 2014; Thorpe et al., 2017). Par exemple, Thorpe et al. ont évalué la capacité d'un gel à restaurer des propriétés du disque en effectuant des tests cycliques entre 0.53 et 0.65MPa à 2Hz pendant 100s (Thorpe et al., 2017). Étant donné que ces mesures prennent aussi en compte l'apport mécanique de l'AF il nous a été impossible de réaliser ce test sur notre matrice seule dont la contrainte de rupture est autour de 100 kPa. Aucune des matrices chimiques avec des propriétés mécaniques similaires à notre gel n'ont effectué des tests de fatigue sur leur matrice séparément.

Des tests de fatigue dans des modèles de disques *ex vivo* sont donc nécessaires pour tester de façon plus réaliste le comportement sous chargements cycliques des gels. Afin de définir le nombre de cycles nécessaires, on peut se servir des travaux de Kostuik qui estiment que le disque subit 2 millions de cycles par an (Kostuik, 1997). On pourrait s'en tenir à un nombre de cycles réduits, 10 000 par exemple, selon les travaux de Smith et al. (Smith et al., 2014) afin d'estimer le comportement du disque dans le temps.

Recommandations pour les tests de fatigue dans un modèle *ex vivo*

- Injecter le gel dans un modèle de disque dégénéré

- Appliquer un test de compression cyclique entre 0.53 et 0.65MPa à une fréquence de 2Hz pendant 10 000 cycles
- Mesurer la pression intra-discale à l'aide d'un capteur de pression dans le NP

Des tests cycliques en contrôlant la déformation : le gel manque d'élasticité

Une autre possibilité pour évaluer le comportement des gels sous chargement cyclique consiste à imposer des déformations cycliques. La déformation approximative que le disque subit sous certaines conditions physiologiques a été évaluée à 15% (Joshi et al., 2006). Des tests de compression cycliques ont donc été effectués et les résultats ont montré que la formulation sélectionnée résistait aux tests cycliques, en ce sens où le gel ne rompt pas après 50 cycles de compression (voir Figure 7.1A). Cependant, l'échantillon subit graduellement une perte d'eau et donc de hauteur à chaque cycle de déformation et met donc en évidence le manque d'élasticité de nos formulations d'hydrogels de chitosane (Figure 7.1B).

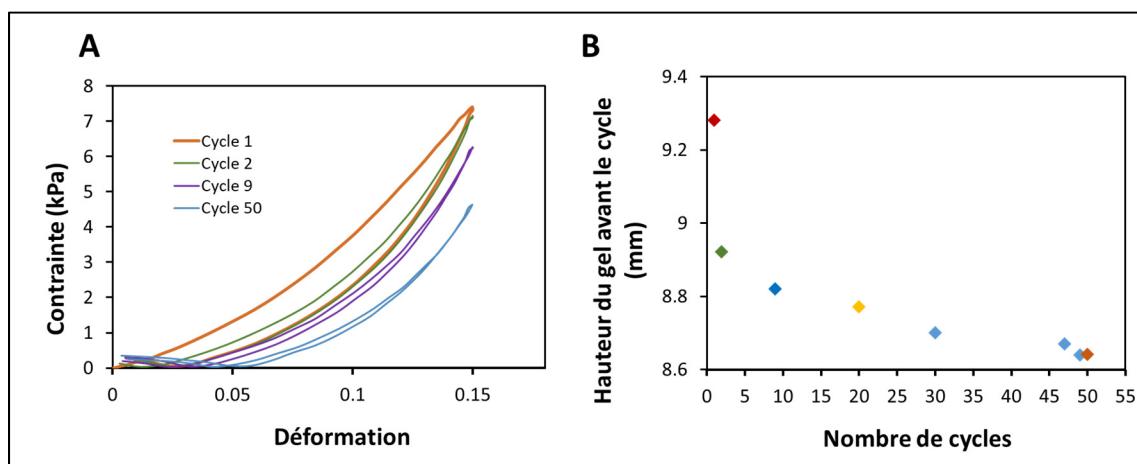


Figure 7.1 Tests de compression cycliques sur la formulation optimale (SGC0.075BGP0.1M). Le gel a été préparé et incubé à 37°C pendant 24h. 50 cycles à une amplitude de 15% de déformation ont été appliqués aux échantillons à une fréquence de 0.2 Hz. A) Courbes de contrainte et déformation de quelques cycle B) Hauteur du gel au début du cycle de compression, n=2

L'élasticité du gel (Gan et al., 2017; Sperling, 1994) pourrait être améliorée si on y ajoutait un second réseau polymérique présentant plus d'élasticité. La littérature a montré que ces réseaux

interpénétrés (IPN) permettaient d'augmenter les propriétés mécaniques des hydrogels de façon générale (Zoratto & Matricardi, 2018). Il existe diverses possibles façons de créer un réseau interpénétrant le réseau physique de chitosane. Nous avons donc essayé de former un IPN en rajoutant un gel de gélatine réticulé de façon covalente grâce à la transglutaminase (GelT). Nous avons choisi ce gel chimique compte tenu de ses composants biocompatibles et l'absence de modification chimique nécessaire (Babin & Dickinson, 2001; Gupta, Santoso, & McCain, 2021). Les gels provenant d'un mélange des deux systèmes ont été comparés à ceux du GelT seule (à 10% w/v) ou du chitosane seul (2%w/v) comme contrôle. Nos résultats en compression non confinée montrent que le Gel T présente des propriétés mécaniques intéressantes. En revanche, la combinaison des deux gels selon différents ratios donne un gel avec des propriétés mécaniques plus faibles que les deux réseaux indépendamment. Ceci suggère que des interactions entre les différents composants du gel ou un encombrement stérique empêchent de former deux réseaux indépendants (Figure 7.2).

Néanmoins, il serait intéressant de poursuivre les investigations avec ce gel, en ce sens où les résultats présentés dans l'article 2 montrent que l'ajout de la gélatine au gel de chitosane améliore ses propriétés mécaniques. En effet, dans les travaux de cet article, le chitosane a été dissout avec la gélatine avant d'être incorporé à l'agent gélifiant. Il faudrait donc évaluer si l'ajout de la transglutaminase à l'agent gélifiant avant le mélange avec l'ensemble chitosane et gélatine pourrait aider à avoir un meilleur gel en termes de résistance mécanique et d'élasticité.

Tests *in vivo* pour la caractérisation mécanique du gel de chitosane

Il est important de mentionner que la meilleure manière de tester la performance de ces gels est de l'évaluer à travers des tests *in vivo* avec des animaux. Ces modèles permettent d'évaluer le comportement du disque dans des conditions physiologiques plus réalistes et exemptes d'approximation. Ces tests étaient prévus en collaboration avec un autre institut, mais la pandémie Covid19 les en a malheureusement empêchés.

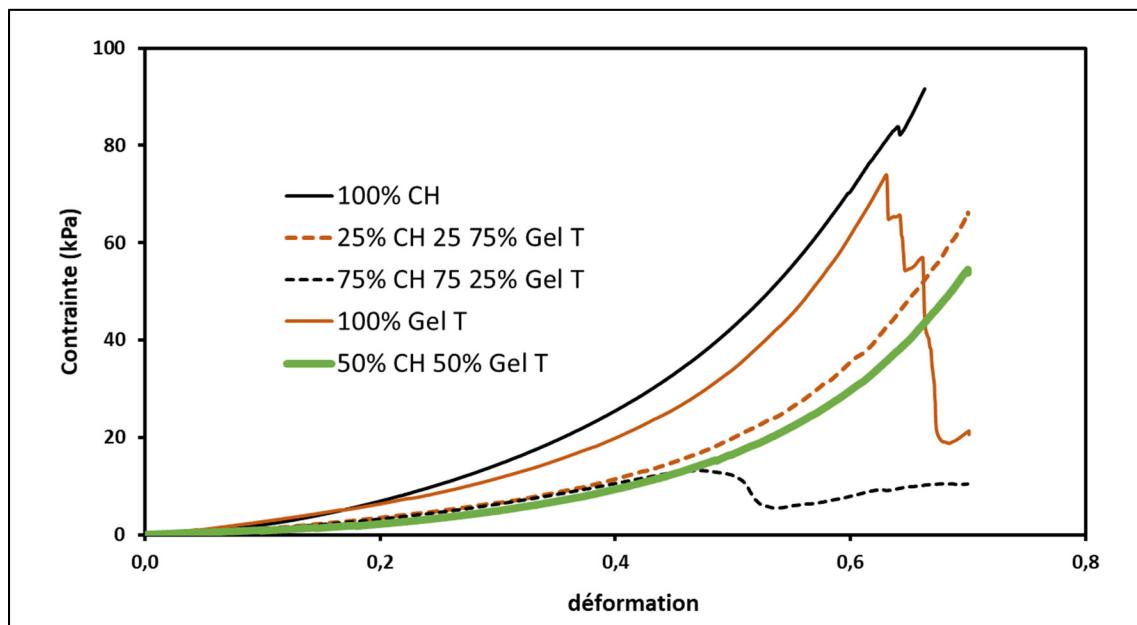


Figure 7.2 Tests de compression non confinée des gels obtenus en combinant le gel de chitosane (CH) et le gel de gélatine réticulé en présence de transglutaminase (Gel T).

Les deux gels ont été produits séparément et mixés ensuite à différents ratios volumiques. Le Gel T a été produit en mixant de la gélatine A à 10% w/v avec la transglutaminase (10U/mL) à un ratio de 10U d'enzyme par gramme de gélatine. Le gel de CH contient 2% de CH 75mM SHC et 100mM BGP. Chaque échantillon a été incubé à 37°C pendant 24h et un test de compression non confinée a été effectué (70% de déformation à une vitesse de 100%/min)

Lotz et al, ont publié une revue des modèles animaux pour la dégénération du (Lotz, 2004). Ces modèles sont utilisés d'une part pour caractériser l'évolution de la dégénération ou pour évaluer l'efficacité d'une thérapie. Les espèces utilisées pour ces études sont généralement des lapins et des rats et quelques fois des chiens. La dégénérescence est induite selon plusieurs protocoles. On peut citer entre autres une dégénérescence mécanique qui implique des contraintes importantes sur le disque (Lindblom, 1957), la dégénérescence chimique par l'injection d'enzyme telle que la chondroïtinase (Park & Ahn, 1995) ou une dégénération survenue naturellement (Venn & Mason, 1986).

7.2 Le gel de chitosane permet une bonne viabilité pour les cellules encapsulées dans les gels de chitosane

En dehors de la restauration des propriétés mécaniques du disque, les hydrogels injectables doivent permettre l'encapsulation des cellules, leur survie, leur rétention et la production de matrice extracellulaire afin de pouvoir induire la régénération du tissu dans le temps.

Différents paramètres permettent de prévoir la capacité d'une matrice à assurer la viabilité des cellules encapsulées. En effet, l'osmolarité du milieu, le pH, l'adhésion cellulaire, la présence de glucose et la porosité de la matrice peuvent influencer significativement la survie des cellules encapsulées.

Le gel possède un pH et une osmolarité proches de ceux du NP

Bibby et al, ont montré que la viabilité des cellules du disque (NP et AF) diminue significativement lorsque le pH du milieu dans lequel elles sont cultivées passe de 7.4 (pH physiologique) à un pH acide de 6.2 (Bibby & Urban, 2004). La baisse est encore plus importante quand le milieu est dépourvu de glucose. Les travaux préliminaires à l'article 1 qui ont permis de faire une première sélection des formulations d'hydrogels ont montré que la concentration des agents gélifiants peut affecter le pH du gel. Les trois formulations qui ont été sélectionnées pour l'article présentaient donc un pH entre 6.9 et 7.16. L'encapsulation des cellules dans le gel pourrait également aider à protéger les cellules de l'environnement du disque dégénéré qui présente un pH plus acide (van Dijk et al., 2011) puisque le gel sert de protection physique aux cellules encapsulées et contient une solution tampon qui aidera à maintenir le pH stable dans le gel.

L'osmolarité est un autre paramètre pouvant affecter la survie des cellules. La plupart des cellules du corps sont en condition isotonique pour des valeurs d'osmolarité de 330mosm/Kg. Cependant, Van Dijk et al. ont montré dans une étude que les cellules NP présentent une meilleure viabilité quand elles sont cultivées dans un milieu d'osmolarité égale à 430mosm/kg (van Dijk et al., 2011). Ce point a également été pris en compte dans nos choix de formulation. La formulation sélectionnée SHC0.075MBGP0.1M, avec une osmolarité de 434mosmol/Kg,

présente une très bonne viabilité cellulaire (>80%) et surtout une meilleure activité cellulaire comparativement à la seconde meilleure formulation (SHC0.075MPB0.1M dont l'osmolarité est de 262 mosmol/Kg).

Cette observation explique aussi pourquoi la formulation ‘classique’ du gel de chitosane (BGP0.4M) présente une si faible viabilité (<20%) dans nos essais. En effet, cette formulation présente une osmolarité de plus de 800 mosmol/Kg et un pH autour de 7. Cependant, il est important de mentionner que des auteurs ont montré une bonne viabilité cellulaire avec les gels de chitosane produits uniquement avec du BGP (Cheng et al., 2010; Richardson et al., 2008; Roughley et al., 2006). Par exemple, Richardson et al. ont présenté dans leur étude qu’un gel de chitosane (3%) avec du BGP0.5M permettait aux cellules NP de survivre dans le gel à plus de 70% pendant quatre semaines. Les auteurs n’ont pas précisé les conditions de culture, mais nous pensons que la quantité de milieux ajoutés au gel ainsi que la fréquence de changement du milieu pourrait aider à maintenir les cellules vivantes malgré les caractéristiques du gel. En effet, si le ratio hydrogel/milieu de culture est important ou si le milieu est changé au début de l’incubation, l’osmolarité et le pH du gel s’équilibrent avec ceux du milieu, ce qui rend les conditions dans le gel plus adaptées pour la survie des cellules. Nous avons testé cette hypothèse en cultivant des cellules souches dans les gels BGP0.4 et en changeant le milieu de culture durant la première heure d’incubation. Les résultats ont montré que, quand le milieu est changé durant la première heure de culture, les cellules ont deux fois plus de chance de survivre.

Ces résultats mettent en lumière que les propriétés du gel, mais aussi les conditions de culture peuvent affecter la viabilité des cellules dans les tests *in vitro*. Pour nos tests de caractérisation cellulaire, nous avons opté pour des conditions de culture relativement sévères (200µL de gel pour 500µL de milieu avec un premier changement de milieu après 3jours) afin de se rapprocher des conditions *in vivo* où le disque dégénéré contient très peu d’eau et où les échanges de fluide sont moins importants. **Cet aspect constitue un avantage de plus pour la formulation sélectionnée qui malgré ces conditions de culture restrictives est en mesure d’assurer une très bonne viabilité pour les cellules NP.**

L'ajout de la gélatine au gel de chitosane améliore l'adhérence des cellules NP, mais pas leur viabilité

Les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire sont importantes pour la survie des cellules ainsi que leur activité de synthèse (Lee et al., 2015). Ces interactions permettent la transmission des signaux transmembranaires nécessaires à l'activité de synthèse des cellules. Cependant le chitosane est connu pour sa faible adhésion cellulaire (Custódio, Alves, Reis, & Mano, 2010; Huang et al., 2005) compte tenu de l'absence des domaines de liaison pour les intégrines, qui permettent la liaison entre la plupart des cellules et la matrice extracellulaire (Hynes & Zhao, 2000). Afin d'augmenter l'adhésion cellulaire et donc la viabilité cellulaire ainsi que l'activité de synthèse, nous avons ajouté de la gélatine au gel de chitosane. La gélatine contrairement au chitosane possède des domaines de liaison pour les intégrines et favorise donc significativement l'adhésion des cellules (Huang et al., 2005).

Les résultats présentés dans l'article 2 montrent que la présence de la gélatine augmente l'adhésion des cellules. En effet, les cellules dans les gels de chitosane/gélatine ont une forme fusiforme contrairement à une forme ronde dans les gels de chitosane. De plus, la présence de la gélatine a permis d'augmenter significativement la production de protéoglycans et donc l'activité de synthèse des cellules.

En revanche, nous n'avons pas observé d'effet de la gélatine sur la viabilité des cellules NP dans les gels de chitosane, sans doute parce que celle-ci était déjà à plus de 90% dans le gel de chitosane. Ces résultats vont dans le même sens qu'une étude de Huang et al. qui a montré que malgré l'augmentation de l'adhérence cellulaire, la présence de la gélatine n'améliore pas la viabilité des cellules endothéliales dans les gels de chitosane (Huang et al., 2005). Cheng et al qui ont évalué la viabilité des cellules NP dans des gels de chitosane/BGP n'ont également observé aucune différence au niveau de la viabilité cellulaire en présence de la gélatine (Y.-H. Cheng et al., 2010).

7.3 Le gel procure aux cellules NP un environnement propice à la synthèse de matrice extracellulaire

Les cellules encapsulées dans le gel de chitosane doivent non seulement survivre, elles doivent également sécréter une matrice extracellulaire appropriée. Dans le cadre de cette thèse, nous avons évalué la production de matrice extracellulaire à travers la production de protéoglycans qui sont responsables de la pression osmotique du NP et des propriétés en compression du disque.

Les résultats de l'article 1, montrent que les cellules NP encapsulées dans les gels de chitosane sont capables de produire des protéoglycans. Mais la production de GAG, même pour la meilleure formulation, est relativement faible considérant les quantités *in vivo* et comparativement aux autres études. En effet, la quantité de protéoglycans (évaluée selon la quantité de GAG sulfaté) est de 33µg (par hydrogel) pour la meilleure formulation de gel de chitosane après quatorze jours de culture alors que la quantité de GAG dans un disque se situe autour de 3.1 à 4.7 mg/100mg de tissu (Alini et al., 2003). Nous avons donc évalué deux stratégies pour améliorer l'activité de synthèse des cellules dans le gel.

Le Link N et la gélatine augmentent de façon additive la production de GAG dans les gels de chitosane

Dans les travaux de l'article 2, nous avons évalué l'effet de l'ajout de la gélatine dans le gel de chitosane et du Link N dans le milieu de culture sur la production de protéoglycans par les cellules NP encapsulées.

Le Link N est un peptide naturellement présent dans le disque et les tissus cartilagineux en général. Comme mentionné dans la revue de littérature, le groupe du professeur Mwale a effectué beaucoup d'études qui ont démontré l'efficacité de ce peptide à augmenter la production de protéoglycans par les cellules du disque (Gawri et al., 2012; Mwale et al., 2011; Petit et al., 2011). En effet, le Link N restaure la capacité de synthèse de cellules du disque en inhibant les cytokines inflammatoires tels que IL-1(Alaqueel et al., 2020). Les résultats

présentés dans l'article 2 montrent en effet l'efficacité du Link N à augmenter (4.7 fois, $p<0.0001$) la sécrétion des GAG dans un milieu de culture répliquant les propriétés biochimiques du disque dégénéré. **Ce résultat en soi constitue une originalité de ce projet en ce sens où c'est la première fois que l'effet du Link N a été évalué sur des cellules encapsulées dans un gel cultivé dans un environnement similaire à celui d'un disque dégénéré.** Cette sécrétion des GAG est encore plus marquée en présence de la gélatine, ce qui nous a permis de conclure que le Link N et la gélatine ont un effet additif sur la production de GAG.

Il est important de mentionner que pour l'instant le Link N n'est pas encore intégré à la technologie. En effet, pour obtenir ces résultats, nous avons dû ajouter le Link N dans le milieu de culture et non directement dans le gel, des tests préliminaires ayant démontré que le Link N diffuse très rapidement hors du gel à cause de sa taille relativement petite. Il sera donc important de trouver des stratégies afin d'intégrer et de maintenir le Link N dans le gel. L'encapsulation du Link N dans des nanoparticules intégrées au gel constitue une avenue intéressante à explorer (Eivazzadeh-Keihan et al., 2021; Liu et al., 2007).

Toutefois, pour une application *in vivo*, même si une partie du Link N diffusait en dehors du gel, l'environnement confiné du disque le maintiendrait dans le tissu et cela pourrait stimuler les cellules résidentes du tissu à produire plus de GAG. Cette diffusion rapide *in vitro* pourrait donc être un avantage dans un contexte *in vivo*.

La quantité de GAG produite par les cellules NP demeure sous optimale

Malgré l'ajout de la gélatine et du Link N, la quantité de GAG produite par les cellules encapsulées dans les gels de chitosane demeure faible comparée à d'autres études dans la littérature. La production de GAG tourne autour de 22 μ g par μ g d'ADN dans notre étude alors qu'elle est entre 120 et 150 μ g pour les deux études utilisant des cellules NP qui ont caractérisé la matrice extracellulaire (Cheng et al., 2010; Richardson et al., 2008). Ceci pourrait s'expliquer par les différences entre les espèces d'où proviennent les cellules utilisées et la

concentration en glucose du milieu de culture utilisé. La présence de glucose à taux élevé améliore l'activité de synthèse des cellules (Bibby & Urban, 2004).

En effet, Richardson et al. ont utilisé des cellules de NP humain provenant de disques non dégénérés donc probablement de très jeunes personnes et les hydrogels (chitosane/BGP) ont été cultivés dans un milieu à taux élevé de glucose (Richardson et al., 2008). Quant à Cheng et al, ils ont utilisé des cellules de NP provenant des disques de lapins âgés de 4 mois et cultivés les hydrogels (chitosane/BGP avec ou sans gélatine) dans un milieu qui contient également un taux élevé de glucose (Cheng et al., 2010) . Dans cette thèse, les cellules NP provenaient de bœufs adultes d'environ 2 à 4 ans et étaient encapsulées dans des hydrogels cultivés dans du milieu à faible taux de glucose (1g/L). Nous avons choisi d'utiliser ces milieux à faible taux de glucose afin de se rapprocher des conditions *in vivo* où la quantité de glucose présente est faible. Nos résultats sont donc plus représentatifs de ce qui se passerait dans un contexte clinique.

Il faut également mentionner que, nos gels ont été maintenus en culture pendant 14 jours alors que pour ces études la durée de culture est de 3 à 4 semaines. Nous pensons donc qu'une période de culture plus longue permettrait aussi d'avoir une quantité plus importante de GAG.

Des stimulations mécaniques pour augmenter l'activité des cellules

Les cellules du disque produisent plus de matrice extracellulaire quand elles sont sollicitées mécaniquement (Neidlinger-Wilke et al., 2012). En effet, les stimulations mécaniques favorisent les échanges entre le tissu et le milieu environnant et donc la diffusion de nutriments et d'oxygène. Ceci nécessiterait de cultiver et stimuler mécaniquement des disques injectés du gel. Cet aspect n'était pas un objectif de ce projet puisque notre but est d'injecter le produit juste après l'encapsulation cellulaire. Mais il serait intéressant d'évaluer à l'aide d'un bioréacteur la production de protéoglycans par les cellules encapsulées dans le gel sous stimulation mécanique dans les prochaines étapes.

Caractérisation de la production de collagène

Le collagène est un autre composant important de la matrice extracellulaire du disque. En effet, le ratio entre la quantité de protéoglycans et de collagène permet de déterminer si la matrice produite est plus représentative d'un NP ou d'un tissu chondrogénique en général. En effet, la proportion de protéoglycans présente dans le NP est plus importante que celle du collagène alors que c'est l'inverse dans les tissus chondrogéniques (Mwale et al., 2004; Richardson et al., 2008). Nous n'avons pas évalué la production de collagène par les cellules encapsulées. Ceci constitue une importante limitation de nos résultats en ce sens où nous n'avons pas suffisamment de données pour caractériser le type de matrice extracellulaire produite par les cellules. Il serait donc important durant les tests *ex vivo* de caractériser la quantité de collagène produite afin de déterminer si la matrice extracellulaire produite respecte la composition observée dans un NP.

7.4 Dégradation des gels versus la vitesse de production des GAG

Le but de la matrice est de supporter la régénération du tissu et disparaître au fur et à mesure que le nouveau tissu se forme. La vitesse de dégradation du gel doit être adaptée à la vitesse de restauration du tissu de manière que le gel laisse la place au nouveau tissu. Cependant, il est difficile de prévoir la vitesse optimale de restauration des propriétés biomécaniques du tissu et ainsi concevoir une matrice avec une vitesse de dégradation appropriée. Pour cela, des tests *in vivo* seraient plus adaptés. En effet, des tests *ex vivo* avec des tissus frais maintenus vivants pourraient servir, mais le milieu de culture utilisé durant ces tests pourrait avoir un impact qui n'est peut-être pas présent dans des conditions *in vivo*.

La biodégradabilité des gels de chitosane

La plupart temps, la biodégradabilité fait référence à la perte de masse du gel dans un milieu donné. Pour les gels de chitosane, cette dégradation passe par l'action des lysozymes qui coupent les chaînes de chitosane à travers les groupements acétylés (Kean & Thanou, 2010). Plus le DDA du polymère est élevé, moindre sera la vitesse de dégradation. Le chitosane que nous avons utilisé possède un DDA autour de 95% et donc une vitesse de dégradation

théoriquement faible. Notre équipe a publié une étude antérieure à ce projet où il a été démontré que la présence de lysosomes entraîne une graduelle perte de masse du gel dans le temps. En effet, la perte de masse de nos gels est inférieure à 25% après 7 jours de culture en présence des lysozymes. Ces résultats sont similaires au taux de dégradation obtenu par Taheri et al. qui se situe autour de 30% après 7 jours de culture et 50% après 28 jours de culture (Taheri et al., 2022). Il est important d'évaluer la perte de masse sur une plus longue période et dans des conditions physiologiques d'autant plus que la quantité de lysozymes présente dans le disque augmente avec la dégénérescence (Melrose, Ghosh, & Taylor, 1989).

La stabilité des propriétés mécaniques des gels de chitosane dépend de l'environnement de culture

Outre la vitesse de biodégradation, la fonction du gel dépend de sa capacité à conserver ses propriétés mécaniques jusqu'à ce que les cellules aient produit de la matrice extracellulaire pour prendre le relai. Il est donc important de caractériser la stabilité du réseau polymérique dans le temps c'est-à-dire déterminer pendant combien de temps et dans quelles conditions, les propriétés mécaniques du gel se maintiennent. Nous n'avons trouvé aucune étude qui se penchait sur cette question dans le cadre de la réparation du disque. Parmi les rares équipes qui ont pu mettre au point des gels chimiques avec d'intéressantes propriétés mécaniques, il n'y a qu'une seule qui a évalué dans le temps les propriétés mécaniques du gel en culture. En effet Smith et al. ont évalué les propriétés en compression de leurs gels (+les cellules) cultivés dans un milieu chimiquement défini et sans sérum et ont remarqué que le module Young en compression des gels encapsulés de cellules augmentait dans le temps. Ceci s'explique par la production graduelle de GAG qui venait renforcer mécaniquement le réseau (Smith et al., 2014).

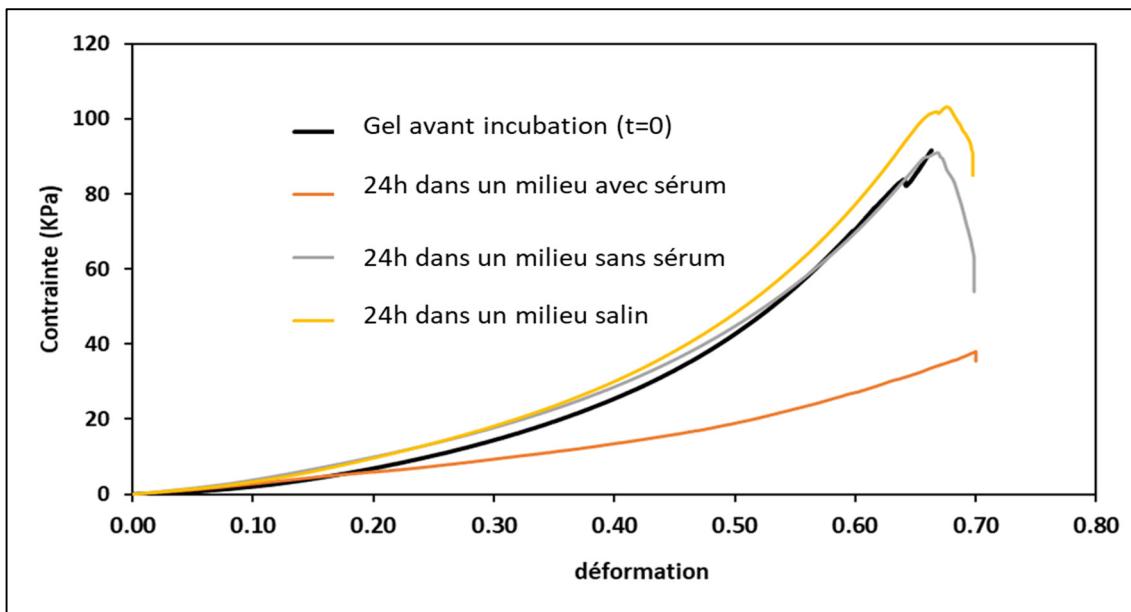


Figure 7.3 Les propriétés mécaniques du gel SHC0.075BGP0.1 baissent significativement en 24h en présence de sérum dans le milieu de culture. Les gels de chitosane complètement gélifiés ont été immergés dans différentes solutions. Les gels ont été testés en compression non confinée après 24h d'incubation.

Durant nos tests cellulaires où les gels étaient incubés pendant 14 jours, nous avons pu remarquer une baisse importante des propriétés mécaniques même s'il n'y avait pas de lysozyme dans le milieu de culture. Nous avons donc procédé à des tests afin de comprendre pourquoi les gels perdaient aussi rapidement leurs propriétés mécaniques en culture. Notre investigation nous a permis de comprendre que c'est la présence de sérum (nécessaire pour la survie des cellules) qui était responsable de la perte du réseau polymérique. Les résultats montrés sur la Figure 7.3 montrent en effet que des gels incubés dans une solution saline (PBS) ou dans du milieu sans sérum conservent leurs propriétés mécaniques alors que ceux cultivés dans du milieu avec sérum perdaient significativement leurs propriétés mécaniques après 24h en culture. Étant donné les faibles liens intermoléculaires qui le constituent, la désintégration du réseau polymérique pourrait être due à une interférence entre les chaînes de chitosane et des composants présents dans le sérum. En effet, le sérum contient une variété de protéines et de molécules qui pourraient présenter une affinité plus importante avec les chaînes de chitosane comparativement à l'affinité entre les chaînes de chitosane elles-mêmes.

Recommandations : Il serait donc pertinent de pousser l'investigation plus loin afin de déterminer les interactions moléculaires entre le sérum et les molécules de chitosane qui expliquent cette désintégration du réseau. De plus, il faudrait évaluer la stabilité de ces gels dans un modèle de disque *ex vivo* afin de la caractériser dans des conditions plus proches de la réalité.

Toutefois, la production d'un IPN avec un second réseau plus robuste pourrait éventuellement aider à rendre le réseau plus stable dans l'environnement relativement hostile du disque intervertébral.

7.5 Les MSC pour un transfert clinique de la technologie

La thérapie cellulaire dans un contexte clinique pour la régénération du disque requiert une source cellulaire cliniquement disponible. Les MSC humaines, compte tenu de leur caractère pluripotent, représentent la meilleure source. Dans le chapitre 6, nous avons évalué la production de protéoglycans par les MSC encapsulées dans le gel et cultivées dans différents milieux. La viabilité de ces cellules dans le gel a été également évaluée et des investigations ont été faites afin d'améliorer cette viabilité.

Ces travaux préliminaires effectuées avec les MSC humaines dans ce gel ont permis de démontrer que ces cellules, avec l'environnement du gel sont capables de produire des protéoglycans dans un milieu répliquant la biochimie d'un disque dégénéré. La présence du Link N améliore également la production de ces protéoglycans. **Cette étude constitue la première à évaluer l'activité de synthèse des MSC dans un milieu dégénératif.**

Cependant, les MSC présentent une viabilité relativement faible dans le gel. Malgré l'ajout de la gélatine (pour améliorer l'adhésion cellulaire), l'augmentation de la quantité des nutriments et de la surface de diffusion du gel, les MSC humaines présentent moins de 50% de viabilité dans le gel de chitosane après 7 jours en culture dans le milieu dégénératif. Pourtant, dans le

même milieu, les MSC présentent une meilleure viabilité quand elles sont encapsulées dans un gel de collagène. Cette observation mériterait davantage d'analyse mais suggère un manque de structures adhésives dans le gel de chitosane et son impact sur la survie des MSC encapsulées.

De façon intéressante, les MSC présentent également une bonne viabilité ($>70\%$) quand elles sont encapsulées dans le gel de chitosane et cultivées dans un milieu de culture favorable tel que le *NutriStem®*. Ces résultats suggèrent donc qu'il y a des composants dans ce milieu commercial qui permettent de contrebalancer l'effet du manque d'adhésion des gels de chitosane. Il serait intéressant d'explorer cet aspect davantage.

Toutefois, il n'y a pas de milieu utilisé dans un contexte *in vivo* il serait important de trouver des stratégies pour assurer la suivie des cellules souches dans le gel une fois injectées dans le disque.

Par exemple, Smith et al., ont ajouté à leur gel chimique de chitosane un facteur de croissance : le TGF- β . Ceci a permis d'améliorer significativement la survie des cellules MSC encapsulées ainsi que leur synthèse de protéoglycans. Cependant, comme mentionné dans l'article 2, ce facteur de croissance n'est pas recommandé pour des applications cliniques étant donné son implication dans des voies de signalisation cellulaire pour les tumeurs. Maintenir les MSC vivantes dans la matrice et dans le disque demeure donc une limitation majeure pour ce type de technologie.

En revanche, il est important de mentionner que Mwale et al. ont montré que l'injection de MSC seules était suffisante pour restaurer la quantité de GAG dans un modèle *ex vivo* de disque bovin dégénéré (avec de la trypsine) (Mwale et al., 2014). Ces résultats suggèrent que ces cellules, malgré leur mortalité dans le milieu de disque dégénéré, sont quand même en mesure de produire des protéoglycans comme montré dans nos résultats dans le chapitre 6. Les MSC ne requièrent donc peut-être pas une très bonne viabilité afin de restaurer les propriétés du disque. Il serait donc intéressant de faire des investigations afin de clarifier ce point important.

7.6 Résumé : Originalités du projet

La technologie développée lors de ce projet constitue à notre connaissance le premier gel physique injectable, compatible avec l'encapsulation cellulaire, présentant des propriétés mécaniques similaires au NP humain. Ce gel, avec l'ajout de la gélatine et du Link N est en mesure de produire des protéoglycane en quantité plus importante dans un milieu dégénératif. Ce projet est le premier à avoir cultivé des cellules encapsulées dans un hydrogel injectable dans des conditions proches des conditions physiologiques de dégénérescence. En effet, le milieu dégénératif utilisé, en dehors de son pH qui n'est pas acide, réplique la composition biochimique d'un disque dégénéré. Ces conditions de culture restrictives, plus proches de la réalité ont mis en lumière la difficulté pour les cellules de produire, *in vitro*, une quantité importante de matrice extracellulaire dans l'environnement plus au moins hostile du disque. Il est donc important de compléter ces données en effectuant des tests *in vivo* qui tiennent compte des autres paramètres du disque tels que les stimulations mécaniques qui pourraient induire une amélioration de l'activité de synthèse des cellules.

Nous avons également mis en lumière la complexité des tests *ex vivo* pour l'évaluation des performances mécaniques des matrices injectables. En effet, ce projet est le premier à mettre au point un protocole précisant comment prendre en compte les variabilités découlant des niveaux vertébraux, de la dégénération naturelle des tissus et des conditions de tests pour caractériser de façon fiable des modèles de disques bovins dégénérés. Ce protocole et les recommandations proposées pour son amélioration permettront également d'évaluer efficacement la capacité des matrices injectables à restaurer les propriétés mécaniques du disque.

7.7 Perspectives pour le traitement minimalement invasif de la dégénérescence du disque

Les hydrogels injectables constituent une approche intéressante pour la prise en charge clinique de la dégénérescence du disque intervertébral. Ces hydrogels sont non seulement déployés de

manière minimalement invasive, mais permettraient également d'induire la restauration des propriétés biomécaniques du disque à l'inverse des méthodes chirurgicales. Dans cette section, nous présentons les technologies qui à notre sens devraient être explorées pour développer une technologie susceptible de réussir un transfert clinique.

Réseau IPN injectable à base de chitosane pour le NP

Comme montré plus haut le gel physique de chitosane comporte des caractéristiques intéressantes pour la régénération du disque. Mais la stabilité de ses propriétés mécaniques et son élasticité restent des limitations importantes. Un réseau IPN associant ce gel et un gel chimique plus stable serait une avenue intéressante à explorer. Cependant, il faudrait s'assurer que le gel chimique choisi n'interfère pas avec la formation du réseau polymérique du gel physique. Le choix de ces gels chimiques doit également se faire de manière à limiter des modifications chimiques complexes qui pourraient empêcher le transfert clinique de la technologie. De plus, l'ajout de composants favorisant l'adhésion cellulaire serait intéressant pour améliorer la survie et l'activité de synthèse des cellules notamment les MSC.

Associer la réparation du NP à celle de l'AF

La technologie telle qu'elle est pensée actuellement suggère que la matrice sera injectée grâce à une aiguille dans le NP à travers l'AF. Cette manipulation laissera sans doute un trou dans l'AF qui peut être important selon la taille de l'aiguille utilisée et induire des altérations mécaniques au niveau du tissu (Elliott et al., 2008; H. Zhang et al., 2011). Dans un *contexte in vivo*, la stimulation mécanique sur le disque pourrait potentiellement induire l'expulsion du gel en dehors du disque à travers le trou dans l'AF. Pour une efficacité clinique, il serait nécessaire d'associer cette technique à une autre qui permettrait de fermer les défauts dans l'AF (Sharifi, Bulstra, Grijpma, & Kuijer, 2015; Sloan et al., 2020).

De plus, il faut rappeler que le processus de dégénérescence affecte également l'AF notamment pour les grades 3 et 4 où les symptômes commencent à se faire ressentir. Réparer uniquement le NP risquerait d'être insuffisant pour restaurer toute la fonctionnalité du tissu. Ceci constitue une raison supplémentaire pour mettre au point des technologies intégrées qui visent également

l'AF. Quelques rares équipes travaillent dans ce sens, mais aucune des propositions n'a encore atteint l'étape des tests cliniques (Bowles, Gebhard, Härtl, & Bonassar, 2011; Sloan et al., 2020).

CONCLUSION

La prise en charge clinique de la dégénérescence du disque intervertébral nécessite actuellement des techniques chirurgicales très invasives servant uniquement à contrôler les symptômes de la maladie. Il apparaît donc important de mettre au point une thérapie minimalement invasive permettant de traiter la maladie en restaurant les propriétés biomécaniques du disque. La thérapie cellulaire associée à une matrice injectable constitue une avenue intéressante. La matrice, dans ce type d'application, doit présenter à la fois des propriétés mécaniques adéquates et une biocompatibilité prouvée. Plusieurs matrices : des hydrogels autant physiques que chimiques ont été mis au point dans la littérature à cet effet. Cependant, ces matrices peinent à présenter à la fois une performance mécanique adaptée et une biocompatibilité appropriée. L'objectif général de cette thèse était donc de concevoir un hydrogel injectable présentant des propriétés mécaniques proches du tissu natif et un environnement adapté à l'encapsulation et la survie des cellules ainsi que la production d'une matrice extracellulaire appropriée. Les travaux présentés dans les chapitres 3 à 6 répondent aux objectifs spécifiques du projet tel qu'exposés au CHAPITRE 2.

Dans un premier temps, nous avons conçu et évalué des hydrogels thermosensibles de chitosane présentant des propriétés intéressantes pour la régénération du NP, la partie centrale du disque où débute la dégénérescence. La meilleure formulation de ces gels thermosensibles est constituée de 2% w/v chitosane, 75mM de SHC et 100mM de BGP. Ce gel physique est le tout premier qui présente des propriétés mécaniques en compression et en cisaillement proches de celles du NP humain. En effet, malgré le caractère souvent fragile des réseaux d'hydrogels physiques de chitosane, nous avons réussi, en changeant le type d'agents gélifiants utilisés, à mettre au point un gel physique avec des propriétés mécaniques proches des gels chimiques. À l'inverse des gels chimiques qui sont habituellement les plus résistants, notre formulation suit un processus de fabrication très simple utilisant des composants (chitosane, SHC, BGP) ayant déjà démontré leur biocompatibilité. Leur homologation pour une éventuelle commercialisation devrait donc se faire sans grand encombre. Cependant, il faut préciser que

la formulation de ce gel doit subir d'autres améliorations telles que l'ajout d'un autre réseau polymérique, afin d'améliorer son élasticité et assurer une stabilité de ses propriétés mécaniques dans le temps.

En ce qui concerne la biocompatibilité, les cellules NP encapsulées dans la formulation sélectionnée présente une survie à plus de 80% après quatorze jours de culture. Ces cellules ont été également capables de produire des protéoglycans, importants pour la restauration des propriétés mécaniques du tissu. Cependant, l'activité de synthèse de ces cellules encapsulées dans le gel était limitée étant donné la quantité relativement faible de protéoglycans qu'elles produisaient.

Dans un second temps, nous avons ajouté la gélatine et le Link N au gel afin d'améliorer l'activité de synthèse des cellules encapsulées. Dans cette partie du projet, et pour la première fois, un milieu de culture dégénératif répliquant l'environnement d'un disque dégénéré a été utilisé afin de caractériser la performance de la technologie dans des conditions plus proches de la réalité. En effet, nous avons démontré que l'ajout de la gélatine dans le gel de chitosane améliore les propriétés en compression du gel et stimule les cellules NP à produire plus de protéoglycans. La présence du Link N permet également une production plus importante de protéoglycans dans le milieu dégénératif. Enfin, l'association de ces deux composants induit de façon additive une activité de synthèse plus importante pour les cellules NP.

Néanmoins, malgré toutes ces améliorations, la quantité de protéoglycans produite par les cellules encapsulées dans ces gels demeurent faible comparativement aux valeurs observées dans la littérature. Cependant, étant donné que nos conditions de cultures sont plus proches de la réalité, nous pensons que nos résultats sont plus représentatifs du comportement réel des cellules dans un contexte *in vivo*. Nos résultats soulèvent donc l'importance de convenir des conditions de culture standardisées pour la communauté scientifique afin d'effectuer des caractérisations dans des environnements plus réalistes et permettant de comparer de façon plus efficace les hydrogels entre eux et éventuellement palier au statut quo qui empêche

actuellement ces technologies minimalement invasives de passer à l'étape des tests cliniques. De plus, il faudrait développer une technique afin d'incorporer le Link N dans la technologie.

Les tests *in vitro* effectués constituent une preuve de concept permettant de poser l'hypothèse que cette formulation de chitosane permettrait de restaurer les propriétés mécaniques du disque dégénéré. Afin de le confirmer, nous avons débuté des tests *ex vivo* avec un modèle de disques bovins dégénérés utilisant la papaïne. Des complications techniques durant l'étude nous ont empêché d'aller au bout de l'étude mais nous a quand même permis de mettre en lumière pour la première fois des particularités méthodologiques à prendre en compte pour mieux évaluer la performance mécanique des modèles de dégénérescence et la capacité des hydrogels injectables à restaurer les propriétés biomécaniques d'un disque dégénéré. En effet, nous avons démontré que le choix des échantillons et les conditions de tests doivent être mieux pris en compte afin d'éviter des erreurs d'interprétation dues aux variabilités découlant de ces paramètres.

Le transfert clinique de ce type de technologie requiert l'utilisation d'une source cellulaire cliniquement disponible. Les MSC constituent une source cellulaire intéressante. Cependant, les travaux préliminaires présentés au CHAPITRE 6 ont permis de montrer que l'environnement 3D du gel induire une production de protéoglycans par les MSC encapsulées, signe d'une potentielle différentiation de ces cellules. Cependant le manque de structures adhésives dans les gels de chitosane ne favorise pas la survie des MSC dans les gels de chitosane. L'ajout de la gélatine n'ayant pas amélioré ces résultats, il serait intéressant d'évaluer l'ajout d'autres molécules adhésives sur la viabilité des MSC dans le gel.

Même si l'objectif de cette thèse se limitait à la réparation du NP, il est important de mentionner que l'association avec une technique de réparation de l'AF serait nécessaire afin de prendre en charge la réparation du disque dans sa globalité.

ANNEXE I

DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE 1

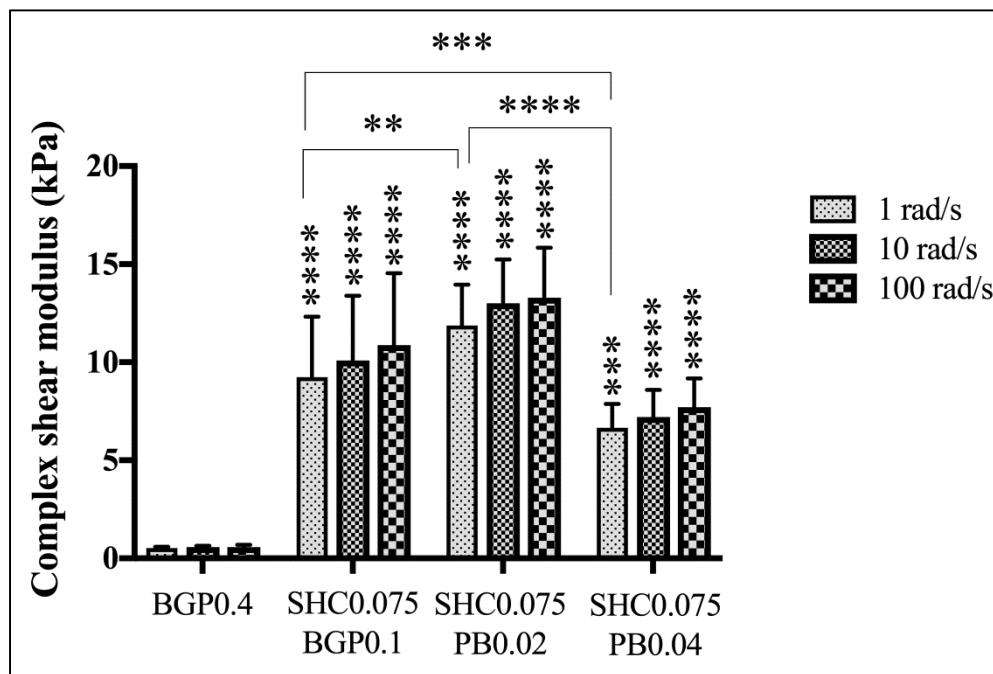


Figure-A I- 1 Torsional shear: complex shear modulus measured at fixed shear stress amplitude of 1% and various frequencies. Data are shown as mean \pm SD ($N=5$, $n=1$). * shows statistically significant difference compared to BGP0.4 at the same angular velocity. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

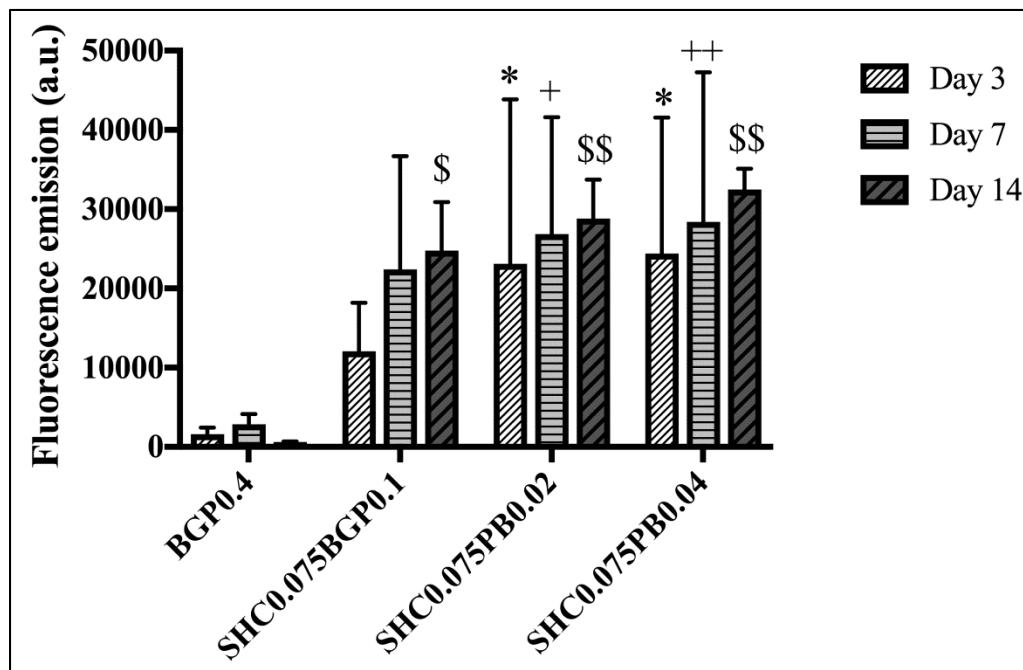


Figure-A I- 2 Metabolic activity of the cells encapsulated in hydrogels after 3, 7 and 14 days. Mean \pm D (N=4, n=1). * p<0.05 compared to BGP0.4 at day3, + p<0.05 and ++ p<0.01 compared to BGP0.4 at day 7, \$ p<0.05 and \$\$ p<0.01 compared to BGP0.4 at day 14

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramovitz, J. N., & Neff, S. R. (1991). Lumbar disc surgery: results of the prospective lumbar discectomy study of the joint section on disorders of the spine and peripheral nerves of the american association of neurological surgeons and the congress of neurological surgeons. *Neurosurgery*, 29(2), 301-378. doi: 10.1227/00006123-199108000-00027.
- Adams, M. A., McNally, D. S., & Dolan, P. (1996). 'Stress' distributions inside intervertebral discs. The effects of age and degeneration. *J Bone Joint Surg Br*, 78(6), 965-972. doi: 10.1302/0301-620x78b6.1287.
- Adoungotchodo, A., Epure, L., Mwale, F., & Lerouge, S. (2021). Chitosan-based hydrogels supplemented with gelatine and Link N enhance extracellular matrix deposition by encapsulated cells in a degenerative intervertebral disc environment. *European cells & materials*, 41, 471-484. doi: 10.22203/eCM.v041a30
- Ahmadi, R., & de Brujin, J. D. (2008). Biocompatibility and gelation of chitosan–glycerol phosphate hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86A(3), 824-832. doi: 10.1002/jbm.a.31676.
- Aigner, T., Greskötter, K. R., Fairbank, J. C. T., von der Mark, K., & Urban, J. P. G. (1998). Variation with Age in the Pattern of Type X Collagen Expression in Normal and Scoliotic Human Intervertebral Discs. *Calcified Tissue International*, 63(3), 263-268. doi: 10.1007/s002239900524.
- Alaqeel, M., Grant, M., Epure, L., Salem, O., AlShaer, A., Huk, O., . . . Im, H. (2020). Link N suppresses interleukin-1 β -induced biological effects on human osteoarthritic cartilage. *European cells & materials*, 39, 65-76. doi: 10.22203/eCM.v039a04
- Alinejad, Y., Adoungotchodo, A., Grant, M. P., Epure, L. M., Antoniou, J., Mwale, F., & Lerouge, S. (2019). Injectable Chitosan Hydrogels with Enhanced Mechanical Properties for Nucleus Pulposus Regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 25(5-6), 303-313. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0170
- Alinejad, Y., Adoungotchodo, A., Hui, E., Zehtabi, F., & Lerouge, S. (2018). An injectable chitosan/chondroitin sulfate hydrogel with tunable mechanical properties for cell therapy/tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 132-141. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.069.
- Alini, M., Eisenstein, S. M., Ito, K., Little, C., Kettler, A. A., Masuda, K., . . . Wilke, H. J. (2008). Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *European Spine Journal*, 17. doi: 10.1007/s00586-007-0414-y.

- Alini, M., Li, W., Markovic, P., Aebi, M., Spiro, R. C., & Roughley, P. J. (2003). The potential and limitations of a cell-seeded collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix. *Spine*, 28(5), 446-454. doi: 10.1097/01.brs.0000048672.34459.31.
- An, H. S., Takegami, K., Kamada, H., Nguyen, C. M., Thonar, E. J., Singh, K., . . . Masuda, K. (2005). Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. *Spine*, 30.
- Anseth, K. S., Bowman, C. N., & Brannon-Peppas, L. (1996). Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, 17(17), 1647-1657. doi: 10.1016/0142-9612(96)87644-7
- Anseth, K. S., & Klok, H.-A. (2016). Click chemistry in biomaterials, nanomedicine, and drug delivery: ACS Publications.
- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., & Rylander, M. N. (2014). Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 20(6), 683-696. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0086.
- Antoniou, J., Epure, L., Grant, M., Richard, H., Sampalis, J., Roughley, P., . . . Mwale, F. (2019). Short link N acts as a disease modifying osteoarthritis drug. *European cells & materials*, 37, 347-359. doi: 10.22203/eCM.v037a21
- Antoniou, J., Epure, L. M., Michalek, A. J., Grant, M. P., Iatridis, J. C., & Mwale, F. (2013). Analysis of quantitative magnetic resonance imaging and biomechanical parameters on human discs with different grades of degeneration. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 38(6), 1402-1414. doi: 10.1002/jmri.24120
- Antoniou, J., Wang, H. T., Alaseem, A. M., Haglund, L., Roughley, P. J., & Mwale, F. (2012). The effect of Link N on differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*, 14(6), R267. doi: 10.1186/ar4113
- Assaad, E., Maire, M., & Lerouge, S. (2015). Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlled gelation kinetics and enhanced mechanical resistance. *Carbohydrate Polymers*, 130, 87-96. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.063.
- Ateshian, G. A., Chahine, N. O., Basalo, I. M., & Hung, C. T. (2004). The correspondence between equilibrium biphasic and triphasic material properties in mixture models of articular cartilage. *J Biomech*, 37(3), 391-400. doi: 10.1016/s0021-9290(03)00252-5.

- Babin, H., & Dickinson, E. (2001). Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. *Food Hydrocolloids*, 15(3), 271-276. doi: 10.1021/jf0355304.
- Bach, F. C., Laagland, L. T., Grant, M. P., Creemers, L. B., Ito, K., Meij, B. P., . . . Tryfonidou, M. A. (2017). Link-N: The missing link towards intervertebral disc repair is species-specific. *PLOS ONE*, 12(11), e0187831. doi: 10.1371/journal.pone.0187831.
- Balkovec, C., Vernengo, J., & McGill, S. M. (2013). The Use of a Novel Injectable Hydrogel Nucleus Pulposus Replacement in Restoring the Mechanical Properties of Cyclically Fatigued Porcine Intervertebral Discs. *Journal of Biomechanical Engineering*, 135(6). doi: 10.1115/1.4024285.
- Bao, Q.-B., McCullen, G. M., Higham, P. A., Dumbleton, J. H., & Yuan, H. A. (1996). The artificial disc: theory, design and materials. *Biomaterials*, 17(12), 1157-1167. doi: 10.1016/0142-9612(96)84936-2.
- Bassols, A., & Massague, J. (1988). Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 263(6), 3039-3045. doi: 10.1016/S0021-9258(18)69173-2.
- Bauerfeind, A. (s.d.). Cas pratiques en orthopédie. Repéré sur Les cahiers Bauerfeind à www.bauerfeind.fr/fr/file/index/download/file_id/346055
- Bernard, J., Drockenmuller, É., Fleury, É., Pascault, J.-P., Fontaine, L., & Daniel, J.-C. (2010). La « chimie click ». Repéré le 16 Septembre 2017 sur L'actualité chimique à <http://www.lactualitechimique.org/IMG/pdf/2010-no344-sept.-p.51-daniel-hd.pdf?4038/bee0d4b501c26e40b2633dd214c79b0876120159>
- Bian, Q., Ma, L., Jain, A., Crane, J. L., Kebaish, K., Wan, M., . . . Cao, X. (2017). Mechanosignaling activation of TGF β maintains intervertebral disc homeostasis. *Bone Research*, 5(1), 17008. doi: 10.1038/boneres.2017.8.
- Bibby, S., & Urban, J. P. (2004). Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells. *European Spine Journal*, 13(8), 695-701. doi: 10.1007/s00586-003-0616-x
- Bierie, B., & Moses, H. L. (2006). TGF- β and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17(1), 29-40. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.006.
- Blanquer, S., Grijpma, D. W., & Poot, A. A. (2015). Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 172-187. doi: 10.1016/j.addr.2014.10.024

- Bowles, R. D., Gebhard, H. H., Härtl, R., & Bonassar, L. J. (2011). Tissue-engineered intervertebral discs produce new matrix, maintain disc height, and restore biomechanical function to the rodent spine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13106-13111. doi: 10.1073/pnas.1107094108
- Bowles, R. D., & Setton, L. A. (2017). Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair. *Biomaterials*, 129, 54-67. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.013.
- Brahmkhatri, V. P., Prasanna, C., & Atreya, H. S. (2015). Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies. *BioMed research international*, 2015, 538019-538019. doi: 10.1155/2015/538019.
- Buckwalter, J. A. (1995). Spine update: Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine*, 20(11), 1307-1314. doi: 10.1097/00007632-199506000-00022.
- Camplejohn, K. L., & Allard, S. A. (1988). Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 89(2), 185-188. doi: 10.1007/BF00489922.
- Cassinelli, E. H., & Kang, J. D. (2000). Current understanding of lumbar disc degeneration. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 10(4), 254-262. doi: 10.1016/S1048-6666(00)80025-7.
- Ceccaldi, C., Assaad, E., Hui, E., Buccione, M., Adoungotchodo, A., & Lerouge, S. (2017). Optimization of Injectable Thermosensitive Scaffolds with Enhanced Mechanical Properties for Cell Therapy. *Macromolecular Bioscience*, 1600435-n/a. doi: 10.1002/mabi.201600435.
- Chan, S. C. W., Bürki, A., Bonél, H. M., Benneker, L. M., & Gantenbein-Ritter, B. (2013). Papain-induced in vitro disc degeneration model for the study of injectable nucleus pulposus therapy. *The Spine Journal*, 13(3), 273-283. doi: 10.1016/j.spinee.2012.12.007.
- Chan, S. C. W., & Gantenbein-Ritter, B. (2012). Intervertebral disc regeneration or repair with biomaterials and stem cell therapy—feasible or fiction. *Swiss Med Wkly*, 142, w13598. doi: 10.4414/smw.2012.13598
- Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2003). Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24(17), 2871-2880. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00117-0.
- Cheng, Y.-H., Yang, S.-H., Su, W.-Y., Chen, Y.-C., Yang, K.-C., Cheng, W. T.-K., . . . Lin, F.-H. (2010). Thermosensitive Chitosan–Gelatin–Glycerol Phosphate Hydrogels as a Cell Carrier for Nucleus Pulposus Regeneration: An In Vitro Study. *Tissue Engineering Part A*, 16(2), 695-703. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0229.

- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., . . . Selmani, A. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21(21), 2155-2161. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00116-2.
- Choi, U. Y., Joshi, H. P., Payne, S., Kim, K. T., Kyung, J. W., Choi, H., . . . Sohn, S. (2020). An Injectable Hyaluronan–Methylcellulose (HAMC) Hydrogel combined with Wharton’s jelly-derived mesenchymal Stromal cells (WJ-MSCs) promotes degenerative disc repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7391. doi: 10.3390/ijms21197391
- Chou, A. I., Akintoye, S. O., & Nicoll, S. B. (2009). Photo-crosslinked alginate hydrogels support enhanced matrix accumulation by nucleus pulposus cells in vivo. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(10), 1377-1384. doi: 10.1016/j.joca.2009.04.012.
- Chou, A. I., & Nicoll, S. B. (2009). Characterization of photocrosslinked alginate hydrogels for nucleus pulposus cell encapsulation. *J Biomed Mater Res A*, 91(1), 187-194. doi: 10.1002/jbm.a.32191.
- Clark, D. A., & Coker, R. (1998). Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF- β). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(3), 293-298. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00128-3.
- Cloyd, J. M., Malhotra, N. R., Weng, L., Chen, W., Mauck, R. L., & Elliott, D. M. (2007). Material properties in unconfined compression of human nucleus pulposus, injectable hyaluronic acid-based hydrogels and tissue engineering scaffolds. *European Spine Journal*, 16(11), 1892-1898. doi: 10.1007/s00586-007-0443-6.
- COMGRAF sas France. (2021). Chitin & Chitosans. Repéré le 18 Octobre 2021 sur Alpha-Chitin à <http://alpha-chitin.com/chitine-chitosanes/>
- Coric, D., Pettine, K., Sumich, A., & Boltes, M. O. (2013). Prospective study of disc repair with allogeneic chondrocytes presented at the 2012 Joint Spine Section Meeting. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 18(1), 85-95. doi: 10.3171/2012.10.SPINE12512
- Cortes, D. H., & Elliott, D. M. (2014). The Intervertebral Disc: Overview of Disc Mechanics. Dans I. M. Shapiro & M. V. Risbud (Éds.), *The Intervertebral Disc: Molecular and Structural Studies of the Disc in Health and Disease* (pp. 17-31). Vienna: Springer Vienna. doi: 10.1007/978-3-7091-1535-0_2
- Costi, J. J., Freeman, B. J., & Elliott, D. M. (2011). Intervertebral disc properties: challenges for biodevices. *Expert review of medical devices*, 8(3), 357-376. doi: 10.1586/erd.11.1

- Crevensten, G., Walsh, A. J. L., Ananthakrishnan, D., Page, P., Wahba, G. M., Lotz, J. C., & Berven, S. (2004). Intervertebral Disc Cell Therapy for Regeneration: Mesenchymal Stem Cell Implantation in Rat Intervertebral Discs. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3), 430-434. doi: 10.1023/B:ABME.0000017545.84833.7c.
- Cui, Z., Lee, B. H., Pauken, C., & Vernon, B. L. (2011). Degradation, cytotoxicity, and biocompatibility of NIPAAm-based thermosensitive, injectable, and bioresorbable polymer hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 98(2), 159-166. doi: 10.1002/jbm.a.33093.
- Custódio, C. A., Alves, C. M., Reis, R. L., & Mano, J. F. (2010). Immobilization of fibronectin in chitosan substrates improves cell adhesion and proliferation. *J Tissue Eng Regen Med*, 4(4), 316-323. doi: 10.1002/term.248.
- De Pieri, A., Byerley, A. M., Musumeci, C. R., Salemizadehparizi, F., Vanderhorst, M. A., & Wuertz-Kozak, K. (2020). Electrospinning and 3D bioprinting for intervertebral disc tissue engineering. *JOR Spine*, 3(4), e1117. doi: 10.1002/jsp2.1117.
- Dechambenoit, G. (2016). MYÉLOPATHIE CERVICARTHROSIQUE. Repéré le 16 Septembre 2017 à http://images.slideplayer.fr/41/11307239/slides/slide_10.jpg
- Demers, C. N., Antoniou, J., & Mwale, F. (2004). Value and limitations of using the bovine tail as a model for the human lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976)*, 29(24), 2793-2799. doi: 10.1097/01.brs.0000147744.74215.b0
- DePalma, M. J., Ketchum, J. M., & Saullo, T. (2011). What Is the Source of Chronic Low Back Pain and Does Age Play a Role? *Pain Medicine*, 12(2), 224-233. doi: 10.1111/j.1526-4637.2010.01045.x.
- Depuy Synthes. (s.d.). Minimally Invasive Lateral Spinal Fusion. Repéré le 17 Février 2017 à <https://www.depuysynthes.com/patients/aabp/explore/surgical-treatments/minimally-invasive-lateral>
- Di Martino, A., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5983-5990. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.016
- Doench, I., Ahn Tran, T., David, L., Montembault, A., Viguer, E., Gorzelanny, C., . . . Osorio-Madrazo, A. (2019). Cellulose Nanofiber-Reinforced Chitosan Hydrogel Composites for Intervertebral Disc Tissue Repair. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 4(1), 19. doi: 10.3390/biomimetics4010019.
- Donati, I., Asaro, F., & Paoletti, S. (2009). Experimental Evidence of Counterion Affinity in Alginates: The Case of Nongelling Ion Mg²⁺. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(39), 12877-12886. doi: 10.1021/jp902912m.

- Dupin, G. (2015). Prévenir et enrayer la scoliose avec la chiropratique. Repéré sur Famille en pleine santé à <https://familleenpleinesante.com/prevenir-et-enrayer-la-scoliose-avec-la-chiropratique/>
- Eivazzadeh-Keihan, R., Khalili, F., Khosropour, N., Aliabadi, H. A. M., Radinekiyan, F., Sukhtezari, S., . . . Lanceros-Méndez, S. (2021). Hybrid Bionanocomposite Containing Magnesium Hydroxide Nanoparticles Embedded in a Carboxymethyl Cellulose Hydrogel Plus Silk Fibroin as a Scaffold for Wound Dressing Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(29), 33840-33849. doi: 10.1021/acsami.1c07285.
- El-Fiqi, A., Lee, J. H., Lee, E.-J., & Kim, H.-W. (2013). Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: Improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 9(12), 9508-9521. doi: 10.1016/j.actbio.2013.07.036.
- Elliott, D. M., Yerramalli, C. S., Beckstein, J. C., Boxberger, J. I., Johannessen, W., & Vresilovic, E. J. (2008). The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, 33(6), 588-596. doi: 10.1097/BRS.0b013e318166e0a2.
- Encyclopédie de sécurité et de santé au travail. (s.d.). Chapitre 6 - Le système musculo-squelettique. Repéré sur Bureau internation du travail à <http://www.ilo.org/fr/documents/ilo006.htm>
- Errington, R. J., Puustjarvi, K., White, I. R. F., Roberts, S., & Urban, J. P. G. (1998). Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc. *Journal of Anatomy*, 192(3), 369-378. doi: 10.1046/j.1469-7580.1998.19230369.x.
- Francisco, A. T., Mancino, R. J., Bowles, R. D., Brunger, J. M., Tainter, D. M., Chen, Y.-T., . . . Setton, L. A. (2013). Injectable laminin-functionalized hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials*, 34(30), 7381-7388. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.038.
- Freemont, A. (2009). The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology*, 48(1), 5-10. doi: 10.1093/rheumatology/ken396
- Frith, J. E., Cameron, A. R., Menzies, D. J., Ghosh, P., Whitehead, D. L., Gronthos, S., . . . Cooper-White, J. J. (2013). An injectable hydrogel incorporating mesenchymal precursor cells and pentosan polysulphate for intervertebral disc regeneration. *Biomaterials*, 34(37), 9430-9440. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.072.
- Galbusera, F., Van Rijsbergen, M., Ito, K., Huyghe, J. M., Brayda-Bruno, M., & Wilke, H.-J. (2014). Ageing and degenerative changes of the intervertebral disc and their impact on spinal flexibility. *European Spine Journal*, 23(3), 324-332. doi: 10.1007/s00586-014-3203-4

- Gan, Y., Li, P., Wang, L., Mo, X., Song, L., Xu, Y., . . . Zhou, Q. (2017). An interpenetrating network-strengthened and toughened hydrogel that supports cell-based nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials*, 136, 12-28. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.05.017.
- Ganey, T. M., & Meisel, H. (2002). A potential role for cell-based therapeutics in the treatment of intervertebral disc herniation. *European Spine Journal*, 11(Suppl 2), S206-S214. doi: 10.1007/s00586-002-0494-7.
- Ganjun, F., Xianfeng Zhao, Hao Liu, Huina Zhang, Xiangjun Chen, Rui Shi, . . . Beiyu Wang. (2011). Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 14(3), 322-329. doi: doi:10.3171/2010.11.SPINE10285.
- Gawri, R., Antoniou, J., Ouellet, J., Awwad, W., Steffen, T., Roughley, P., . . . Mwale, F. (2012). Best paper NASS 2013: link-N can stimulate proteoglycan synthesis in the degenerated human intervertebral discs. *European cells & materials*, 26, 107-119. doi: 10.22203/ecm.v026a08
- Gawri, R., Ouellet, J., Önnerfjord, P., Alkhatib, B., Steffen, T., Heinegård, D., . . . Haglund, L. (2014). Link N is cleaved by human annulus fibrosus cells generating a fragment with retained biological activity. *Journal of Orthopaedic Research*, 32(9), 1189-1197. doi: 10.1002/jor.22653
- Gentile, P., Nandagiri, V. K., Daly, J., Chiono, V., Mattu, C., Tonda-Turo, C., . . . Ramtoola, Z. (2016). Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 249-257. doi: 10.1016/j.msec.2015.10.014.
- Ghobril, C., & Grinstaff, M. (2015). The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial. *Chemical Society Reviews*, 44(7), 1820-1835. doi: 10.1039/c4cs00332b
- Ghosh, P., Wu, J., Shimmon, S., Zannettino, A. C. W., Gronthos, S., & Itescu, S. (2010). Pentosan polysulfate promotes proliferation and chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived mesenchymal precursor cells. *Arthritis Research & Therapy*, 12(1), R28-R28. doi: 10.1186/ar2935.
- Gilchrist, C. L., Chen, J., Richardson, W. J., Loeser, R. F., & Setton, L. A. (2007). Functional integrin subunits regulating cell-matrix interactions in the intervertebral disc. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(6), 829-840. doi: 10.1002/jor.20343.

Gilchrist, C. L., Darling, E. M., Chen, J., & Setton, L. A. (2011). Extracellular Matrix Ligand and Stiffness Modulate Immature Nucleus Pulposus Cell-Cell Interactions. *PLOS ONE*, 6(11), e27170. doi: 10.1371/journal.pone.0027170.

Gorensek, M., Joksimovic, C., Kregar-Velikonja, N., Gorensek, M., Knezevic, M., Jeras, M., . . . Cor, A. (2004). Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes. *CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY LETTERS.*, 9(2), 363-374.

Grad, S., Zhou, L., Gogolewski, S., & Alini, M. (2003). Chondrocytes seeded onto poly (L/DL-lactide) 80%/20% porous scaffolds: a biochemical evaluation. *J Biomed Mater Res A*, 66(3), 571-579. doi: 10.1002/jbm.a.10007.

Grant, M., Epure, L. M., Salem, O., AlGarni, N., Ciobanu, O., Alqaqel, M., . . . Mwale, F. (2016). Development of a Large Animal Long-Term Intervertebral Disc Organ Culture Model That Includes the Bony Vertebrae for Ex Vivo Studies. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 22(7), 636-643. doi: 10.1089/ten.tec.2016.0049.

Grant, M. P., Epure, L. M., Bokhari, R., Roughley, P., Antoniou, J., & Mwale, F. (2016). Human cartilaginous endplate degeneration is induced by calcium and the extracellular calcium-sensing receptor in the intervertebral disc. *European Cells and Materials*, 32, 137-151. doi: 10.22203/eCM.v032a09.

Grochulla, F., Mayer, H., & Korge, A. (2006). Autologous Disc Chondrocyte Transplantation. Dans *Minimally Invasive Spine Surgery* (pp. 374-378). Springer.

Gowney Kalaf, E. A., Flores, R., Bledsoe, J. G., & Sell, S. A. (2016). Characterization of slow-gelling alginate hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 63, 198-210. doi: 10.1016/j.msec.2016.02.067.

Gowney Kalaf, E. A., Pendyala, M., Bledsoe, J. G., & Sell, S. A. (2017). Characterization and restoration of degenerated IVD function with an injectable, in situ gelling alginate hydrogel: An in vitro and ex vivo study. *J Mech Behav Biomed Mater*, 72, 229-240. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.05.014.

Gruber, H. E., Fisher, J. E. C., Desai, B., Stasky, A. A., Hoelscher, G., & Hanley, J. E. N. (1997). Human Intervertebral Disc Cells from the Annulus: Three-Dimensional Culture in Agarose or Alginate and Responsiveness to TGF- β 1. *Experimental Cell Research*, 235(1), 13-21. doi: 10.1006/excr.1997.3647.

Gruber, H. E., Leslie, K., Ingram, J., Norton, H. J., & Hanley, E. N. (2004). Cell-based tissue engineering for the intervertebral disc: in vitro studies of human disc cell gene expression and matrix production within selected cell carriers. *Spine J*, 4(1), 44-55.

- Gullbrand, S. E., Malhotra, N. R., Schaer, T. P., Zawacki, Z., Martin, J. T., Bendigo, J. R., . . . Smith, L. J. (2017). A large animal model that recapitulates the spectrum of human intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(1), 146-156. doi: 10.1016/j.joca.2016.08.006.
- Gullbrand, S. E., Schaer, T. P., Agarwal, P., Bendigo, J. R., Dodge, G. R., Chen, W., . . . Smith, L. J. (2017). Translation of an injectable triple-interpenetrating-network hydrogel for intervertebral disc regeneration in a goat model. *Acta Biomaterialia*, 60(Supplement C), 201-209. doi: 10.1016/j.actbio.2017.07.025.
- Gulrez, S. K., Phillips, G. O., & Al-Assaf, S. (2011). *Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications*. INTECH Open Access Publisher.
- Guo, S., Cui, L., Xiao, C., Wang, C., Zhu, B., Liu, X., . . . Li, S. (2021). The Mechanisms and Functions of GDF-5 in Intervertebral Disc Degeneration. *Orthopaedic Surgery*, 13(3), 734-741. doi: 10.1111/os.12942.
- Gupta, D., Santoso, J. W., & McCain, M. L. (2021). Characterization of Gelatin Hydrogels Cross-Linked with Microbial Transglutaminase as Engineered Skeletal Muscle Substrates. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 8(1), 6. doi: 10.3390/bioengineering8010006.
- Gustafsson, Y., Haag, J., Jungebluth, P., Lundin, V., Lim, M. L., Baiguera, S., . . . Macchiarini, P. (2012). Viability and proliferation of rat MSCs on adhesion protein-modified PET and PU scaffolds. *Biomaterials*, 33(32), 8094-8103. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.060.
- Han, E., Chen, S. S., Klisch, S. M., & Sah, R. L. (2011). Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage. *Biophysical journal*, 101(4), 916-924. doi: 10.1016/j.bpj.2011.07.006.
- Highley, C. B., Prestwich, G. D., & Burdick, J. A. (2016). Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 40, 35-40. doi: 10.1016/j.copbio.2016.02.008.
- Hilibrand, A. S., & Robbins, M. (2004). Adjacent segment degeneration and adjacent segment disease: the consequences of spinal fusion? *The Spine Journal*, 4(6, Supplement), S190-S194. doi: 10.1016/j.spinee.2004.07.007.
- Hodgkinson, T., Shen, B., Diwan, A., Hoyland, J. A., & Richardson, S. M. (2019). Therapeutic potential of growth differentiation factors in the treatment of degenerative disc diseases. *JOR Spine*, 2(1), e1045-e1045. doi: 10.1002/jsp2.1045.
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, Supplement, 18-23. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010.

- Hom, W. W., Tschopp, M., Lin, H. A., Nasser, P., Laudier, D. M., Hecht, A. C., . . . Iatridis, J. C. (2019). Composite biomaterial repair strategy to restore biomechanical function and reduce herniation risk in an ex vivo large animal model of intervertebral disc herniation with varying injury severity. *PLOS ONE*, 14(5), e0217357. doi: 10.1371/journal.pone.0217357.
- Huang, Y. C., Leung, V. Y., Lu, W. W., & Luk, K. D. (2013). The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc. *Spine J*, 13(3), 352-362. doi: 10.1016/j.spinee.2012.12.005.
- Huang, Y. C., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., & Madihally, S. V. (2005). In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(36), 7616-7627. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.036.
- Hudson, K. D., Alimi, M., Grunert, P., Härtl, R., & Bonassar, L. J. (2013). Recent advances in biological therapies for disc degeneration: Tissue engineering of the annulus fibrosus, nucleus pulposus and whole intervertebral discs. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(5), 872-879. doi: 10.1016/j.copbio.2013.04.012.
- Hunt, N. C., Smith, A. M., Gbureck, U., Shelton, R. M., & Grover, L. M. (2010). Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3649-3656. doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.026.
- Hynes, R. O., & Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *The Journal of cell biology*, 150(2), F89-F96. doi: 10.1083/jcb.150.2.f89
- Iatridis, J. C., Nicoll, S. B., Michalek, A. J., Walter, B. A., & Gupta, M. S. (2013). Role of biomechanics in intervertebral disc degeneration and regenerative therapies: what needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair? *The Spine Journal*, 13(3), 243-262. doi: 10.1016/j.spinee.2012.12.002.
- Iatridis, J. C., Setton, L. A., Weidenbaum, M., & Mow, V. C. (1997). Alterations in the mechanical behavior of the human lumbar nucleus pulposus with degeneration and aging. *Journal of Orthopaedic Research*, 15(2), 318-322. doi: 10.1002/jor.1100150224.
- Iatridis, J. C., Weidenbaum, M., Setton, L. A., & Mow, V. C. (1996). Is the Nucleus Pulposus a Solid or a Fluid? Mechanical Behaviors of the Nucleus Pulposus of the Human Intervertebral Disc. *Spine*, 21(10), 1174-1184. doi: 10.1097/00007632-199605150-00009
- iData Research. (2018). How many spinal fusions are performed each year in the United States? Repéré le 22 Août 2020 à <https://idataresearch.com/how-many-instrumented-spinal-fusions-are-performed-each-year-in-the-united-states/>

- Imai, Y., Okuma, M., An, H. S., Nakagawa, K., Yamada, M., Muehleman, C., . . . Masuda, K. (2007). Restoration of Disc Height Loss by Recombinant Human Osteogenic Protein-1 Injection Into Intervertebral Discs Undergoing Degeneration Induced by an Intradiscal Injection of Chondroitinase ABC. *Spine*, 32(11). doi: 10.1097/BRS.0b013e3180574d26.
- Inoue, N., & Espinoza Orías, A. A. (2011). Biomechanics of intervertebral disk degeneration. *The Orthopedic clinics of North America*, 42(4), 487-vii. doi: 10.1016/j.ocl.2011.07.001.
- Inoue, N., & Orías, A. A. E. (2011). Biomechanics of intervertebral disk degeneration. *Orthopedic Clinics*, 42(4), 487-499. doi: 10.1016/j.ocl.2011.07.001
- Ishihara, H., Warensjo, K., Roberts, S., & Urban, J. P. G. (1997). Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: the role of extracellular osmolality. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 272(5), C1499-C1506. doi: 10.1152/ajpcell.1997.272.5.C1499
- Ishikawa, Y., & Wuthier, R. E. (1992). Development of an in vitro mineralization model with growth plate chondrocytes that does not require β -glycerophosphate. *Bone and mineral*, 17(2), 152-157. doi: 10.1016/0169-6009(92)90727-u
- ISO, I. (2009). 10993-5: 2009 Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. *International Organization for Standardization, Geneva*.
- Jaipan, P., Nguyen, A., & Narayan, R. J. (2017). Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *MRS Communications*, 7(3), 416-426. doi: 10.1557/mrc.2017.92.
- Johannessen, W., & Elliott, D. M. (2005). Effects of Degeneration on the Biphasic Material Properties of Human Nucleus Pulposus in Confined Compression. *Spine*, 30(24), E724-E729. doi: 10.1097/01.brs.0000192236.92867.15
- Johannessen, W., Vresilovic, E., Seguritan, J., & Elliott, D. (2004). Altered nucleus pulposus mechanics using chondroitinase-abc and genipin as a model of early disc degeneration. *Transactions of the Orthopaedic Research Society*, 29, 1150.
- Joshi, A., Fussell, G., Thomas, J., Hsuan, A., Lowman, A., Karduna, A., . . . Marcolongo, M. (2006). Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement. *Biomaterials*, 27(2), 176-184. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.003.
- Karak, N. (2012). 1 - Fundamentals of polymers. Dans N. Karak (Éd.), *Vegetable Oil-Based Polymers* (pp. 1-30). Woodhead Publishing. doi: 10.1533/9780857097149.1
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3-11. doi: 10.1016/j.addr.2009.09.004.

- Kim, D. J., Moon, S. H., Kim, H., Kwon, U. H., Park, M. S., Han, K. J., . . . Lee, H. M. (2003). Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. *Spine (Phila Pa 1976)*, 28(24), 2679-2684. doi: 10.1097/01.brs.0000101445.46487.16.
- Kim, J. S., Ellman, M. B., An, H. S., Van Wijnen, A. J., Borgia, J. A., & Im, H. J. (2010). Insulin-like growth factor 1 synergizes with bone morphogenetic protein 7-mediated anabolism in bovine intervertebral disc cells. *Arthritis & Rheumatism*, 62(12), 3706-3715. doi: 10.1002/art.27733
- Koschella, A., Hartlieb, M., & Heinze, T. (2011). A “click-chemistry” approach to cellulose-based hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 154-161. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.04.031.
- Kostuik, J. P. (1997). Intervertebral disc replacement: experimental study. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 337, 27-41. doi: 10.1097/00003086-199704000-00004
- Kotwal, S. A., Mohan, H., Bahadur, R., & Bal, A. (2002). A Clinicopathological Study Of Changes In Intervertebral Discs. *The Internet Journal of Pathology*, 2(2).
- Kumar, D., Gerges, I., Tamplenizza, M., Lenardi, C., Forsyth, N. R., & Liu, Y. (2014). Three-dimensional hypoxic culture of human mesenchymal stem cells encapsulated in a photocurable, biodegradable polymer hydrogel: a potential injectable cellular product for nucleus pulposus regeneration. *Acta Biomaterialia*, 10(8), 3463-3474. doi: 10.1016/j.actbio.2014.04.027
- Kumar, H., Ha, D.-H., Lee, E.-J., Park, J. H., Shim, J. H., Ahn, T.-K., . . . Han, I.-B. (2017). Safety and tolerability of intradiscal implantation of combined autologous adipose-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid in patients with chronic discogenic low back pain: 1-year follow-up of a phase I study. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 262. doi: 10.1186/s13287-017-0710-3.
- Kuo, C. K., & Ma, P. X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), 511-521. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00201-5.
- La Gelenk-Klinik. (2016). Transplantation autologue de cellules de disque intervertébral (TACD) - régénérer les disques intervertébraux. Repéré le 16 Mars 2017 à https://clinique-orthopedique-arthrose.com/traitemet-orthopedique/chirurgien-du-rachis-specialise/transplantation-autologue-cellules-disque-TACD.html#Price_of_ADCT

- Lammi, P., Inkinen, R. I., Von Der Mark, K., Puustjärvi, K., Arokoski, J., Hyttinen, M. M., & Lammi, M. J. (1998). Localization of type X collagen in the intervertebral disc of mature beagle dogs. *Matrix Biology*, 17(6), 449-453. doi: 10.1016/S0945-053X(98)90104-4.
- Lanir, Y. (2009). Mechanisms of Residual Stress in Soft Tissues. *Journal of Biomechanical Engineering*, 131(4). doi: 10.1115/1.3049863.
- Lavertu, M., Filion, D., & Buschmann, M. D. (2008). Heat-Induced Transfer of Protons from Chitosan to Glycerol Phosphate Produces Chitosan Precipitation and Gelation. *Biomacromolecules*, 9(2), 640-650. doi: 10.1021/bm700745d.
- Le Maitre, C. L., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (2005). The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Research & Therapy*, 7(4), R732. doi: 10.1186/ar1732
- Lebl, D., Cammisa, F., Girardi, F., Wright, T., & Abjornson, C. (2011). Analysis of Wear, Surface Properties, and Fixation of Explanted Cervical Total Disc Replacements. *The Spine Journal*, 11(10, Supplement), S45. doi: 10.1016/j.spinee.2011.08.119.
- Lebrun, J.-J. (2012). The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN molecular biology*, 2012, 381428-381428. doi: 10.5402/2012/381428.
- Lee, B. H., Shirahama, H., Cho, N.-J., & Tan, L. P. (2015). Efficient and controllable synthesis of highly substituted gelatin methacrylamide for mechanically stiff hydrogels. *RSC Advances*, 5(128), 106094-106097. doi: 10.1039/c5ra22028a.
- Leung, V. Y., Chan, D., & Cheung, K. M. (2006). Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *European Spine Journal*, 15(3), 406-413. doi: 10.1007/s00586-006-0183-z.
- Li, X., Kong, X., Zhang, J., Wang, Y., Wang, Y., Shi, S., . . . Qian, Z. (2011). PHARMACEUTICAL NANOTECHNOLOGY: A Novel Composite Hydrogel Based on Chitosan and Inorganic Phosphate for Local Drug Delivery of Camptothecin Nanocolloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 232-241. doi: 10.1002/jps.22256.
- Li, X., Leo, B. M., Beck, G., Balian, G., & Anderson, G. D. (2004). 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(20), 2229-2234. doi: 10.1097/01.brs.0000142427.82605.fb.

- Lim, S. M., Song, D. K., Oh, S. H., Lee-Yoon, D. S., Bae, E. H., & Lee, J. H. (2008). In vitro and in vivo degradation behavior of acetylated chitosan porous beads. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(4), 453-466. doi: 10.1163/156856208783719482.
- Lin, H., Tian, S., Peng, Y., Wu, L., Xiao, Y., Qing, X., & Shao, Z. (2022). IGF Signaling in Intervertebral Disc Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. doi: 10.3389/fcell.2021.817099.
- Lin, H. A., Varma, D. M., Hom, W. W., Cruz, M. A., Nasser, P. R., Phelps, R. G., . . . Nicoll, S. B. (2019). Injectable cellulose-based hydrogels as nucleus pulposus replacements: Assessment of in vitro structural stability, ex vivo herniation risk, and in vivo biocompatibility. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 96, 204-213. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.04.021.
- Lin, S., Zhang, Q., Shao, X., Zhang, T., Xue, C., Shi, S., . . . Lin, Y. (2017). IGF-1 promotes angiogenesis in endothelial cells/adipose-derived stem cells co-culture system with activation of PI3K/Akt signal pathway. *Cell Prolif*, 50(6). doi: 10.1111/cpr.12390.
- Lindblom, K. (1957). Intervertebral-disc degeneration considered as a pressure atrophy. *J Bone Joint Surg Am*, 39-a(4), 933-945.
- Liu, J., Zhang, S. M., Chen, P. P., Cheng, L., Zhou, W., Tang, W. X., . . . Ke, C. M. (2007). Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(11), 2205-2210. doi: 10.1007/s10856-007-3010-0.
- Liu, L., Tang, X., Wang, Y., & Guo, S. (2011). Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO₃ for injectable drug delivery system. *International journal of pharmaceutics*, 414(1-2), 6-15. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.04.052
- Loibl, M., Wuertz-Kozak, K., Vadala, G., Lang, S., Fairbank, J., & Urban, J. P. G. (2019). Controversies in regenerative medicine: Should intervertebral disc degeneration be treated with mesenchymal stem cells? *JOR Spine*, 2(1), e1043-e1043. doi: 10.1002/jsp2.1043.
- Lotz, J. C. (2004). Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned. *Spine*, 29(23), 2742-2750. doi: 10.1097/01.brs.0000146498.04628.f9
- Malonzo, C., Chan, S., Kabiri, A., Eglin, D., Grad, S., Bonél, H., . . . Gantenbein-Ritter, B. (2015). A papain-induced disc degeneration model for the assessment of thermo-reversible hydrogel-cells therapeutic approach. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(12), E167-E176. doi: 10.1002/jterm.1667

- Mao, J. S., Zhao, L. G., Yin, Y. J., & Yao, K. D. (2003). Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24(6), 1067-1074. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00442-8.
- Mapp, P. I., & Walsh, D. A. (2012). Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(7), 390-398. doi: 10.1038/nrrheum.2012.80.
- Martin, J. T., Milby, A. H., Chiaro, J. A., Kim, D. H., Hebel, N. M., Smith, L. J., . . . Mauck, R. L. (2014). Translation of an engineered nanofibrous disc-like angle-ply structure for intervertebral disc replacement in a small animal model. *Acta Biomater*, 10(6), 2473-2481. doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.024.
- Masuda, K. (2008). Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors. *European Spine Journal*, 17(4), 441. doi: 10.1007/s00586-008-0749-z
- Masuda, K., & An, H. S. (2004). Growth factors and the intervertebral disc. *Spine J*, 4. doi: 10.1016/j.spinee.2004.07.028.
- Maudens, P., Meyer, S., Seemayer, C. A., Jordan, O., & Allémann, E. (2018). Self-assembled thermoresponsive nanostructures of hyaluronic acid conjugates for osteoarthritis therapy. *Nanoscale*, 10(4), 1845-1854. doi: 10.1039/c7nr07614b
- Meisel, H. J., Siodla, V., Ganey, T., Minkus, Y., Hutton, W. C., & Alasevic, O. J. (2007). Clinical experience in cell-based therapeutics: Disc chondrocyte transplantation: A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomolecular Engineering*, 24(1), 5-21. doi: 10.1016/j.bioeng.2006.07.002.
- Melching, L., & Roughley, P. (1985). The role of link protein in mediating the interaction between hyaluronic acid and newly secreted proteoglycan subunits from adult human articular cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 260(30), 16279-16285. doi: 10.1016/S0021-9258(17)36233-6.
- Melrose, J., Ghosh, P., & Taylor, T. K. (1989). Lysozyme, a major low-molecular-weight cationic protein of the intervertebral disc, which increases with ageing and degeneration. *Gerontology*, 35(4), 173-180. doi: 10.1159/000213019.
- Melrose, J., Smith, S. M., Appleyard, R. C., & Little, C. B. (2008). Aggrecan, versican and type VI collagen are components of annular translamellar crossbridges in the intervertebral disc. *European Spine Journal*, 17(2), 314-324. doi: 10.1007/s00586-007-0538-0.

- Michalek, A. J., & Iatridis, J. C. (2012). Height and torsional stiffness are most sensitive to annular injury in large animal intervertebral discs. *The Spine Journal*, 12(5), 425-432. doi: 10.1016/j.spinee.2012.04.001.
- Mimura, M., Panjabi, M. M., Oxland, T. R., Crisco, J. J., Yamamoto, I., & Vasavada, A. (1994). Disc degeneration affects the multidirectional flexibility of the lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976)*, 19(12), 1371-1380. doi: 10.1097/00007632-199406000-00011.
- Minogue, B. M., Richardson, S. M., Zeef, L. A., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (2010). Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum*, 62(12), 3695-3705. doi: 10.1002/art.27710.
- Miyamoto, K., Masuda, K., Kim, J. G., Inoue, N., Akeda, K., Andersson, G. B., & An, H. S. (2006). Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs. *Spine J*, 6(6), 692-703. doi: 10.1016/j.spinee.2006.04.014.
- Mizuno, H., Roy, A. K., Vacanti, C. A., Kojima, K., Ueda, M., & Bonassar, L. J. (2004). Tissue-engineered composites of anulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement. *Spine (Phila Pa 1976)*, 29(12), 1290-1297; discussion 1297-1298. doi: 10.1097/01.brs.0000128264.46510.27.
- Mizuno, H., Roy, A. K., Zaporajan, V., Vacanti, C. A., Ueda, M., & Bonassar, L. J. (2006). Biomechanical and biochemical characterization of composite tissue-engineered intervertebral discs. *Biomaterials*, 27(3), 362-370. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.042.
- Monette, A., Ceccaldi, C., Assaad, E., Lerouge, S., & Lapointe, R. (2016). Chitosan thermogels for local expansion and delivery of tumor-specific T lymphocytes towards enhanced cancer immunotherapies. *Biomaterials*, 75, 237-249. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.021.
- Moore, R. J. (2000). The vertebral end-plate: what do we know? *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 9(2), 92-96. doi: 10.1007/s005860050217.
- Mortisen, D., Peroglio, M., Alini, M., & Eglin, D. (2010). Tailoring thermoreversible hyaluronan hydrogels by "click" chemistry and RAFT polymerization for cell and drug therapy. *Biomacromolecules*, 11(5), 1261-1272. doi: 10.1021/bm100046n.

- Murab, S., Samal, J., Shrivastava, A., Ray, A. R., Pandit, A., & Ghosh, S. (2015). Glucosamine loaded injectable silk-in-silk integrated system modulate mechanical properties in bovine ex-vivo degenerated intervertebral disc model. *Biomaterials*, 55, 64-83. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.03.032.
- Mwale, F., Demers, C. N., Petit, A., Roughley, P. J., Poole, A. R., Steffen, T., . . . Antoniou, J. (2003). A synthetic peptide of link protein stimulates the biosynthesis of collagens II, IX and proteoglycan by cells of the intervertebral disc. *J Cell Biochem*, 88. doi: 10.1002/jcb.10479.
- Mwale, F., Iordanova, M., Demers, C. N., Steffen, T., Roughley, P., & Antoniou, J. (2005). Biological evaluation of chitosan salts cross-linked to genipin as a cell scaffold for disk tissue engineering. *Tissue engineering*, 11(1-2), 130-140. doi: 10.1089/ten.2005.11.130
- Mwale, F., Masuda, K., Pichika, R., Epure, L. M., Yoshikawa, T., Hemmad, A., . . . Antoniou, J. (2011). The efficacy of Link N as a mediator of repair in a rabbit model of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Research & Therapy*, 13(4), R120. doi: 10.1186/ar3423.
- Mwale, F., Roughley, P., & Antoniou, J. (2004). Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc. *Eur Cell Mater*, 8(58), 63-64. doi: 10.22203/ecm.v008a06
- Mwale, F., Wang, H. T., Roughley, P., Antoniou, J., & Haglund, L. (2014). Link N and mesenchymal stem cells can induce regeneration of the early degenerate intervertebral disc. *Tissue Eng Part A*, 20(21-22), 2942-2949. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0749.
- Nair, L. S., Starnes, T., Ko, J.-W. K., & Laurencin, C. T. (2007). Development of injectable thermogelling chitosan–inorganic phosphate solutions for biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(12), 3779-3785. doi: 10.1021/bm7006967
- Nair, M. B., Baranwal, G., Vijayan, P., Keyan, K. S., & Jayakumar, R. (2015). Composite hydrogel of chitosan–poly(hydroxybutyrate-co-valerate) with chondroitin sulfate nanoparticles for nucleus pulposus tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 84-92. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.026.
- Neidlinger-Wilke, C., Würtz, K., Liedert, A., Schmidt, C., Börm, W., Ignatius, A., . . . Claes, L. (2005). A three-dimensional collagen matrix as a suitable culture system for the comparison of cyclic strain and hydrostatic pressure effects on intervertebral disc cells. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 2(4), 457-465. doi: 10.3171/spi.2005.2.4.0457.

- Neidlinger-Wilke, C., Mietsch, A., Rinkler, C., Wilke, H. J., Ignatius, A., & Urban, J. P. G. (2012). Interactions of environmental conditions and mechanical loads have influence on matrix turnover by nucleus pulposus cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(1), 112-121. doi: 10.1002/jor.21481
- Nerurkar, N. L., Elliott, D. M., & Mauck, R. L. (2007). Mechanics of oriented electrospun nanofibrous scaffolds for annulus fibrosus tissue engineering. *J Orthop Res*, 25(8), 1018-1028. doi: 10.1002/jor.20384.
- Newell, N., Grigoriadis, G., Christou, A., Carpanen, D., & Masouras, S. D. (2017). Material properties of bovine intervertebral discs across strain rates. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 65(Supplement C), 824-830. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.10.012.
- Newell, N., Rivera Tapia, D., Rahman, T., Lim, S., O'Connell, G. D., & Holsgrove, T. P. (2020). Influence of testing environment and loading rate on intervertebral disc compressive mechanics: An assessment of repeatability at three different laboratories. *JOR Spine*, 3(3), e21110. doi: 10.1002/jsp2.1110
- Ng, W. L., Yeong, W. Y., & Naing, M. W. (2016). Development of Polyelectrolyte Chitosan-gelatin Hydrogels for Skin Bioprinting. *Procedia CIRP*, 49, 105-112. doi: 10.1016/j.procir.2015.09.002.
- Nguyen, D., Hägg, D. A., Forsman, A., Ekholm, J., Nimkingratana, P., Brantsing, C., . . . Simonsson, S. (2017). Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink. *Scientific Reports*, 7(1), 658. doi: 10.1038/s41598-017-00690-y.
- Nguyen, T. H., Randolph, D. C., Talmage, J., Succop, P., & Travis, R. (2011). Long-term outcomes of lumbar fusion among workers' compensation subjects: a historical cohort study. *Spine*, 36(4), 320-331. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181ccc220
- Nikawa, T., Schuch, G., Wagner, G., & Sies, H. (1994). Interaction of ebselen with glutathione S-transferase and papain in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 47(6), 1007-1012. doi: 10.1016/0006-2952(94)90411-1.
- Noorwali, H., Grant, M. P., Epure, L. M., Madiraju, P., Sampen, H.-J., Antoniou, J., & Mwale, F. (2018). Link N as a therapeutic agent for discogenic pain. *JOR Spine*, 1(1), e1008-e1008. doi: 10.1002/jsp2.1008.
- Noriega, D. C., Ardura, F., Hernández-Ramajo, R., Martín-Ferrero, M. Á., Sánchez-Lite, I., Toribio, B., . . . Sánchez, A. (2017). Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: a randomized controlled trial. *Transplantation*, 101(8), 1945-1951. doi: 10.1097/TP.0000000000001484

- O'Halloran, D. M., & Pandit, A. S. (2007). Tissue-engineering approach to regenerating the intervertebral disc. *Tissue engineering*, 13(8), 1927-1954. doi: 10.1089/ten.2005.0608
- Orozco, L., Soler, R., Morera, C., Alberca, M., Sánchez, A., & García-Sancho, J. (2011). Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation*, 92(7), 822-828. doi: 10.1097/TP.0b013e3182298a15
- Osada, R., Ohshima, H., Ishihara, H., Yudoh, K., Sakai, K., Matsui, H., & Tsuji, H. (1996). Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. *J Orthop Res*, 14(5), 690-699. doi: 10.1002/jor.1100140503.
- Oxland, T. R., Lund, T., Jost, B., Cripton, P., Lippuner, K., Jaeger, P., & Nolte, L. P. (1996). The relative importance of vertebral bone density and disc degeneration in spinal flexibility and interbody implant performance. An in vitro study. *Spine (Phila Pa 1976)*, 21(22), 2558-2569. doi: 10.1097/00007632-199611150-00005.
- Panebianco, C., Meyers, J., Gansau, J., Hom, W., & Iatridis, J. (2020). Balancing biological and biomechanical performance in intervertebral disc repair: a systematic review of injectable cell delivery biomaterials. *European cells & materials*, 40, 239. doi: 10.22203/eCM.v040a15
- Panjabi, M. M. (1992). The stabilizing system of the spine. Part I. Function, dysfunction, adaptation, and enhancement. *Journal of spinal disorders*, 5, 383-383. doi: 10.1097/00002517-199212000-00001
- Park, J. S., & Ahn, J. I. (1995). The effect of chondroitinase ABC on rabbit intervertebral disc. Radiological, histological and electron microscopic findings. *Int Orthop*, 19(2), 103-109. doi: 10.1007/bf00179970.
- Patel, S. A., Kepler, C. K., Schaer, T. P., & Anderson, D. G. (2014). Large animal models of disc degeneration. Dans *The Intervertebral Disc* (pp. 291-303). Springer.
- Peeters, M., Detiger, S. E. L., Karfeld-Sulzer, L. S., Smit, T. H., Yayon, A., Weber, F. E., & Helder, M. N. (2015). BMP-2 and BMP-2/7 Heterodimers Conjugated to a Fibrin/Hyaluronic Acid Hydrogel in a Large Animal Model of Mild Intervertebral Disc Degeneration. *BioResearch open access*, 4(1), 398-406. doi: 10.1089/biores.2015.0025.
- Périé, D., Korda, D., & Iatridis, J. C. (2005). Confined compression experiments on bovine nucleus pulposus and annulus fibrosus: sensitivity of the experiment in the determination of compressive modulus and hydraulic permeability. *Journal of Biomechanics*, 38(11), 2164-2171. doi: 10.1016/j.jbiomech.2004.10.002.

- Peroglio, M., Eglin, D., Benneker, L. M., Alini, M., & Grad, S. (2013). Thermoreversible hyaluronan-based hydrogel supports in vitro and ex vivo disc-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *The Spine Journal*, 13(11), 1627-1639. doi: 10.1016/j.spinee.2013.05.029
- Peroglio, M., Grad, S., Mortisen, D., Sprecher, C. M., Illien-Jünger, S., Alini, M., & Eglin, D. (2012). Injectable thermoreversible hyaluronan-based hydrogels for nucleus pulposus cell encapsulation. *European Spine Journal*, 21(6), 839-849. doi: 10.1007/s00586-011-1976-2.
- Petit, A., Yao, G., Rowas, S. A., Gawri, R., Epure, L. M., Antoniou, J., & Mwale, F. (2011). Effect of synthetic Link N peptide on the type I and type II collagens in human intervertebral discs cells. *Tissue Eng Part A*, 17. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0494.
- Pfirrmann, C. W., Metzdorf, A., Zanetti, M., Hodler, J., & Boos, N. (2001). Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine*, 26(17), 1873-1878. doi: 10.1097/00007632-200109010-00011
- Pooni, J. S., Hukins, D. W., Harris, P. F., Hilton, R. C., & Davies, K. E. (1986). Comparison of the structure of human intervertebral discs in the cervical, thoracic and lumbar regions of the spine. *Surg Radiol Anat*, 8(3), 175-182. doi: 10.1007/bf02427846.
- Pratsinis, H., & Kletsas, D. (2007). PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *European Spine Journal*, 16(11), 1858-1866. doi: 10.1007/s00586-007-0408-9.
- Priyadarshani, P., Li, Y., & Yao, L. (2016). Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(2), 206-212. doi: 10.1016/j.joca.2015.08.014
- Raj, P. P. (2008). Intervertebral Disc: Anatomy-Physiology-Pathophysiology-Treatment. *Pain Practice*, 8(1), 18-44. doi: 10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x.
- Rannou, F., Mayoux-Benhamou, M. A., Poiraudeau, S., & Revel, M. (2004). Disque intervertébral et structures voisines de la colonne lombaire : anatomie, biologie, physiologie et biomécanique. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie*, 1(6), 487-507. doi: 10.1016/j.emcrho.2003.11.007.
- Ray, C. (2002). The PDN® prosthetic disc-nucleus device. *European Spine Journal*, 11(2), S137-S142. doi: 10.1007/s00586-002-0425-7.

- Recuerda, M., Coté, S.-P., Villemure, I., & Périé, D. (2011). Influence of experimental protocols on the mechanical properties of the intervertebral disc in unconfined compression. *Journal of Biomechanical Engineering*, 133(7), 071006. doi: 10.1115/1.4004411
- Rederstorff, E., Fatimi, A., Sinquin, C., Ratiskol, J., Merceron, C., Vinatier, C., . . . Collicet-Jouault, S. (2011). Sterilization of exopolysaccharides produced by deep-sea bacteria: Impact on their stability and degradation. *Marine drugs*, 9(2), 224-241. doi: 10.3390/md9020224
- Regnault, M., & Faivre, E. (2012). Hernie discale : un disque intervertébral en cause. Repéré le 08 Février 2017 sur Futura Santé à <http://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-mal-dos-loupe-1277/page/7/>
- Regrow. (2010). Cell Therapy. Repéré le 25 Février 2017 sur Regrow à <http://regrow.in/CellTherapy.html#>
- Remillieux, M. (2017). Arthrosystémique du rachis en ostéopathie. Repéré le 23 Septembre 2020 sur Elsevier
- Richardson, S. M., Hughes, N., Hunt, J. A., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (2008). Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials*, 29(1), 85-93. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.018.
- Richardson, S. M., Walker, R. V., Parker, S., Rhodes, N. P., Hunt, J. A., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (2006). Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem cells*, 24(3), 707-716. doi: 10.1634/stemcells.2005-0205
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- Risbud, M. V., Schipani, E., & Shapiro, I. M. (2010). Hypoxic regulation of nucleus pulposus cell survival: from niche to notch. *The American journal of pathology*, 176(4), 1577-1583. doi: 10.2353/ajpath.2010.090734.
- Roberts, A. B., McCune, B. K., & Sporn, M. B. (1992). TGF- β : Regulation of extracellular matrix. *Kidney International*, 41(3), 557-559. doi: 10.1038/ki.1992.81.
- Roberts, S., Menage, J., Sivan, S., & Urban, J. P. G. (2008). Bovine explant model of degeneration of the intervertebral disc. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 9, 24-24. doi: 10.1186/1471-2474-9-24.
- Rong, Y., Sugumaran, G., Silbert, J. E., & Spector, M. (2002). Proteoglycans synthesized by canine intervertebral disc cells grown in a type I collagen-glycosaminoglycan matrix. *Tissue Eng*, 8(6), 1037-1047. doi: 10.1089/107632702320934137.

- Rosenzweig, D., Gravel, J. T., Bisson, D., Ouellet, J., Weber, M., & Haglund, L. (2017). Comparative analysis in continuous expansion of bovine and human primary nucleus pulposus cells for tissue repair applications. doi: 10.22203/eCM.v033a18
- Roughley, P. (2004). Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine*, 29(23), 2691-2699. doi: 10.1097/01.brs.0000146101.53784.b1.
- Roughley, P., Hoemann, C., DesRosiers, E., Mwale, F., Antoniou, J., & Alini, M. (2006). The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation. *Biomaterials*, 27(3), 388-396. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.037.
- Sakai, D., Mochida, J., Yamamoto, Y., Nomura, T., Okuma, M., Nishimura, K., . . . Hotta, T. (2003). Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen® gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials*, 24(20), 3531-3541. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00222-9.
- Sakai, D., & Schol, J. (2017). Cell therapy for intervertebral disc repair: Clinical perspective. *Journal of Orthopaedic Translation*, 9, 8-18. doi: 10.1016/j.jot.2017.02.002.
- Schmitz, T. C., Salzer, E., Crispim, J. F., Fabra, G. T., LeVisage, C., Pandit, A., . . . Ito, K. (2020). Characterization of Biomaterials Intended for Use in the Nucleus Pulpous of Degenerated Intervertebral Discs. *Acta Biomaterialia*. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.001.
- Schutgens, E. M., Tryfonidou, M. A., Smit, T. H., Öner, F. C., Krouwels, A., Ito, K., & Creemers, L. B. (2015). Biomaterials for intervertebral disc regeneration: past performance and possible future strategies. *Eur Cell Mater*, 30, 210-231. doi: 10.22203/ecm.v030a15.
- Sebastine, I. M., & Williams, D. J. (2007). Current Developments in Tissue Engineering of Nucleus Pulposus for the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration. Dans *Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. EMBS 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE* (pp. 6400-6405). doi: 10.1109/IEMBS.2007.4353821
- Servier Medical Art. (s.d.). Vertebral column. Repéré le 21 Septembre 2020 à https://smart.servier.com/smart_image/vertebral-column-2/
- Shankar, H., Scarlett, J. A., & Abram, S. E. (2009). Anatomy and pathophysiology of intervertebral disc disease. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management*, 13(2), 67-75. doi: 10.1053/j.trap.2009.05.001.
- Shapiro, I. M., & Risbud, M. V. (2013). *The Intervertebral Disc: Molecular and Structural Studies of the Disc in Health and Disease*. Springer Wien. Repéré à <https://books.google.ca/books?id=ixC7BAAQBAJ>

- Shapiro, I. M., & Risbud, M. V. (2014). Introduction to the Structure, Function, and Comparative Anatomy of the Vertebrae and the Intervertebral Disc. Dans I. M. Shapiro & M. V. Risbud (Éds.), *The Intervertebral Disc: Molecular and Structural Studies of the Disc in Health and Disease* (pp. 3-15). Vienna: Springer Vienna. doi: 10.1007/978-3-7091-1535-0_1
- Sharifi, S., Bulstra, S. K., Grijpma, D. W., & Kuijer, R. (2015). Treatment of the degenerated intervertebral disc; closure, repair and regeneration of the annulus fibrosus. *J Tissue Eng Regen Med*, 9(10), 1120-1132. doi: 10.1002/term.1866.
- Shin, H., Temenoff, J. S., & Mikos, A. G. (2003). In vitro cytotoxicity of unsaturated oligo[poly(ethylene glycol) fumarate] macromers and their cross-linked hydrogels. *Biomacromolecules*, 4(3), 552-560. doi: 10.1021/bm020121m.
- Silva-Correia, J., Correia, S. I., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2013). Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1514-1531. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.010.
- Sivan, S. S., Roberts, S., Urban, J. P. G., Menage, J., Bramhill, J., Campbell, D., . . . Tighe, B. J. (2014). Injectable hydrogels with high fixed charge density and swelling pressure for nucleus pulposus repair: Biomimetic glycosaminoglycan analogues. *Acta Biomaterialia*, 10(3), 1124-1133. doi: 10.1016/j.actbio.2013.11.010.
- Sloan, S. R., Wipplinger, C., Kirnaz, S., Navarro-Ramirez, R., Schmidt, F., McCloskey, D., . . . Bonassar, L. J. (2020). Combined nucleus pulposus augmentation and annulus fibrosus repair prevents acute intervertebral disc degeneration after discectomy. *Science Translational Medicine*, 12(534), eaay2380. doi: doi:10.1126/scitranslmed.aay2380.
- Smith, L. J., Gorth, D. J., Showalter, B. L., Chiaro, J. A., Beattie, E. E., Elliott, D. M., . . . Malhotra, N. R. (2014). In Vitro Characterization of a Stem-Cell-Seeded Triple-Interpenetrating-Network Hydrogel for Functional Regeneration of the Nucleus Pulposus. *Tissue Engineering. Part A*, 20(13-14), 1841-1849. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0516.
- Snider, R. K., Krumwiede, N. K., Snider, L. J., Jurist, J. M., Lew, R. A., & Katz, J. N. (1999). Factors affecting lumbar spinal fusion. *Clinical Spine Surgery*, 12(2), 107-114.
- Sobajima, S., Vadala, G., Shimer, A., Kim, J. S., Gilbertson, L. G., & Kang, J. D. (2008). Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *The Spine Journal*, 8(6), 888-896. doi: 10.1016/j.spinee.2007.09.011.
- Sperling, L. H. (1994). Interpenetrating Polymer Networks: An Overview. Dans *Interpenetrating Polymer Networks* (Vol. 239, pp. 3-38). American Chemical Society. doi: 10.1021/ba-1994-0239.ch001

- Spillekom, S., Smolders, L. A., Grinwis, G. C., Arkesteyn, I. T., Ito, K., Meij, B. P., & Tryfonidou, M. A. (2014). Increased osmolarity and cell clustering preserve canine notochordal cell phenotype in culture. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 20(8), 652-662. doi: 10.1089/ten.TEC.2013.0479
- Stoyanov, J. V., Gantenbein-Ritter, B., Bertolo, A., Aebli, N., Baur, M., Alini, M., & Grad, S. (2011). Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *Eur Cell Mater*, 21, 533-547. doi: 10.22203/ecm.v021a40.
- Sun, Z., Liu, B., & Luo, Z.-J. (2020). The Immune Privilege of the Intervertebral Disc: Implications for Intervertebral Disc Degeneration Treatment. *International journal of medical sciences*, 17(5), 685-692. doi: 10.7150/ijms.42238.
- Taheri, S., Bao, G., He, Z., Mohammadi, S., Ravanbakhsh, H., Lessard, L., . . . Mongeau, L. (2022). Injectable, Pore-Forming, Perfusionable Double-Network Hydrogels Resilient to Extreme Biomechanical Stimulations. *Advanced Science*, 9(2), 2102627. doi: 10.1002/advs.202102627
- Tang, G., Zhou, B., Li, F., Wang, W., Liu, Y., Wang, X., . . . Ye, X. (2020). Advances of Naturally Derived and Synthetic Hydrogels for Intervertebral Disk Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 745-745. doi: 10.3389/fbioe.2020.00745.
- Tang, R., Jing, L., Willard, V. P., Wu, C.-l., Guilak, F., Chen, J., & Setton, L. A. (2018). Differentiation of human induced pluripotent stem cells into nucleus pulposus-like cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 1-12. doi: 10.1186/s13287-018-0797-1
- Teraguchi, M., Yoshimura, N., Hashizume, H., Muraki, S., Yamada, H., Minamide, A., . . . Yoshida, M. (2014). Prevalence and distribution of intervertebral disc degeneration over the entire spine in a population-based cohort: the Wakayama Spine Study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(1), 104-110. doi: 10.1016/j.joca.2013.10.019.
- The Boston Stem Cell Center. (2021). Stem Cell Therapy Injections to Treat Intervertebral Disc Pain. Repéré le 07 Mai 2021 sur The Boston Stem Cell Center à <https://www.bostonstemcell.com/conditions-treated/stem-cell-treatment-for-spine-and-back-pain/degenerative-disc-disease/>
- Thompson, J. P., Oegema, T. R., Jr., & Bradford, D. S. (1991). Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine (Phila Pa 1976)*, 16(3), 253-260. doi: 10.1097/00007632-199103000-00001.

- Thompson, J. P., Pearce, R. H., Schechter, M. T., Adams, M. E., Tsang, I. K., & Bishop, P. B. (1990). Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc. *Spine*, 15(5), 411-415. doi: 10.1097/00007632-199005000-00012.
- Thonar, E., An, H., & Masuda, K. (2002). Compartmentalization of the matrix formed by nucleus pulposus and annulus fibrosus cells in alginate gel. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 874-878. doi: 10.1042/bst0300874
- Thorpe, A. A., Boyes, V. L., Sammon, C., & Le Maitre, C. L. (2016). Thermally triggered injectable hydrogel, which induces mesenchymal stem cell differentiation to nucleus pulposus cells: Potential for regeneration of the intervertebral disc. *Acta Biomaterialia*, 36, 99-111. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.029.
- Thorpe, A. A., Dougill, G., Vickers, L., Reeves, N. D., Sammon, C., Cooper, G., & Le Maitre, C. L. (2017). Thermally Triggered Hydrogel Injection Into Bovine Intervertebral Disc Tissue Explants Induces Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells And Restores Mechanical Function. *Acta Biomaterialia*. doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.010.
- Travascio, F., Elmasry, S., & Asfour, S. (2014). Modeling the role of IGF-1 on extracellular matrix biosynthesis and cellularity in intervertebral disc. *Journal of Biomechanics*, 47(10), 2269-2276. doi: 10.1016/j.jbiomech.2014.04.046.
- Tsaryk, R., Gloria, A., Russo, T., Anspach, L., De Santis, R., Ghanaati, S., . . . Kirkpatrick, C. J. (2015). Collagen-low molecular weight hyaluronic acid semi-interpenetrating network loaded with gelatin microspheres for cell and growth factor delivery for nucleus pulposus regeneration. *Acta Biomaterialia*, 20, 10-21. doi: 10.1016/j.actbio.2015.03.041
- Tschugg, A., Diepers, M., Simone, S., Michnacs, F., Quirbach, S., Strowitzki, M., . . . Thomé, C. (2017). A prospective randomized multicenter phase I/II clinical trial to evaluate safety and efficacy of NOVOCART disk plus autologous disk chondrocyte transplantation in the treatment of nucleotomized and degenerative lumbar disks to avoid secondary disease: safety results of Phase I—a short report. *Neurosurgical review*, 40(1), 155-162. doi: 10.1007/s10143-016-0781-0
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 414-433. doi: 10.1016/j.msec.2015.07.053.
- Urban, J. P. G., & Maroudas, A. (1980). The chemistry of the intervertebral disc in relation to its physiological function and requirements. *Clinics in Rheumatic Diseases*, 6(1), 51-76. doi: 10.1016/S0307-742X(21)00280-0.

- Urban, J. P. G., & McMullin, J. F. (1985). Swelling pressure of the intervertebral disc: influence of proteoglycan and collagen contents. *Biorheology*, 22(2), 145-157. doi: 10.3233/bir-1985-22205.
- Urban, J. P. G., & Roberts, S. (1995). Developpement and degeneration of the intervertebral discs. *Molecular Medicine Today*, 1(7), 329-335. doi: 10.1016/s1357-4310(95)80032-8
- Urban, J. P. G., & Roberts, S. (2003). Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Research & Therapy*, 5(3), 120-130. doi: 10.1186/ar629.
- Urban, J. P. G., Roberts, S., & Ralphs, J. R. (2000). The Nucleus of the Intervertebral Disc from Development to Degeneration1. *American Zoologist*, 40(1), 53-061. doi: 10.1093/icb/40.1.53.
- van Deursen, D. L., Snijders, C. J., Kingma, I., & van Dieën, J. H. (2001). In vitro torsion-induced stress distribution changes in porcine intervertebral discs. *Spine*, 26(23), 2582-2586. doi: 10.1097/00007632-200112010-00011
- van Dijk, B., Potier, E., & Ito, K. (2011). Culturing bovine nucleus pulposus explants by balancing medium osmolarity. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(11), 1089-1096. doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0215
- Van Vlierberghe, S., Graulus, G. J., Keshari Samal, S., Van Nieuwenhove, I., & Dubrule, P. (2014). Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. Dans P. A. Netti (Éd.), *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications* (pp. 335-390). Woodhead Publishing. doi: 10.1533/9780857097033.2.335
- Varma, D. M., Lin, H. A., Long, R. G., Gold, G. T., Hecht, A. C., Iatridis, J. C., & Nicoll, S. B. (2018). Thermoresponsive, redox-polymerized cellulosic hydrogels undergo in situ gelation and restore intervertebral disc biomechanics post discectomy. *European cells & materials*, 35, 300-317. doi: 10.22203/eCM.v035a21.
- Venn, G., & Mason, R. M. (1986). Changes in mouse intervertebral-disc proteoglycan synthesis with age. Hereditary kyphoscoliosis is associated with elevated synthesis. *Biochem J*, 234(2), 475-479. doi: 10.1042/bj2340475.
- Vergroesen, P. P. A., Kingma, I., Emanuel, K. S., Hoogendoorn, R. J. W., Welting, T. J., van Royen, B. J., . . . Smit, T. H. (2015). Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(7), 1057-1070. doi: 10.1016/j.joca.2015.03.028.

- Vergroesen, P. P. A., van der Veen, A. J., Emanuel, K. S., van Dieën, J. H., & Smit, T. H. (2016). The poro-elastic behaviour of the intervertebral disc: a new perspective on diurnal fluid flow. *Journal of Biomechanics*, 49(6), 857-863. doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.11.041
- Vernengo, J., Fussell, G. W., Smith, N. G., & Lowman, A. M. (2008). Evaluation of novel injectable hydrogels for nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84B(1), 64-69. doi: 10.1002/jbm.b.30844.
- Virginia Spine Specialists. (2015). How to Make Your Spinal Fusion Surgery a Success. Repéré le 17 Fevrier 2017 sur Virginia Spine Specialists à <http://www.virginiaspinespecialists.com/make-spinal-fusion-surgery-success/>
- Walsh, A. J., Bradford, D. S., & Lotz, J. C. (2004). In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine*, 29(2), 156-163. doi: 10.1097/01.BRS.0000107231.67854.9F
- Wang, H., Hansen, M. B., Löwik, D. W. P. M., van Hest, J. C. M., Li, Y., Jansen, J. A., & Leeuwenburgh, S. C. G. (2011). Oppositely Charged Gelatin Nanospheres as Building Blocks for Injectable and Biodegradable Gels. *Advanced Materials*, 23(12), H119-H124. doi: 10.1002/adma.201003908.
- Wang, J.-L., Tsai, Y.-C., & Wang, Y.-H. (2007). The leakage pathway and effect of needle gauge on degree of disc injury post anular puncture: a comparative study using aged human and adolescent porcine discs. *Spine*, 32(17), 1809-1815. doi: 10.1097/BRS.0b013e31811ec282
- Wang, Y., Zhang, Y., Chen, K., Shao, F., Wu, Y., Guo, C., . . . Wang, H. (2021). Injectable nanostructured colloidal gels resembling native nucleus pulposus as carriers of mesenchymal stem cells for the repair of degenerated intervertebral discs. *Materials Science and Engineering: C*, 128, 112343. doi: 10.1016/j.msec.2021.112343.
- Wang, Z., Weitzmann, M. N., Sangadala, S., Hutton, W. C., & Yoon, S. T. (2013). Link protein N-terminal peptide binds to bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor and drives matrix protein expression in rabbit intervertebral disc cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28243-28253.
- Wang, Z., Perez-Terzic, C. M., Smith, J., Mauck, W. D., Shelerud, R. A., Maus, T. P., . . . Qu, W. (2015). Efficacy of intervertebral disc regeneration with stem cells — A systematic review and meta-analysis of animal controlled trials. *Gene*, 564(1), 1-8. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.022.
- Watanabe, T., Sakai, D., Yamamoto, Y., Iwashina, T., Serigano, K., Tamura, F., & Mochida, J. (2010). Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(5), 623-630. doi: 10.1002/jor.21036

- Whatley, B. R., & Wen, X. (2012). Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 32(2), 61-77. doi: 10.1016/j.msec.2011.10.011.
- Wilke, H.-J., Krischak, S., Wenger, K., & Claes, L. (1997). Load-displacement properties of the thoracolumbar calf spine: experimental results and comparison to known human data. *European Spine Journal*, 6(2), 129-137. doi: 10.1007/BF01358746
- Wilke, H.-J., Neef, P., Caimi, M., Hoogland, T., & Claes, L. E. (1999). New In Vivo Measurements of Pressures in the Intervertebral Disc in Daily Life. *Spine*, 24(8), 755-762. doi: 10.1097/00007632-199904150-00005
- Willem, N., Bach, F. C., Plomp, S. G., van Rijen, M. H., Wolfswinkel, J., Grinwis, G. C., . . . Tryfonidou, M. A. (2015). Intradiscal application of rhBMP-7 does not induce regeneration in a canine model of spontaneous intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*, 17(1), 137. doi: 10.1186/s13075-015-0625-2.
- Wiltsey, C., Kubinski, P., Christiani, T., Toomer, K., Sheehan, J., Branda, A., . . . Vernengo, J. (2013). Characterization of injectable hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide)-g-chondroitin sulfate with adhesive properties for nucleus pulposus tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(4), 837-847. doi: 10.1007/s10856-013-4857-x.
- Winter, H. H., & Chambon, F. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *Journal of rheology*, 30(2), 367-382. doi: 10.1122/1.549853.
- Wu, D., Tan, J., Yao, L., Tian, J., Luo, B., Li, L., . . . Lu, L. (2021). Customized composite intervertebral disc scaffolds by integrated 3D bioprinting for therapeutic implantation. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 147, 106468. doi: 10.1016/j.compositesa.2021.106468.
- Wu, P. H., Kim, H. S., & Jang, I.-T. (2020). Intervertebral Disc Diseases PART 2: A Review of the Current Diagnostic and Treatment Strategies for Intervertebral Disc Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2135. doi: 10.3390/ijms21062135
- Wuertz, K., Urban, J. P. G., Klasen, J., Ignatius, A., Wilke, H. J., Claes, L., & Neidlinger-Wilke, C. (2007). Influence of extracellular osmolarity and mechanical stimulation on gene expression of intervertebral disc cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(11), 1513-1522. doi: 10.1002/jor.20436
- Xavier, J. R., Thakur, T., Desai, P., Jaiswal, M. K., Sears, N., Cosgriff-Hernandez, E., . . . Gaharwar, A. K. (2015). Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. *ACS nano*, 9(3), 3109-3118. doi: 10.1021/nn507488s

- Xia, W., Liu, W., Cui, L., Liu, Y., Zhong, W., Liu, D., . . . Cao, Y. (2004). Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 71(2), 373-380. doi: 10.1002/jbm.b.30087
- Yang, W., Yu, X.-H., Wang, C., He, W.-S., Zhang, S.-J., Yan, Y.-G., . . . Wang, W.-J. (2015). Interleukin-1 β in intervertebral disk degeneration. *Clinica Chimica Acta*, 450, 262-272. doi: 10.1016/j.cca.2015.08.029.
- Yang, X., & Li, X. (2009). Nucleus pulposus tissue engineering: a brief review. *European Spine Journal*, 18(11), 1564. doi: 10.1007/s00586-009-1092-8.
- Yoshikawa, T., Ueda, Y., Miyazaki, K., Koizumi, M., & Takakura, Y. (2010). Disc Regeneration Therapy Using Marrow Mesenchymal Cell Transplantation: A Report of Two Case Studies. *Spine*, 35(11), E475-E480. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181cd2cf4.
- Zhang, F., Cui, Y.-J., Conil, N., & Talandier, J. (2020). Assessment of Swelling Pressure Determination Methods with Intact Callovo-Oxfordian Claystone. *Rock Mechanics and Rock Engineering*, 53(4), 1879-1888. doi: 10.1007/s00603-019-02016-y.
- Zhang, H., Yang, S., Wang, L., Park, P., La Marca, F., Hollister, S. J., & Lin, C. Y. (2011). Time course investigation of intervertebral disc degeneration produced by needle-stab injury of the rat caudal spine: laboratory investigation. *J Neurosurg Spine*, 15(4), 404-413. doi: 10.3171/2011.5.Spine10811.
- Zhang, X.-b., Hu, Y.-c., Cheng, P., Zhou, H.-y., Chen, X.-y., Wu, D., . . . Wang, K.-p. (2021). Targeted therapy for intervertebral disc degeneration: inhibiting apoptosis is a promising treatment strategy. *International Journal of Medical Sciences*, 18(13), 2799-2813. doi: 10.7150/ijms.59171.
- Zhao, L., Qu, D., Jin, D., & Jiang, H. (2008). 118. Prosthetic Disc Nucleus (PDN) Replacement for Lumbar Disc Herniation Report with Four Year Follow-Up. *The Spine Journal*, 8(5, Supplement), 60S. doi: 10.1016/j.spinee.2008.06.141.
- Zheng, Y., Liang, Y., Zhang, D., Sun, X., Liang, L., Li, J., & Liu, Y.-N. (2018). Gelatin-Based Hydrogels Blended with Gellan as an Injectable Wound Dressing. *ACS Omega*, 3(5), 4766-4775. doi: 10.1021/acsomega.8b00308.
- Zhu, Y., Tan, J., Zhu, H., Lin, G., Yin, F., Wang, L., . . . Yi, W. (2017). Development of kartogenin-conjugated chitosan-hyaluronic acid hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials science*, 5(4), 784-791. doi: 10.1039/c7bm00001d
- Zoratto, N., & Matricardi, P. (2018). Semi-IPNs and IPN-based hydrogels. Dans *Polymeric Gels* (pp. 91-124). Elsevier. doi: 10.1007/978-3-319-76735-2_7