

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Technologies Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine,
Thérapie Cellulaire et Génique, Médecine Régénératrice et Biomatériaux

Par

Brian LE MOAL

Développement de nanoparticules lipidiques pour la délivrance d'acides nucléiques thérapeutiques : une nouvelle perspective dans la médecine régénératrice du disque intervertébral

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12 avril 2022

Unité de recherche : INSERM, UMRS1229, RMeS Regenerative Medicine and Skeleton

Thèse N°:

Composition du Jury :

Rapporteurs :

Chantal Pichon	Professeur des Universités — Université d'Orléans, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301
Esther Potier	Chargée de recherche CNRS — Université Denis Diderot-Paris 7, Laboratoire B3OA INSERM UMRS 1271

Examineurs :

Simona Mura	Maître de conférences — Université Paris-Saclay, Faculté de Science Institut Galien, INSERM UMRS 8612
Jérôme Guicheux	Directeur de recherche INSERM — Université de Nantes, Laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229

Dir. de thèse : Johann Clouet Professeur des Universités - Praticien Hospitalier – Université de Nantes, Laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229

Co-dir. : Elise Lepeltier Maître de conférences — Université d'Angers, Laboratoire MINT INSERM 1066 CNRS 6021

Invité : Marion Fusellier Maître de conférences - Vétérinaire — Université de Nantes, Laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229

REMERCIEMENTS

Je tiens, tout d'abord, à remercier Monsieur Jérôme Guicheux pour m'avoir accueilli, il y a 3 ans, au sein du laboratoire RMeS INSERM UMRS 1229, ainsi que Monsieur Patrick Saulnier pour m'avoir accueilli, au sein du Laboratoire MINT UMR Inserm 1066 - CNRS 6021.

Je remercie, Monsieur Johann Clouet, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadré durant ces 3 années de doctorat. Merci pour ton temps consacré à ma formation scientifique et tes nombreux conseils depuis mon premier stage de master 2. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussé afin de mener à bien cette thèse de doctorat très enrichissante aussi bien scientifiquement que humainement.

Je remercie également Madame Elise Lepeltier, ma co-directrice de thèse, de m'avoir permis de réaliser ce projet. Merci pour ta disponibilité, tes nombreux conseils ainsi que pour ton écoute et ta patience. Merci pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons eus et la possibilité d'implications dans de nombreux projets que tu m'as proposés dès le master 2.

Merci à vous deux, de m'avoir laissé cette autonomie durant les 3 années de thèse ainsi que de votre compréhension lors des moments difficiles.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Madame Chantal Pichon et Madame Esther Potier pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs, ainsi qu'à Madame Simona Mura et Monsieur Jérôme Guicheux pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je remercie également Madame Marion Fusellier d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que membre invité.

Je tiens aussi à remercier Madame Marion Fusellier de m'avoir accompagné durant les nombreuses expérimentations à l'école vétérinaire ONIRIS. Merci pour ton engagement et ta disponibilité ainsi que ta bonne humeur qui nous ont permis d'avancer sur ce merveilleux projet qu'est DISCODOG. Je tiens également à remercier toute l'équipe d'imagerie Médicale

Je remercie tout particulièrement Claire Chédeville, Cécile Boyer, Lily Paillât, Leslie Frapin ainsi que Maude Gluais pour m'avoir accueilli dans le « bureau des pétasses » et pour leur soutien durant toute la thèse ainsi que leurs conseils précieux.

Merci à Boris Halgand, pour sa disponibilité, ses conseils ainsi que son aide précieuse lors des expérimentations et notamment en culture cellulaire.

Je tiens aussi à remercier les autres plateformes et notamment Julie Lesoeur pour l'histo, Steven Nedellec pour la microscopie confocale et Nicolas Jouand pour la cytométrie en flux.

Merci également à Dominique Rouleau, Stéphane Madec, Olivier Gauthier, Nora Boushina, et Cyrille Décante pour votre bonne humeur, votre disponibilité et votre aide à l'école vétérinaire ONIRIS. Je tiens aussi à remercier Florianne Etienne pour son support et son apport durant toutes les étapes du projet DISCODOG.

Je remercie également l'ensemble des membres du laboratoire pour leur sympathie, leurs conseils, leur bonne humeur durant l'intégralité de ma thèse que ce soit au laboratoire ou en dehors. J'ai notamment une pensée pour Lily, Nathan, Pierre, Constance, Julia, Cyrille, Hillel, Benoit, Anaïs, Mélanie, Mathilde, Fabien, François, Boris, Alex et j'en oublie sûrement en écrivant ces remerciements. Je vous remercie tous très chaleureusement pour tout ce que vous m'avez apporté.

Lily et Nathan après vous avoir connu séparément, vous avez été toujours là pour moi dans les hauts et les bas, dans les galères, pour boire un coup ou encore se taper dessus, xoxo, je vous souhaite que du bonheur et de la réussite pour la suite.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire angevin et tout particulièrement mon Khouya Abdou, Pierre, Milad, Claire, Adélie, Léna, Kevin, Vincent avec qui j'ai passé de super moment d'échanges autant scientifiques que personnels.

Je remercie énormément ma mère ainsi que mes oncles, ma grand-mère et mon frère de m'avoir soutenu pendant ces trois années qui n'ont pas été de tout repos et je ne vous remercierai jamais assez d'être là. Merci pour votre amour et votre soutien. Merci ma petite maman malgré tes problèmes de santé tu as toujours été là pour moi et je ne t'en remercierais jamais assez.

Merci à Claire, pour partager ma vie depuis maintenant plus de 6 ans. Merci de m'avoir soutenu dès le premier jour. Merci de m'avoir relevé dans les moments difficiles et m'avoir toujours soutenu. Tu m'as permis de tenir le coup et cette thèse n'aurait pas été possible sans toi. Merci pour ton amour et ton réconfort ainsi que pour ta patience. Merci également à tes parents pour leur soutien depuis le début. J'ai hâte de continuer ma vie avec toi et de construire une famille.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS (ORALES ET AFFICHEES)

Articles scientifiques dans des journaux indexés

1. Brian Le Moal, Élise Lepeltier, Dominique Rouleau, Catherine Le Visage, Jean-Pierre Benoit, Catherine Passirani, Jérôme Guicheux, Marion Fusellier, Johann Clouet "Lipid nanocapsules for the intracellular delivery of therapeutic nucleic acids: a first step towards IVD regenerative medicine?" **International Journal of Pharmaceutics (2021) submitted** (Impact factor: 5.8)

Communications orales

1. Brian Le Moal, Elise Lepeltier, Catherine Le Visage, Catherine Passirani, Jérôme Guicheux, Johann Clouet « Lipid nanoparticles for the sustained release of miRNA: new insight into intervertebral disc regenerative medicine. » **Bioregate European Regenerative Medicine Forum 2018, Nantes, France.**
2. Brian Le Moal, Elise Lepeltier, Valérie Geoffroy, Angélique Galvani, Catherine Le Visage, Catherine Passirani, Jérôme Guicheux, Johann Clouet « Lipid nanoparticles for the sustained release of miRNA: new insight into intervertebral disc regenerative medicine. » **Bi-ospine 7th International Congress on Biotechnologies for Spine Surgery 2019, Rome, Italie**
3. Brian Le Moal, Elise Lepeltier, Valérie Geoffroy, Angélique Galvani, Catherine Le Visage, Catherine Passirani, Jérôme Guicheux, Johann Clouet « Lipid nanoparticles for the sustained release of miRNA: new insight into intervertebral disc regenerative medicine. » **Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) EU 2019, Rhodes, Grèce**

Communications affichées

1. Brian Le Moal, Elise Lepeltier, Valérie Geoffroy, Angélique Galvani, Catherine Le Visage, Catherine Passirani, Jérôme Guicheux, Johann Clouet « Lipid nanoparticles for the sustained release of miRNA: new insight into intervertebral disc regenerative medicine. » **Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress 2019, Toronto, Ontario, Canada**
2. Brian Le Moal, Elise Lepeltier, Valérie Geoffroy, Angélique Galvani, Catherine Le Visage, Catherine Passirani, Jérôme Guicheux, Johann Clouet « Lipid nanoparticles for the sustained release of miRNA: new perspectives into intervertebral disc regenerative medicine. » **World Biomaterials Congress (WBC) 2020, virtual congress.**

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
PARTIE I : ÉTAT DE L'ART SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DISCALE ET LES TRAITEMENTS DE LA DÉGÉNÉRESCENCE DISCALE.....	13
I- Le disque intervertébral et la lombalgie discogénique	14
1. Le disque intervertébral sain	14
A. Généralités.....	14
B. Organisation anatomique du DIV.....	15
2. Le disque intervertébral dégénéré.....	22
A. Lombalgie et dégénérescence discale (DD).....	22
B. Physiopathologie de la dégénérescence discale	23
II- Traitements conventionnels et novateurs de la lombalgie.....	26
1. Dépistage et prévention	26
2. Les traitements conventionnels	30
3. La médecine régénératrice.....	33
A. La thérapie cellulaire	33
B. Ingénierie tissulaire	38
C. Biothérapies	41
III- Une nouvelle stratégie pour contrecarrer la dégénérescence discale : la vectorisation des miARN.....	43
1. miARN et dégénérescence discale	43
A. Découverte des miARN et généralités	43
B. Biogénèse et mécanisme d'action.....	45
C. miARN et dégénérescence discale	45
D. miR-155 : un miARN pivot dans la DD et un agent thérapeutique potentiel.....	45
2. Systèmes de vectorisation des miARN	47
A. Introduction.....	47
B. Les nanoparticules lipidiques	48
3. miRNA as a new therapeutic agent for intervertebral disc degeneration	57
4. Objectifs de la thèse	91
PARTIE II : CONTRIBUTIONS AU DÉVELOPPEMENT D'UNE STRATÉGIE DE MÉDECINE RÉGÉNÉRATRICE DU DISQUE INTERVERTÉBRAL BASÉE SUR L'EFFET THERAPEUTIQUE DES miARN	92
I. Contexte	93
II. Nanocapsules lipidiques pour l'administration intracellulaire d'acides nucléiques thérapeutiques : un premier pas vers la médecine régénérative du DIV ?	95

1. Résumé	95
2. Article	96
3. Discussion	127
III. Fonctionnalisation de nanocapsules lipidiques par le peptide short Link-N et vectorisation du miR-155	132
1. Problématique	132
2. Matériels et Méthodes	133
3. Résultat	141
4. Discussion et conclusion	148
PARTIE III : DISCUSSION - PERSPECTIVES - CONCLUSION	154
I . Discussion - Perspectives.....	154
II. Conclusion	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	160

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Vue latérale et antérieure de la colonne vertébrale.....	15
Figure 2 : Structure et organisation du disque intervertébral (DIV).....	16
Figure 3 : Représentation schématique des échanges et de la composition du disque intervertébral (DIV).	19
Figure 4 : Représentation des contraintes subies par le disque intervertébral (DIV).	21
Figure 5 : Composition et organisation de la matrice extracellulaire (MEC) du disque intervertébral (DIV).	21
Figure 6 : Classification de Modic de la dégénérescence discale évaluée par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).....	28
Figure 7 : Classification de Pfirrmann de la dégénérescence discale évaluées par IRM (D'après Pfirrmann et al. 2001).	29
Figure 8 : Approches chirurgicales de prise en charge des douleurs lombaires : arthrodèse et arthroplastie.....	32
Figure 9 : Propriétés de différenciation et de transdifférenciation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM).	34
Figure 10 : Définition des facteurs sécrétés par les cellules notochordales (CNT) impliqués dans le dialogue cellulaire intradiscal.	36
Figure 11 : Représentation schématique de la formulation de nanocapsules lipidiques (LNC).	54
Figure 12 : représentation schématique de la fixation du peptide sLink-N lié aux LNC et à son récepteur cellulaire.	56
Figure 13 : Etude de la quantité de peptide final en fonction de la concentration initiale ajouté.	142
Figure 14 : Cinétique de libération du peptide sLink-N pendant 7 jours.....	143
Figure 15 : Etude de l'activité métabolique et de la cytotoxicité des LNC.	144
Figure 16 : Etude de l'internalisation des LNC en fonctions du temps en cytométrie en flux	145
Figure 17 : Etude de l'internalisation à 24h par imagerie confocal	146
Figure 18 : Bioactivité du miR-155.	147
Tableau I : Avantages et limites des différents types cellulaires utilisés dans le cadre d'une thérapie cellulaire discale	38

ABRÉVIATIONS

ADAMTs: A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin repeats

AF : Anneau fibreux (*Annulus fibrosus*)

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

AIS : Anti-Inflammatoires Stéroïdiens

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

BMP : Bone Morphogenetic Protein

CCL5 : Chemokine C-C motif Ligand 5

CDK : cyclin-dependent kinase

CNP : Peptide Natriurétique de type C

CNT : Cellules Notochordales

CRGF : Corticotropine Growth Factor

CSA : Cellules Souches/Stromales Adipeuses

CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

CXCL12 : Chemokine C-X-C motif Ligand 12

DD : Dégénérescence Discale

DIV : Disque Intervertébral

DOPE : DiOleoylPhosphatidylEthanolamine

DOTAP : DiOleoyl-3-TrimethylAmmonium Propane

FasL : Fas-Ligand

FDA : Food and Drug Administration

fLNC : fonctionalized Lipid NanoCapsules

GDF-5 : Growth Differentiation Factor 5

hASC : human Adipose Stromal Cells

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IRM : Imagerie à Résonnance Magnétique

LNC : Lipid NanoCapsule

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

miARN/ miR : micro-interfering acide ribonucléique

MEC : Matrice Extracellulaire

MMP : Métalloprotéinase

NFL : NeuroFiLament peptide

NGF : Nerve Growth Factor

NP : Noyau pulpeux (*Nucleus pulposus*)

NPCy : Nucléopulpocytes

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PC : Plateau Cartilagineux

PCL : PolyCaproLactone

PEG : PolyEthylène Glycol

PG : Protéoglycane

Shh : Sonic Hedgehog

SiARN : Small interfering acide ribonucléique

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TIMPs : Tissue Inhibitor of Metalloprotéinases

TNF : Tumor Necrosis Factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

La lombalgie est décrite chez l'homme comme une douleur au niveau du bas du dos, dans la région lombaire. La lombalgie constitue un problème majeur de santé publique au regard des conséquences sur la qualité de vie du patient. Elle est considérée comme le mal du XXI^e siècle (CNAM, 2017), avec une prévalence de 80 % au niveau de la population des pays industrialisés. L'impact socio-économique de cette maladie est majeur et reconnu comme la troisième source d'invalidité par le régime général de la sécurité sociale, avec des coûts directs et indirects estimés à environ 15 milliards d'euros par an (CNAM, 2017). En France, la lombalgie est ainsi responsable de 30 % des arrêts maladie de plus de 6 mois et de 25 % des arrêts de travail plus courts.

La lombalgie peut être divisée en trois catégories : aiguë (durée inférieure à 6 semaines), subaiguë (durée entre 6 et 12 semaines) et chronique (durée supérieure à 12 semaines). Environ 40 % des lombalgies chroniques sont dues à une dégénérescence du disque intervertébral (DIV), appelée lombalgie discogénique. Le DIV est une articulation semi-mobile jouant un rôle fondamental dans la cinématique rachidienne. Les DIV jouent le rôle d'amortisseurs fibro-hydrauliques en permettant de répartir les tensions mécaniques sur l'ensemble de la colonne vertébrale, tout en lui conférant une certaine flexibilité (Frapin *et al.*, 2019). Les DIV se composent d'une partie centrale, le noyau pulpeux ou *Nucleus pulposus* (NP) entouré en périphérie par l'anneau fibreux ou *Annulus fibrosus* (AF). Ils sont reliés à la colonne vertébrale grâce aux plateaux cartilagineux (PC). Tout au long de la vie, les DIV subissent de nombreuses contraintes mécaniques provoquant leur dégénérescence plus ou moins précoce pouvant alors provoquer des lombalgies. La prise en charge des lombalgies est actuellement essentiellement centrée sur le soulagement des douleurs. Pour les lombalgies peu invalidantes, des traitements pharmacologiques (antalgiques et anti-inflammatoires) sont dispensés. En fonction de la sévérité, des approches chirurgicales peuvent être proposées. Il existe aujourd'hui deux approches chirurgicales : l'arthrodèse et l'arthroplastie. Ces solutions thérapeutiques restent limitées et ne s'attaquent pas à l'étiopathogénie de la lombalgie discogénique (Clouet *et al.*, 2018).

Les meilleures connaissances de la physiopathologie discale, obtenues depuis une vingtaine d'années, permettent aujourd'hui d'envisager le développement de nouvelles approches thérapeutiques innovantes, afin de traiter directement la cause des lombalgies discogéniques et de restaurer le tissu discal (Henry *et al.*, 2018a). Parmi ces nouvelles stratégies thérapeutiques,

la médecine régénératrice, et plus particulièrement la thérapie cellulaire basée sur la transplantation de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) exogènes, a fait l'objet d'une attention particulière et a laissée entrevoir un bénéfice clinique prometteur (Gugjoo *et al.*, 2020). Cependant, trop peu d'études *in vivo* montrent un effet bénéfique de l'implantation notamment de CSM. Ces résultats, associés à des limites techniques-technologiques-économiques, associé à l'amélioration des connaissances relatives à la physiopathologie discale, ont conduit la communauté scientifique à développer d'autres stratégies thérapeutiques (Clouet *et al.*, 2018). La découverte récente du rôle des microARN (miARN) dans les processus physiopathologiques de nombreuses maladies, y compris dans la dégénérescence discale (DD), font des miARN de potentiels candidats et cibles thérapeutiques. Depuis la découverte du premier miARN en 1993, ce domaine s'est considérablement développé et parmi les nombreux miARN découverts, un certain nombre d'entre eux sont aujourd'hui identifiés comme acteurs dans le processus de DD. Parmi eux, le miR-155 présente un rôle pléiotrophique qui amène à le considérer avec intérêt comme agent thérapeutique pour lutter contre la DD. En effet, ses rôles dans les processus d'apoptose des cellules du DIV, dans la synthèse de la Matrice Extra-Cellulaire (MEC) et dans les processus inflammatoires sont bien identifiés.

Malgré les progrès réalisés dans notre compréhension fondamentale du rôle des microARN (miARN ou miR) dans la pathologie de diverses maladies, la fragilité de ces miARN après administration et leur incapacité à pénétrer seuls au sein des cellules constituent les obstacles majeurs afin de pouvoir les utiliser comme agent thérapeutique (Mori *et al.*, 2019). Ainsi, l'utilisation des miARN est conditionnée au développement de vecteurs permettant leur protection et leur internalisation au sein des cellules cibles où ils pourront exercer leurs effets thérapeutiques. Différents systèmes de vectorisation sont actuellement envisagés (Ahmadzada, Reid and McKenzie, 2018). Parmi eux, les plateformes nanoparticulaires présentent différents atouts pour assurer la vectorisation des miARN. Ainsi, ces plateformes nanoparticulaires assureront la protection du matériel génétique *in situ*, l'internalisation cellulaire et la libération intracytoplasmique des miARN. Parmi ces plateformes nanoparticulaires, les nanocapsules lipidiques (LNC) présentent différents atouts. Leur biocompatibilité, leur capacité à protéger et à libérer le matériel génétique au sein des cellules ont en effet pu déjà être démontrées (David, Montier, *et al.*, 2012). De plus, leurs caractéristiques physico-chimiques sont bien maîtrisées et permettent même d'envisager une fonctionnalisation en surface des nanoparticules,

qui permettrait de cibler spécifiquement les cellules du NP et d'améliorer leur efficacité d'internalisation.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été de développer un système nanoparticulaire capable de délivrer un miARN au sein des cellules cibles du DIV (cellules du NP), afin de rétablir l'homéostasie du tissu. Pour ce faire, des LNC chargées en miR-155 ont été formulées, purifiées et caractérisées. Ensuite, leur efficacité a été démontrée *in vitro*, puis une étude de faisabilité *in vivo* a été réalisée. En parallèle, une fonctionnalisation de surface des LNC avec un peptide d'intérêt (sLink-N) a été étudiée pour permettre un ciblage spécifique des cellules du NP et ajouter un potentiel effet thérapeutique cumulatif avec le miR-155.

Ce manuscrit est divisé en 3 grandes parties. Une première partie bibliographique décrira la physiopathologie discale et la lombalgie discogénique, les traitements conventionnels et novateurs, le rôle des miARN dans la physiopathologie discale et les différents systèmes de vectorisation développés. Cette dernière sous-partie correspond à une revue qui sera soumise dans le journal *Advanced Drug Delivery Reviews*. La seconde partie présentera les résultats expérimentaux. Il s'agira tout d'abord des résultats décrivant la formulation des LNC chargées en miARN, leur caractérisation physico-chimiques complète, leur efficacité *in vitro* et leur injection sur un modèle ovin. Les résultats obtenus ont été soumis dans le *International Journal of Pharmaceutics*. Il s'agira ensuite des résultats relatifs à la décoration en surface des LNC par le peptide d'intérêt sLink-N. La troisième et dernière partie du manuscrit permettra de discuter l'ensemble des travaux réalisés durant cette thèse et d'ouvrir vers de nouvelles perspectives de travail.

PARTIE I :

**ÉTAT DE L'ART SUR LA
PHYSIOPATHOLOGIE DISCALE ET
LES TRAITEMENTS DE LA
DÉGÉNÉRESCENCE DISCALE**

I- Le disque intervertébral et la lombalgie discogénique

1. Le disque intervertébral sain

A. Généralités

Le disque intervertébral (DIV) est un élément clef de la cinématique rachidienne qui confère à la colonne vertébrale ses capacités de mobilité et de soutien. Le DIV est considéré comme une articulation semi-mobile (amphiarthrose) qui permet la séparation entre les vertèbres. La colonne vertébrale humaine compte 6 DIV au niveau cervical, 12 au niveau thoracique et 5 au niveau lombaire (**Figure 1**). Les 23 DIV représentent un quart de la hauteur de la colonne vertébrale (Panjabi *et al.*, 1994). La forme des DIV varie en fonction de leur localisation au sein de la colonne vertébrale. Les DIV au niveau lombaire sont de forme ovoïde alors que les DIV au niveau thoracique sont de forme ronde. Les DIV présentent un diamètre moyen de 40 mm et une hauteur de 7 à 12 mm, avec une hauteur maximale pour les DIV situés dans la région lombaire (Pooni *et al.*, 1986) (**Figure 1**). Le DIV représente un tissu unique caractérisé par : (i) son absence de vascularisation ; (ii) sa faible teneur en oxygène (hypoxie) ; (iii) l'absence d'innervation et (iv) un privilège immunitaire (Raj, 2008; Sun, Liu and Luo, 2020). En effet, le DIV est la structure la moins vascularisée du corps humain et les cellules du DIV se trouvent éloignées des vaisseaux sanguins d'environ 8 mm. Cette avascularisation s'accompagne d'une faible pression en oxygène au sein de la matrice extra-cellulaire (MEC) du DIV et en fait un tissu hypoxique. Ainsi, la pression en oxygène au centre du DIV est d'environ 0,4 kPa, ce qui est bien inférieur à celle du cartilage articulaire (1,3 4 kPa) ou même des poumons (14 kPa) (Huang and Gu, 2008). Cette absence de vascularisation s'accompagne également d'un apport limité en nutriments au sein du DIV, conduisant les cellules du DIV à adapter leur métabolisme vers la glycolyse anaérobie. Cette adaptation métabolique permet aux cellules de limiter leur consommation d'énergie, *via* cette voie métabolique non-consommatrice en oxygène. En contrepartie, la glycolyse anaérobie, *via* la production d'acide lactique, provoque une acidification du milieu discal (pH de 7,5 à 5,7) (Urban and Winlove, 2007). Le DIV est aussi un tissu présentant une innervation spécifique. Les terminaisons nerveuses se situent uniquement au niveau de la partie externe du DIV (au niveau de l'*Annulus fibrosus*) (García-Cosamalón *et al.*, 2010). La structure particulière du DIV lui confère également une caractéristique de privilège immunitaire. Le privilège immunitaire au sein du corps humain induit une tolérance aux antigènes d'origine étrangère, sans pour autant entraîner une réaction immunitaire (Sun, Liu and Luo, 2020). Cette immunité spécifique se retrouve aussi

dans des tissus tels que le cerveau, la rétine, les testicules ou encore le fœtus (Wu *et al.*, 2019). Deux mécanismes pourraient expliquer ce privilège immunitaire : i) la barrière physique formée par la structure intrinsèque du DIV et ii) les mécanismes cellulaires impliquant les protéines transmembranaires Fas-ligand (FasL) *via* les cellules du DIV (Sun, Liu and Luo, 2020).

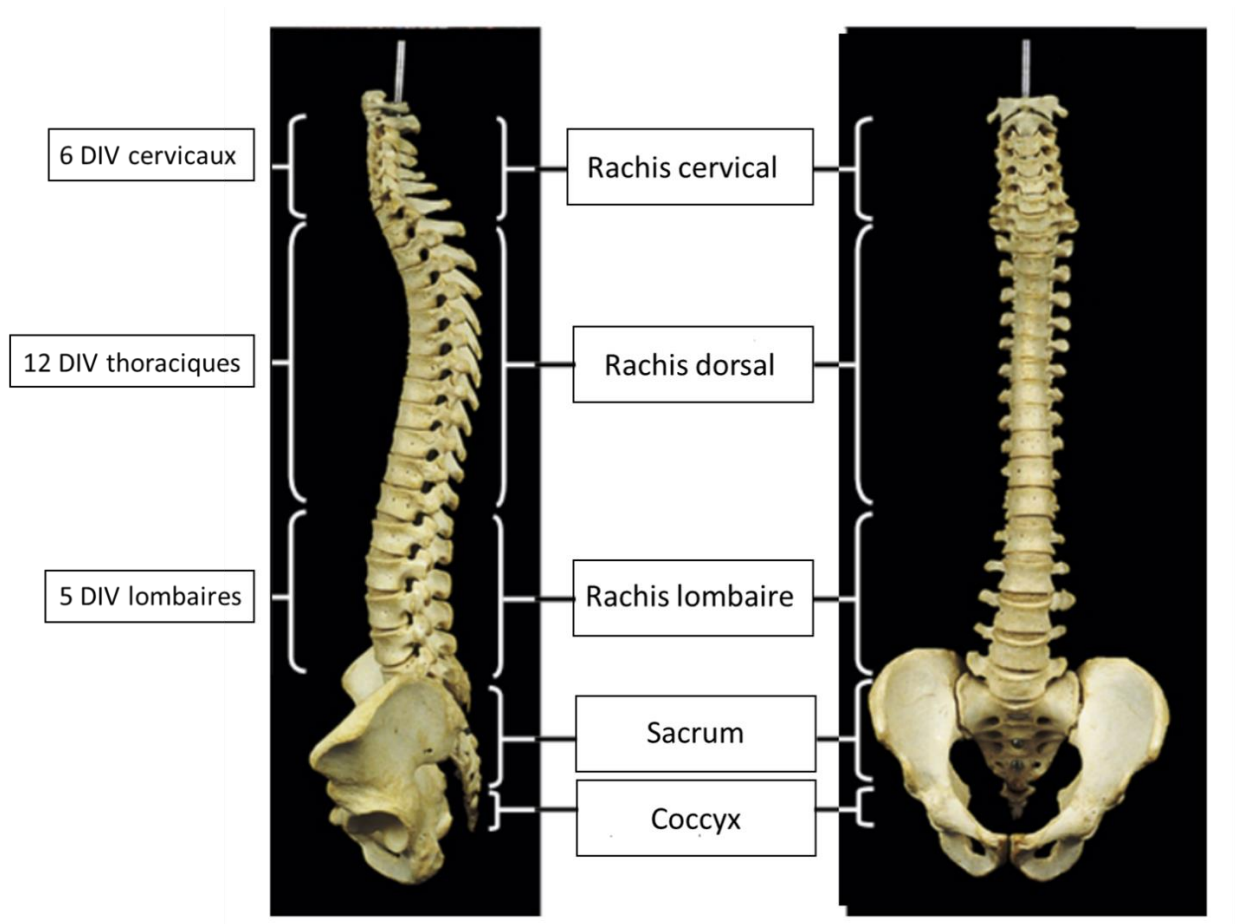


Figure 1 : Vue latérale et antérieure de la colonne vertébrale.

Répartition schématique des différentes régions du rachis ainsi que des disques intervertébraux (DIV) (modifié à partir de Cramer & Darby, 1995).

B. Organisation anatomique du DIV

Le DIV est composé essentiellement de 3 structures : le noyau pulpeux (*Nucleus pulposus*, NP) situé au centre, l'anneau fibreux (*Annulus fibrosus*, AF) entourant le NP et les plateaux cartilagineux qui permettent la jonction avec les vertèbres (Waxenbaum, Reddy and Futterman, 2021) (**Figure 2**).

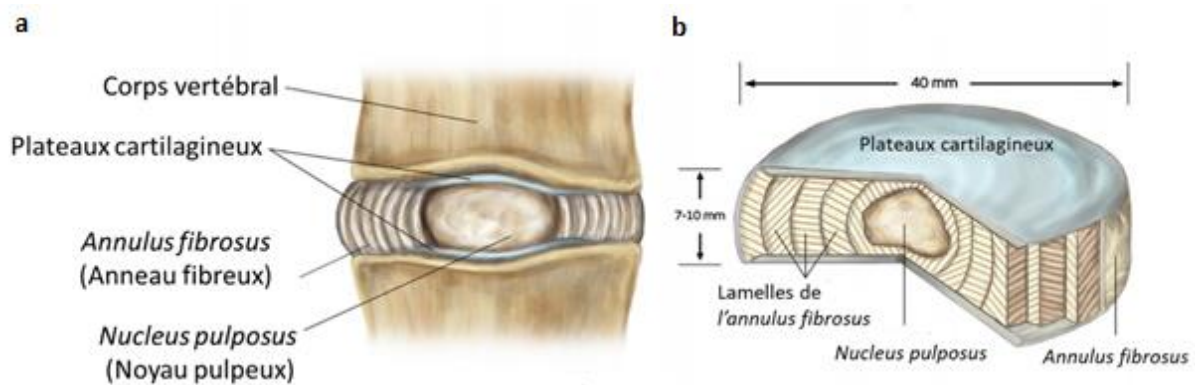


Figure 2 : Structure et organisation du disque intervertébral (DIV).

(a) Section axiale du DIV (b) Coupe d'un DIV montrant la structure lamellaire de l'anneau fibreux (Modifié à partir de Tomaszewski *et al.* 2015).

1. Le noyau pulpeux ou *Nucleus pulposus*

La partie centrale du DIV est constituée du NP. Le NP est caractérisé par un niveau d'hydratation élevé (70-80 % de sa masse) et une densité cellulaire très faible, d'environ 4 000 cellules/mm³ (Huang and Gu, 2008). La MEC du NP est caractérisée par sa composition isotrope, composée d'une matrice collagénique principalement de fibres de collagène de type II (80 % du collagène total) ainsi que de protéoglycanes (PG). Parmi les PG, l'agrécan est le plus représenté au sein du NP. Celui-ci est composé d'une protéine structurelle associée à des chaînes de sulfate de kératane et de sulfate de chondroïtine reliés entre elles par des protéines de liaison. Ainsi, l'agrécan est, de par sa structure, hautement chargée négativement, lui conférant une capacité de rétention hydrique importante (Urban and Winlove, 2007). La MEC est ainsi constituée d'environ 90 à 95 % d'eau, caractéristique essentielle pour permettre au DIV de jouer son rôle d'amortisseur fibro-hydraulique. La composition cellulaire du NP varie en fonction de l'âge. Durant les premières années de vie, deux populations cellulaires distinctes coexistent : les cellules notocordales (CNT) et les nucléopulpecytes (NPCy) (Chelberg *et al.*, 1995). Les CNT sont issues de la notochorde embryonnaire et sont caractérisées par une taille importante et la présence de vacuoles. Elles participent particulièrement au maintien de l'homéostasie discale. Les NPCy sont, quant à elles, de petite taille, sphériques et leur phénotype a longtemps été considéré comme proche de celui de chondrocytes articulaires (chondrocyte-like) (Mwale *et al.*, 2009). Elles présentent la capacité de synthétiser une MEC riche en collagène de type II et en PG (agrécan

majoritairement). Il est aujourd'hui clairement établi que ces NPCy possèdent un phénotype singulier différent de celui des chondrocytes articulaires. Ainsi, l'expression génique de différents marqueurs spécifiques a pu être évaluée. Ces marqueurs sont notamment : le collagène de type V, la protéine MGP (matrix-gla-protein (MGP), la sérine peptidase (HTRA1) (Clouet *et al.*, 2009) Carbonic Anhydrase 12 (CA12) et Forkhead Box F1 (FOXF1) (Stoyanov *et al.*, 2011).

2. L'anneau fibreux ou *Annulus fibrosus*

L'anneau fibreux (AF) qui entoure le NP est constitué d'un réseau organisé en 15-25 lamelles concentriques superposées de fibres de collagènes. Ces fibres sont orientées avec un angle de 60° par rapport à l'axe de la colonne vertébrale de façon parallèle entre elles (disposition lemniscatoire). La MEC de l'AF est composée de 60 à 70 % d'eau, avec une quantité de collagène représentant 50 à 70 % de sa masse sèche (Buckwalter, Maynard and Cooper, 1978). L'AF est organisé en 2 zones : l'AF externe (AFE) possédant une rigidité plus importante liée à des fibres resserrées et mieux ordonnées et l'AF interne (AFI) moins organisé et moins rigide. Ces propriétés de rigidité différentes entre les zones sont liées aux variations de composition des MEC de l'AFE et de l'AFI. Ainsi, la MEC de l'AFE contient essentiellement des fibres de collagène de type I contrairement à la MEC de l'AFI qui présente essentiellement des fibres de collagène de type II (Johnstone *et al.*, 1992). L'AF contient des cellules fusiformes au phénotype fibroblastique au sein de l'AFE et des cellules rondes avec un phénotype se rapprochant du phénotype des chondrocytes articulaires au niveau de l'AF interne. Ces cellules sont alignées parallèlement aux fibres de l'AF avec une densité cellulaire d'environ 9000 cellules/mm³.

3. Les plateaux cartilagineux

Les plateaux cartilagineux (PC) recouvrent 90 % des corps vertébraux supérieur et inférieur des DIV. Il s'agit de structures cartilagineuses permettant la jonction entre les vertèbres. Ils possèdent une épaisseur d'environ 1 mm dans la région de l'AF. Cette épaisseur diminue en périphérie du NP (0,6 mm d'épaisseur) (Moon *et al.*, 2013). Les cellules des plateaux cartilagineux présentent un phénotype chondrocytaire et synthétisent une MEC proche de celle du cartilage articulaire. Il s'agit de fibres de collagène de type II et de protéoglycanes

(PG). Les PC possèdent une composition spécifique permettant de s'adapter aux contraintes mécaniques. Proche de l'AF, la MEC des PC sera plus riche en PG alors qu'à proximité du NP les fibres de collagène seront particulièrement représentées et permettront une déformation adaptée du NP et une répartition adaptée des tensions. Les PC jouent un rôle majeur dans la nutrition du DIV, grâce à la présence de vaisseaux sanguins assurant l'apport en oxygène et en nutriments pour les cellules du NP afin de maintenir l'homéostasie discale (Rodriguez *et al.*, 2012) (**Figure 3**).

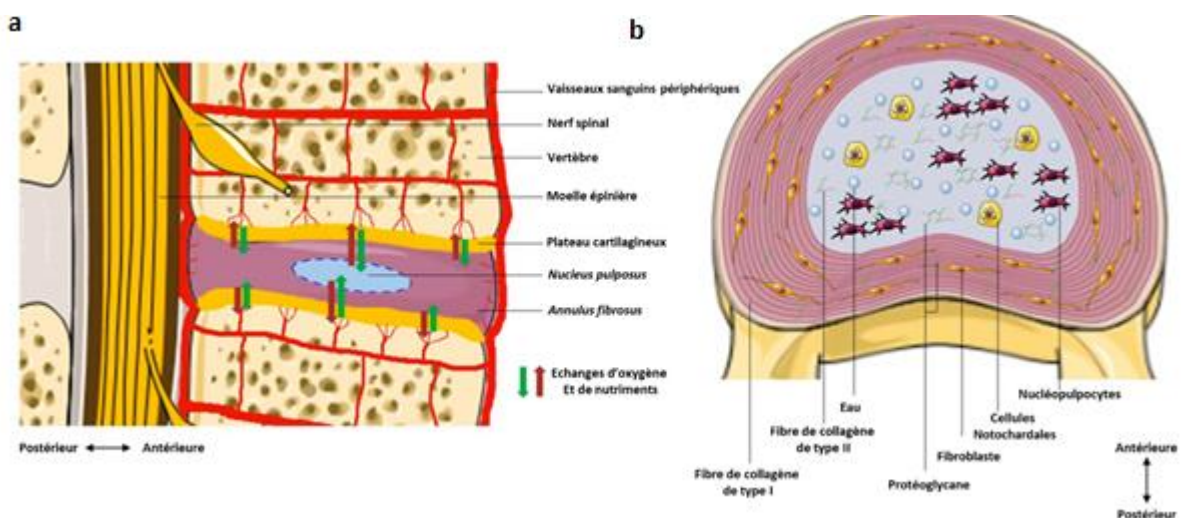


Figure 3 : Représentation schématique des échanges et de la composition du disque intervertébral (DIV).

(a) Le DIV est non-innervé et non-vascularisé, les échanges de métabolites se produisent par diffusion à travers les plateaux vertébraux. Le DIV possède des conditions particulières d'osmolarité et de pH, conduisant les cellules résidentes du DIV à adapter leur métabolisme. (b) Au sein de l'AF, les cellules de phénotype fibroblastique sont organisées parallèlement aux lamelles concentriques de fibres de collagène. Au sein du NP, des cellules notochordales et des nucléopulpcytes coexistent et assurent l'homéostasie de la matrice extracellulaire (D'après Henry *et al.* 2014).

4. Particularités du microenvironnement discal

Le DIV est un tissu avasculaire. Par conséquent, l'apport de nutriments se fait principalement par diffusion à partir de son système vasculaire environnant (Fournier *et al.*, 2020). La variation entre les taux de consommation cellulaire et le transport des nutriments (passif ou actif) conduit à des gradients de concentration des métabolites et des nutriments dans l'ensemble du DIV. Cela affecte de façon marquée la viabilité, la prolifération et la fonction des cellules, altérant collectivement toute régénération ou réparation potentielle. Dans les DIV lombaires humains, les niveaux d'oxygène varient considérablement. Les concentrations d'oxygène diminuent depuis l'AF à travers la structure interne du DIV (entre 19,5 % et 0,65 %). Les niveaux

d'oxygène moyens dans la partie centrale du NP étant compris entre 0,5 % et 10 % (Buckley *et al.*, 2018). Ces niveaux sont principalement déterminés par le transport à travers les PC, mais aussi par la densité cellulaire au sein du tissu et l'activité cellulaire. Un autre point critique du microenvironnement est le faible taux de glucose présent, glucose affectant la viabilité des cellules du NP (Yin *et al.*, 2020). Les cellules du NP se sont cependant adaptées à cet environnement hypoxique et pauvre en glucose en utilisant comme voie métabolique la glycolyse anaérobie (Risbud, Schipani and Shapiro, 2010). L'utilisation de cette voie métabolique conduit à une nouvelle caractéristique de la MEC du NP avec pH « acide ». En effet, le pH intradiscal peut varier, principalement dû à la production locale d'acide lactique lors de la glycolyse anaérobie, résultant de la glycolyse par les cellules du DIV. Plusieurs mesures *in vivo* ont révélé que le pH pouvait varier de 5,7 à 7,5 (Gilbert *et al.*, 2016; Bez *et al.*, 2018). Ces variations peuvent conduire à des modifications de la viabilité cellulaire avec des conséquences sur la viabilité cellulaire et le processus de DD.

Une autre particularité du DIV est l'importance des contraintes mécaniques qu'il subit tout au long de la vie et le fait que les cellules sont soumises à un environnement hyperosmolaire. Cette pression osmotique de la MEC est notamment corrélée à la quantité d'agrécan (Bezci and O'Connell, 2018). Les PG chargés négativement, dont l'agrécan, permettent de réguler l'équilibre ionique de la MEC du DIV (Johnson et al, 2014). Dans un état sain, l'osmolarité extracellulaire peut varier d'environ 430 mOsm/L (pression isoosmotique) à environ 496 mOsm/L (pression hyperosmotique) (van Dijk, Potier and Ito, 2011).

Dans le contexte du développement d'approches de médecine régénérative, les 4 composantes principales du microenvironnement (oxygène, glucose, pH et osmolarité) devront être prises en compte au regard de leur impact potentiel sur les cellules du DIV. D'une part, la concentration en oxygène semble jouer un rôle central dans la régulation de la biosynthèse et du phénotype de cellules ciblées pour des applications thérapeutiques (Syeda Masooma Naqvi and Buckley, 2015). D'autre part, de faibles concentrations en glucose, l'osmolarité et les pH acides peuvent nuire à la survie et au comportement biologique des cellules du DIV. Il est donc important de maintenir l'homéostasie du DIV afin de conserver un microenvironnement discal sain.

5. Relation structure-fonction

Au cours de la vie, le DIV est soumis à de nombreuses contraintes. La structure intrinsèque du DIV va lui permettre d'absorber ces contraintes. Pour ce faire, le DIV adapte sa forme et sa teneur en eau, permettant aux tensions mécaniques de se répartir le long de la colonne vertébrale. Les charges subies par le DIV sont différentes en fonction de la posture de l'individu. En compression axiale, l'AF va contenir le NP qui se comprime et s'étend vers l'extérieur. L'AF permet de rediriger les forces subies par le NP en tension. Au sein du NP, la pression va passer de 0,06 MPa en position allongée à 2,30 MPa lors du port de charge de 20 kg avec une flexion thoracique (Shapiro and Risbud, 2014). Ces modifications de pression vont s'accompagner d'une diminution de la hauteur discale. Lors de mouvements de torsion, extension ou flexion vertébrale, l'AF subit des forces de cisaillements multidirectionnelles. La composition de la MEC de l'AF riche en eau, en PG et en collagène permet une déformation capable de rediriger et d'emmagasiner une partie des forces subies par le DIV (Fearing *et al.*, 2018). Le NP, hautement hydraté (90/95 % d'eau), va jouer le rôle d'amortisseur hydraulique permettant la restauration de la hauteur discale et de sa forme initiale (**Figure 4**). La capacité de résistance du DIV provient de la capacité de la MEC du NP à moduler sa pression osmotique ainsi que sa quantité en eau en fonction des contraintes subies. La variation de pression osmotique, entraînant une déformation et un changement de hauteur discale, est principalement expliquée par les PGs de la MEC du NP (YALTIRIK *et al.*, 2019). Les cellules du DIV ont aussi montré une réponse métabolique différente en fonction de l'intensité et du type de contraintes appliquées, selon des mécanismes de mécanotransduction. Les cellules du DIV peuvent notamment adapter la synthèse des protéines structurales telles que l'actine ou la tubuline ou encore changer de métabolisme en passant d'un métabolisme catabolique au repos à anabolique en activité (Fearing *et al.*, 2018) (**Figure 5**). De plus, la mécanotransduction impacte aussi le profil d'expression des miARN régulant alors directement les mécanismes de réponses aux contraintes mécaniques (D'Angelo, Godeau and Solon, 2019).

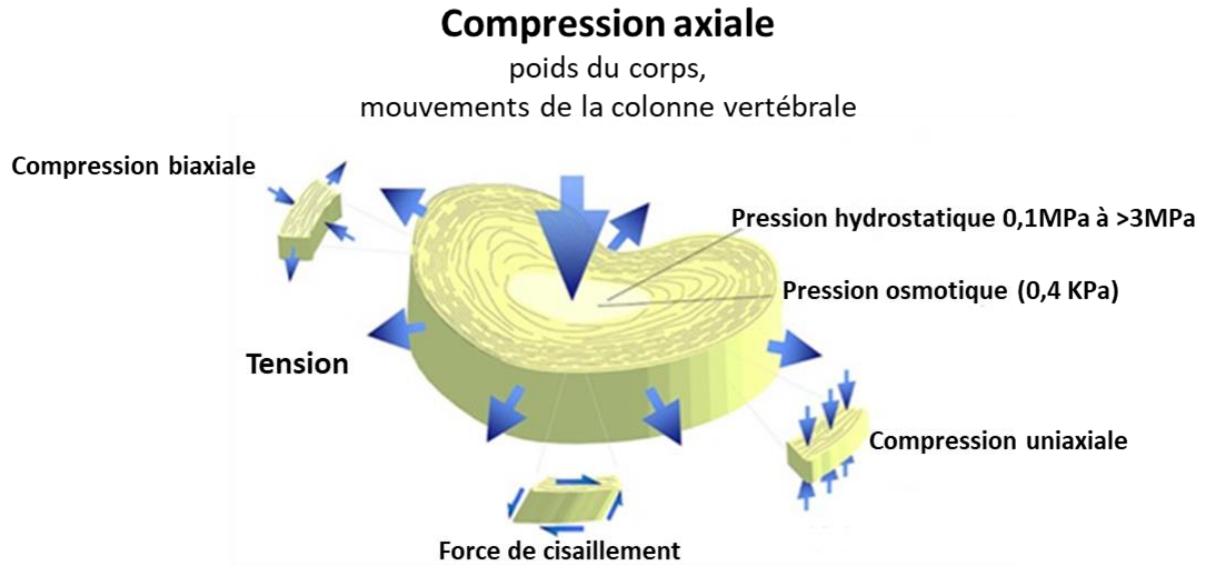


Figure 4 : Représentation des contraintes subies par le disque intervertébral (DIV).

En position neutre (debout) le DIV subit une compression axiale verticale. Le Nucleus pulposus va s'étendre radialement créant une tension circonférentielle sur les fibres de collagène de l'Annulus fibrosus. Lors de contraintes de torsions, d'extensions et de flexions, le DIV va être soumis à des forces différentes, créant une déformation ainsi qu'une modification des pressions hydrostatique et osmotique (d'après Fearing *et al.* 2016).

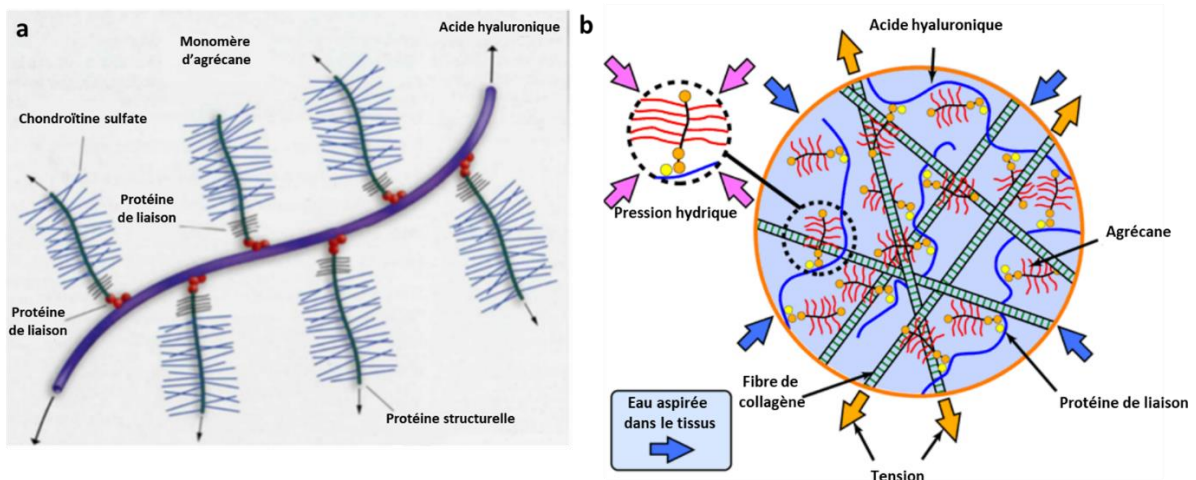


Figure 5 : Composition et organisation de la matrice extracellulaire (MEC) du disque intervertébral (DIV).

(a) Agrégat d'agrécan, protéoglycane (PG) de la MEC du DIV. Les molécules d'agrécan sont associées à une chaîne d'acide hyaluronique et des protéines structurales ; (b) MEC composée d'un réseau dense de fibres de collagène entourée de substance fondamentale composée essentiellement d'eau et de PG qui subit des tensions et adapte la composition en eau du DIV (d'après Gauci *et al.* 2017 et Kiani *et al.* 2002).

2. Le disque intervertébral dégénéré

A. Lomalgie et dégénérescence discale (DD)

La lombalgie est considérée comme le mal du 21^e siècle par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les symptômes de la lombalgie sont des douleurs ou fourmillements au niveau du rachis lombaire, des difficultés motrices ou locomotrices. La lombalgie représente la deuxième cause de consultation médicale dans les pays industrialisés et son impact socio-économique est considérable. D'après une étude réalisée en 2017 par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie (CNAM) (CNAM, 2017), les douleurs d'origine lombaire représentent des coûts directs (indemnisation, kinésithérapie, prise en charge médicamenteuse) d'environ 661 millions d'euros par an en France. D'après la même étude, les coûts indirects liés aux arrêts de travail pourraient représenter 10 fois le montant des coûts directs. Ces lombalgies, s'expliquent dans 40 % des cas par une dégénérescence du DIV (DD) (Luoma *et al.*, 2000), également appelée lombalgie discogénique. Il est clairement établi aujourd'hui que l'origine de la DD est multifactorielle, avec des composantes génétiques, environnementales et biomécaniques (Di Iorio *et al.*, 2007). Le polymorphisme génétique pourrait avoir une incidence de 75 % sur l'apparition des symptômes de la lombalgie discogénique. Les gènes codant pour les protéines de la MEC, en particulier celles de la MEC du NP (agrécan, collagène types I et II), seraient les plus souvent concernés (Martirosyan *et al.*, 2016). Des études sur des jumeaux ont permis de confirmer l'impact du polymorphisme génétique sur les douleurs lombaires (Battié *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2013; Kitis *et al.*, 2018). Ce polymorphisme génétique pourrait être aussi lié aux gènes codants pour les ARN interférents (ARNi). Ces ARNi sont des ARN de petite taille, non codants, capables d'inhiber ou d'accentuer l'expression génique ou la synthèse protéique des composants de la MEC. Ils pourraient avoir aussi une action sur des voies de signalisation essentielles telles que l'autophagie, le métabolisme anaérobie ou encore l'inflammation (Clouet *et al.*, 2018). Le rôle et l'implication dans la DD de ces ARNi seront décrits dans un paragraphe dédié. La lombalgie discogénique est aujourd'hui considérée comme une maladie multigénique, avec néanmoins des composantes non-géniques (Mayer *et al.*, 2013). Les facteurs environnementaux et biomécaniques sont ainsi évoqués dans la mise en place de la DD. Il s'agit, en particulier, du tabagisme, de la sédentarisation, du sport intensif ou encore de la catégorie socio-professionnelle du patient (Ganesan *et al.*, 2017; Shiri *et al.*, 2019). En parallèle, certaines infections bactériennes ou

virales, mais également certaines maladies métaboliques (diabète, hyper- ou hypothyroïdie, athérosclérose), ont également été évoquées dans le processus de la DD (Šagát *et al.*, 2020)(Shiri *et al.*, 2019).

B. Physiopathologie de la dégénérescence discale

La DD induit des changements morphologiques et phénotypiques comparables aux conséquences observées lors d'un vieillissement normal du DIV (Adams and Roughley, 2006). La différence repose sur le délai d'apparition des symptômes et des modifications cellulaires et tissulaires. Le vieillissement normal du DIV se fait au cours du temps avec une rupture progressive de l'homéostasie au sein du DIV (Adams and Roughley, 2006). La DD, en revanche, repose sur une apparition anormale et accélérée des symptômes (Berenbaum and Sellam, 2008). Le processus de DD est aujourd'hui bien décrit avec des modifications moléculaires, cellulaires et tissulaires.

1. Modifications moléculaires

Au niveau moléculaire, la DD répond à une perturbation de l'homéostasie de la MEC du NP induisant diverses modifications moléculaires. Ces modifications moléculaires interviennent principalement au niveau de la mort et de la prolifération cellulaire ainsi qu'au niveau de la synthèse de la MEC et de cytokines pro-inflammatoires (Eskola *et al.*, 2012; Martirosyan *et al.*, 2016).

La mort cellulaire dans la DD est induite par différents processus. Tout d'abord, elle peut être activée par la surproduction de caspases et notamment la voie FADD/Caspase 3 (Ohnishi *et al.*, 2019, p. 3). Ensuite, par la synthèse de protéines comme les Autophagy Related Genes 5/7 (ATG) impliquées directement dans la mort cellulaire par autophagie. Enfin, la mort cellulaire peut intervenir à cause d'un dérèglement des grandes cascades métaboliques comme les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) provoquant une mort cellulaire anormale et une forte réduction de la population cellulaire du DIV (F. zhang *et al.*, 2016).

La prolifération cellulaire dans la DD est induite par différents facteurs. Les principaux facteurs décrits sont le Transforming Growth Factor bêta (TGF- β), le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), ainsi que l'Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) (Johnson, Eisenstein and Roberts, 2001; Ding, Shao and Xiong, 2013a; S. Yang *et al.*, 2018). Ces différents facteurs interviennent dans

de nombreuses cascades métaboliques impliquées dans la prolifération cellulaire, dont le cycle cellulaire en contrôlant la synthèse des complexes cyclines/CDK (Che *et al.*, 2020).

Au cours de la DD les cytokines inflammatoires sont anormalement sécrétées. Les cytokines les plus représentées dans la DD sont : les interleukines (IL-4, IL-6, IL-12), l'Interferon- γ (IFN- γ) et le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). Ces différentes cytokines vont notamment impacter les grandes cascades métaboliques comme MAPK, nuclear factor-kappa B (NFKb) ou encore la voie Wnt jouant sur de nombreuses protéines essentielles à l'homéostasie du DIV (Risbud and Shapiro, 2014). Au cours de la DD, une surproduction des métalloprotéinases (MMPs), mais aussi des désintégrines et métalloprotéinases A avec motifs thrombospsines répétées (ADAMTs) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPS) conduisant à la dégradation du collagène et des PGs est observée (Feng *et al.*, 2006; Gaudet and Popovich, 2014a). L'altération qualitative et quantitative de la composition de la MEC du NP va conduire à une diminution de son état d'hydratation. Cette déshydratation va s'accompagner d'une baisse de la pression osmotique et à terme altérer la capacité du tissu à résister aux contraintes mécaniques provoquant de fortes douleurs ou d'autres symptômes cliniques (Fearing *et al.*, 2018). Les modifications moléculaires ne sont pas les seules à intervenir dans la DD et sont particulièrement reliées aux modifications cellulaires.

2. Modifications cellulaires

Au cours de la DD, l'importance des cellules du NP a été mise en avant. Ainsi, au cours de la DD, la densité cellulaire en NPCy du NP diminue. Cette diminution de la densité cellulaire au sein du NP s'accompagne d'une incapacité à synthétiser une MEC adaptée, tant quantitativement que qualitativement, conduisant à une déshydratation de la MEC. Les éléments initiateurs conduisant à la disparition des NPCy sont aujourd'hui encore mal identifiés et seraient liés aux CNT. En effet, il apparaît une certaine concordance entre l'apparition des premiers symptômes de la DD et la disparition des CNT. La disparition de ces CNT se fait dès la naissance avec une disparition complète de celles-ci à la maturité squelettique. L'hypothèse de l'existence d'un dialogue cellulaire entre les CNT et les NPCy a ainsi été envisagée. La disparition des CNT conduirait à une rupture du dialogue cellulaire NTC-NPCy, conduisant les NPCy à leur propre disparition progressive au cours de la vie (Erwin *et al.*, 2011; Risbud and Shapiro, 2011). Ainsi, les CNT présenteraient un effet protecteur vis à vis

des NPCy en synthétisant des facteurs spécifiques (connective tissue growth factor (CTGF), Sonic hedgehog (Shh) ainsi que le transforming growth factor beta (TGF- β)) qui permettraient de réduire l'apoptose des NPCy. Cela a pu être en partie démontré grâce aux études menées sur ces différents facteurs de croissance. Le facteur CTGF permet la maturation du NP, mais est aussi impliqué dans la DD. Le CTGF a notamment été testé sur des NPCy de chiens chondrodystrophiques, permettant alors une augmentation de la synthèse d'agrécan, de collagène de type II et une diminution du collagène de type I (Erwin *et al.*, 2011). L'absence de facteur Shh a montré une augmentation du collagène de type I au sein du NP, suggérant un impact sur la fibrose de celui-ci (Erwin *et al.*, 2006). Le TGF- β , quant à lui, permet la diminution de l'expression du transcrit galectine3 *via* la voie Smad3 au sein des NPCy (Tian *et al.*, 2016). Cette cascade métabolique se traduit par une diminution de l'expression des gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-6), ainsi que pour la protéine MMP3. Ces données permettent de confirmer l'activation de mécanismes protecteurs de ces 3 facteurs sécrétés par les CNT sur les NPCy. De récentes études ont démontré le rôle majeur des micro-ARN (miARN) dans le dialogue cellulaire (Mori *et al.*, 2019). Ces miARN sont retrouvés dans les vésicules extracellulaires et assurent le dialogue entre les cellules d'un même tissu (Clouet *et al.*, 2018; Bär, Thum and de Gonzalo-Calvo, 2019). L'impact des miARN sur la DD sera décrit dans une partie spécifique du manuscrit.

L'ensemble de ces modifications cellulaires se traduisent par des modifications tissulaires importantes du DIV.

3. Modifications tissulaires

Des modifications tissulaires ont également été décrites dans la DD. La néovascularisation et la néoinnervation des DIV ont ainsi été décrites. D'une part, la néoinnervation observée au cours de la DD est liée à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-6/8, PGE2) qui provoque une stimulation de la synthèse du Nerve Growth Factor (NGF) activant la neurogénèse. Cette neurogénèse va induire la synthèse de la substance P responsable de la douleur (Krock *et al.*, 2014). D'autre part, la néovascularisation observée au cours de la DD est notamment provoquée par l'augmentation de la synthèse du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) induite par le TNF- α provoquant l'angiogenèse, allant souvent de pair avec une désorganisation de l'AF (Lu *et al.*, 2013; Fournier *et al.*, 2020). Cette modification tissulaire de

l'AF, vient aussi de la dégénérescence du NP dont la MEC déshydratée au cours de la DD, ne permet plus l'absorption des contraintes mécaniques. Ces contraintes mécaniques sont alors transférées directement à l'AF, accentuant l'atteinte cellulaire et tissulaire de l'AF (Han *et al.*, 2012). Les PC jouent aussi un rôle dans l'apparition de la DD. En effet, une calcification des PC peut être observée avec la présence de chondrocytes hypertrophiques au sein du tissu (Rutges *et al.*, 2010). Cette néo-calcification provoque une diminution du nombre de vaisseaux sanguins, réduisant les échanges possibles avec l'AF et le NP. La réduction de l'oxygénation, de l'apport de nutriments et la mauvaise élimination des métabolites provoque la réduction de la densité cellulaire ainsi que l'altération de la MEC (Grant *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces éléments montre clairement le cercle vicieux de la physiopathologie discale.

L'ensemble des mécanismes conduisant à la DD est aujourd'hui bien documenté. Certains mécanismes restent cependant à élucider afin de comprendre et lutter contre la mise en place de la DD *via* différentes approches thérapeutiques conventionnelles ou innovantes (bio-inspirées). Ces différentes approches thérapeutiques seront présentées ci-dessous.

II- Traitements conventionnels et novateurs de la lombalgie

1. Dépistage et prévention

Avant une prise en charge adaptée, le dépistage de la DD doit être réalisé. Ce dépistage permettra notamment d'évaluer le degré d'avancement de cette DD. Pour cela, l'anamnèse de la maladie est réalisée afin de retracer les antécédents médicaux et l'historique de la plainte (Adams and Roughley, 2006). Il s'agit notamment de rechercher la présence d'une douleur constante ou épisodique au niveau du rachis lombaire. La difficulté à se pencher ou encore des brûlures, ou la présence d'engourdissements irradiants au niveau des membres inférieurs et supérieurs seront des signes cliniques également recherchés. L'imagerie médicale permettra d'apporter des éléments contributifs aux symptômes évoqués. La radiographie aux rayons X, le scanner et l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) seront notamment réalisés (da Costa *et al.*, 2020). Ces différentes techniques d'imagerie permettent d'obtenir différents renseignements complémentaires afin de définir l'état de DD et vertébrale. La

radiographie du rachis permet la détermination de la hauteur discale ainsi que la présence de calcifications intradiscales. Une discographie sous fluoroscopie en injectant un produit de contraste *in situ* dans le DIV (Ogon *et al.*, 2019), afin de distinguer AF et NP et de provoquer en réaction à l'injection une douleur chez le patient, est un examen également proposé dans certains cas. Cette technique est aujourd'hui rarement réalisée au regard de son caractère invasif et l'existence d'une DD induite suite à l'effraction de l'AF au décours de l'injection (Lipscomb *et al.*, 2017). Le scanner permet l'évaluation de la morphologie discale et de sa densité. L'IRM représente aujourd'hui l'examen d'imagerie de référence afin de définir l'état de dégénérescence du DIV. La réalisation de différentes séquences IRM (T1, T2 notamment) permet de définir l'état d'hydratation des DIV et d'évaluer la densité osseuse des plateaux cartilagineux. Différentes classifications ont ainsi été proposées à partir des images IRM, parmi lesquelles les classifications de Modic et de Pfirrmann. La classification de Modic permet, en comparant les signaux des séquences en T1 et T2, de distinguer 3 stades de DD (Modic *et al.*, 1988) (**Figure 6**). La classification de Pfirrmann permet de définir cinq grades de Pfirrmann (I à V) (**Figure 7**). Les grades sont définis en fonction de l'intensité du signal de la séquence en T2 enregistré à l'IRM au niveau du NP, la distinction possible ou non entre NP et AF et la variation de la hauteur discale (Pfirrmann *et al.*, 2001).

L'ensemble des éléments (anamnèse, tests cliniques, imagerie) vont permettre au praticien d'établir un diagnostic final et d'adapter la prise en charge, au regard notamment du caractère handicapant des douleurs chez le patient. Aujourd'hui, la prise en charge conventionnelle des patients atteints de DD est essentiellement médicamenteuse et/ou chirurgicale et sera traitée dans le paragraphe suivant (HAS, 2015).



Figure 6 : Classification de Modic de la dégénérescence discale évaluée par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

Les différents signaux hypo-intenses et hyper-intenses en séquences T1 et T2 permettent de définir 3 stades de dégénérescence discale (d'après Zhang et al. 2008).

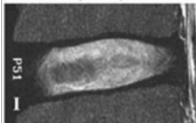
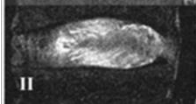
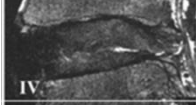
Grade de Pfirrmann (IRM)	Grade	Structure	Distinction NP/AF	Intensité du signal	Hauteur discale
	I	Homogène blanche brillante	Nette	Hyper-intense	Normale
	II	Homogène +/- barres horizontales	Nette	Hyper-intense	Normale
	III	Inhomogène gris	Difficile	Intermédiaire	Normale à légèrement diminuée
	IV	Inhomogène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

Figure 7 : Classification de Pfirrmann de la dégénérescence discale évaluées par IRM (D'après Pfirrmann et al. 2001).

Préalablement à la mise en place des traitements conventionnels, la prévention du mal du dos occupe de plus en plus de place dans nos sociétés industrialisées et modernes. Cette prévention a pour objectifs de prévenir l'arrivée des douleurs et de soulager ou de ralentir l'apparition de douleurs chroniques invalidantes. Il existe trois niveaux de prévention (Steffens *et al.*, 2016). La prévention primaire a pour objectif d'empêcher ou de retarder l'apparition des lombalgies. Il s'agit notamment d'évaluer les risques socio-professionnels du « patient », de présenter les solutions pour limiter ces risques en particulier posturaux, de proposer des modifications du mode de vie et de l'environnement. Cela consiste majoritairement en la prévention par l'apprentissage à l'aide de séminaires sur les causes et les risques de la lombalgie discogénique, encore appelée École du dos (Parreira *et al.*, 2017). La prévention secondaire a pour objectif de limiter le développement ou l'impact de la maladie sur le patient, et est souvent associée à une prise en charge médicamenteuse. Il s'agit le plus souvent de la prise en charge d'un patient souffrant d'une douleur lombaire aiguë. La prévention tertiaire, associée là aussi à une prise en charge médicamenteuse et/ou chirurgicale, correspond à la rééducation des patients souffrant de douleurs lombaires chroniques. Ces patients sont pour la plupart en arrêt de travail et sont soumis à des protocoles de rééducation au sein de structures spécialisées. Le suivi par les patients de règles hygiéno-diététiques (HAS, 2015) est

aujourd'hui également proposé. Il est également bien établi que la pratique physique régulière et modérée (permettant notamment de disposer d'une musculature abdominale et dorsale adaptée) permettent de prévenir la DD. Enfin, les massages, la balnéothérapie, la stimulation électrique transcutanée (TENS) et l'acupuncture montrent une certaine efficacité à court terme, mais aucune étude scientifique ne montre une efficacité à long terme (Furlan *et al.*, 2015).

2. Les traitements conventionnels

Les traitements actuels visent en particulier à améliorer la qualité de vie du patient, notamment en diminuant les douleurs. L'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé) a établi une prise en charge complète allant des traitements non-pharmacologiques, pharmacologiques, aux traitements chirurgicaux pour les stades les plus graves ou réfractaires aux traitements pharmacologiques.

Les traitements non-pharmacologiques sont les premiers envisagés et se basent sur :

- Une prise en charge rééducative par des professionnels de santé basée sur la pratique sportive, la kinésithérapie et le renforcement musculaire. Cette prise en charge montre des résultats antalgiques satisfaisants et permet d'améliorer la mobilité discale (Williams *et al.*, 1991; Belavý *et al.*, 2016, 2017).
- Un accompagnement à la perte de poids. En effet, l'obésité augmente les contraintes mécaniques subies par les DIV et peut s'accompagner de problèmes métaboliques pouvant favoriser l'apparition des lombalgies.

En cas d'échecs de ces traitements non-pharmacologiques ou en parallèle, des traitements pharmacologiques sont proposés. Ceux-ci ont pour but de réduire la douleur afin de permettre une réhabilitation socio-professionnelle. Les traitements les plus utilisés sont les antalgiques ainsi que les anti-inflammatoires (AI) administrés *per os* ou par voie injectable ou par voie cutanée (topique). Différents paliers d'antalgiques sont ainsi proposés (Airaksinen *et al.*, 2006). Il s'agit du paracétamol, des AI non-stéroïdiens (AINS), des AI stéroïdiens (AIS), des opiacés et des myorelaxants. La prise en charge se fait de façon progressive avec en première intention l'utilisation du paracétamol puis des AINS (ibuprofène, célécoxib, kétoprofène, naproxène et étoricoxib)(Stafford, Peng and Hill, 2007; S. B. G. Blanquer, Grijpma and Poot,

2015). L'utilisation des stéroïdes et corticostéroïdes (méthylprednisolone, hydrocortisone, triamcinolone et dexaméthasone) peuvent être proposés en injection à proximité des zones douloureuses. Ce sont de petites molécules inhibant la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, et présentant également une activité immunosuppressive. Ces molécules ont une action rapide et efficace à court terme (Stafford, Peng and Hill, 2007). En cas de douleurs réfractaires, l'utilisation des opioïdes peut être proposée. Ce sont des molécules agissant directement sur le système nerveux central et périphérique. Deux types d'opioïdes peuvent être utilisés, les opioïdes faibles tels que le tramadol et les opioïdes forts comme la morphine, l'oxycodone ou l'hydromorphone (Radcliff *et al.*, 2013). Certes très efficaces, les opioïdes présentent un risque d'addiction qu'il est important de prendre en compte lors de la prise en charge du patient (Kuritzky and Samraj, 2012). Ces traitements antalgiques peuvent être complétés par des myorelaxants comme les benzodiazépines (van Tulder *et al.*, 2003). Tous ces traitements prennent en charge uniquement la douleur. Ils sont efficaces à court terme, mais l'échappement est souvent commun à long terme. De plus, ces traitements ne peuvent pas être pris indéfiniment et les injections répétées des AIS ne sont pas préconisées. En cas de douleurs réfractaires et d'une sévérité importante de la DD, des traitements chirurgicaux peuvent alors être proposés par les praticiens du rachis.

Deux techniques chirurgicales sont essentiellement proposées par les praticiens : l'arthrodèse et l'arthroplastie (**Figure 8**). L'arthrodèse est considérée comme le « gold standard » en terme de prise en charge chirurgicale (Phillips, Reuben and Wetzel, 2002). Elle consiste à éliminer le DIV dégénéré et induire la fusion des deux vertèbres sus- et sous-jacentes, à l'aide de cages de fusion. Les cages de fusion, disponibles sur le marché, sont constituées de fibres de carbone ou de polyétheretherketone (PEEK), deux biomatériaux IRM compatibles (Phillips, Reuben and Wetzel, 2002). Afin de faciliter la fusion vertébrale, l'association de greffons osseux associée à l'implantation des cages de fusion est également proposée dans certains cas. Les résultats cliniques de l'arthrodèse montrent une diminution des douleurs lombaires dans 70 à 80 % des cas (D.-Y. Bai *et al.*, 2019). Néanmoins, malgré une amélioration de la qualité de vie du patient deux ans post-chirurgie, les résultats à long terme de l'arthrodèse ne montrent pas de résultats supérieurs aux traitements pharmacologiques (Buser *et al.*, 2019). L'arthrodèse s'accompagne également d'une réduction de la mobilité de la colonne vertébrale, induisant des modifications des propriétés biomécaniques à l'origine de processus de DD au niveau de

DIV adjacents (« effet domino »). A long terme, il est estimé que 30 % des patients traités par arthrodèse posséderont une diminution de la qualité de vie à long terme liée à cet « effet domino » (Shaw *et al.*, 2019). La seconde technique chirurgicale proposée est l'arthroplastie. Elle consiste au remplacement partiel ou total du DIV dégénéré par une prothèse discale (Anderson and Rouleau, 2004). Différentes prothèses discales sont aujourd'hui disponibles, basées sur le remplacement total (SB charité III®, Depuy ; PRODISC-L®, Synthes) ou partiel du DIV (Prosthetic Device Nucleus Hydraflex model [PDN-Hydraflex®], Raymedica Inc., MN). Contrairement à l'arthrodèse, l'arthroplastie permet théoriquement de limiter l'impact sur les DIV adjacents en conservant les propriétés mécaniques du DIV. Le principal risque de ce type de prothèses discales est cependant le déplacement et le descellement de la prothèse au fil du temps avec des conséquences fonctionnelles majeures pour le patient.

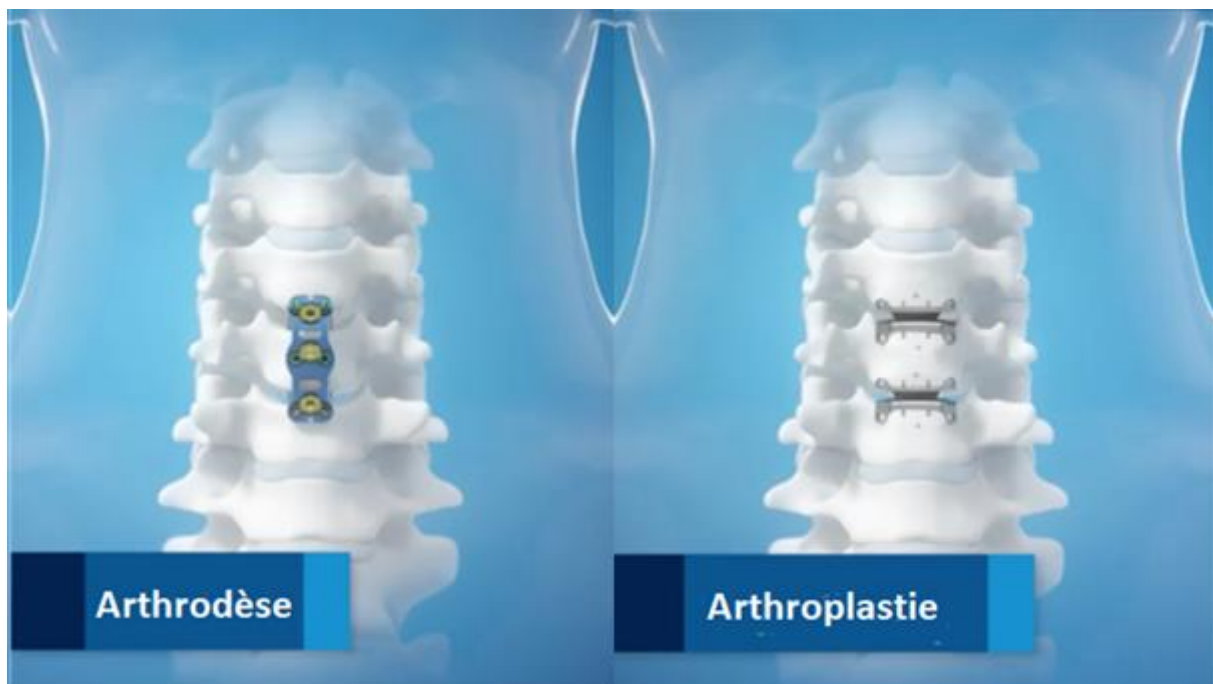


Figure 8 : Approches chirurgicales de prise en charge des douleurs lombaires : arthrodèse et arthroplastie.

Techniques chirurgicales classiquement utilisées dans la prise en charge de la dégénérescence discale (d'après Rasouli Spine, www.rasoulispine.com/, visité le 10/11/2021). L'arthrodèse consiste à fusionner définitivement une ou plusieurs vertèbres douloureuses de la colonne vertébrale, l'arthroplastie consiste à remplacer le disque intervertébral lésé par une prothèse de disque artificielle.

L'ensemble des traitements présentés permettent de réduire la douleur ressentie par le patient mais aucun ne s'attaque véritablement au processus menant à la DD. Comme énoncé précédemment, les connaissances acquises autour de la physiopathologie discale ont permis d'envisager le développement de nouvelles approches thérapeutiques innovantes bio-

inspirées. Il s'agit en particulier des approches de médecine régénératrice qui visent à restaurer le tissu discal (Clouet *et al.*, 2018).

3. La médecine régénératrice

Les connaissances acquises autour de la physiopathologie discale permettent d'envisager plusieurs approches en médecine régénératrice du DIV. Ces approches peuvent être regroupées en trois grandes stratégies : la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire et les biothérapies.

A. La thérapie cellulaire

Il est bien établi aujourd'hui que la DD peut être expliquée par la disparition des cellules résidentes au sein du NP (Vergroesen *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2019). La disparition de ces cellules conduit notamment à une synthèse de MEC inadaptée et une rupture de l'homéostasie discale. Ainsi, la thérapie cellulaire s'est imposée naturellement comme une approche particulièrement prometteuse. La thérapie cellulaire consiste en la supplémentation en cellules du NP dégénéré. L'objectif principal est de rétablir l'homéostasie discale à l'aide de cellules capables de sécréter une MEC fonctionnelle. Différentes sources de cellules régénératrices ont été proposées ces dernières années. Logiquement, les cellules natives du NP récoltées à partir de DIV du patient (autologue) ou issus de cadavres (aalogénique), ont été les premières utilisées, avec des résultats prometteurs dans les études pré-cliniques chez l'animal et les essais cliniques chez l'homme (Meisel *et al.*, 2007). Cependant, leur utilisation ultérieure a été considérablement entravée par le faible nombre de cellules obtenues lors des prélèvements, leur faible capacité de prolifération et la comorbidité importante liée au prélèvement de ces cellules au niveau de DIV adjacents sains chez les patients (Meisel *et al.*, 2007; Hohaus *et al.*, 2008). Au regard de certaines similitudes phénotypiques avec les chondrocytes articulaires, ces derniers ont aussi été testés dans plusieurs études. Les études cliniques ont confirmé une certaine efficacité, avec une amélioration de la qualité de vie des patients (Acosta *et al.*, 2011; Sakai and Andersson, 2015). L'utilisation des chondrocytes articulaires souffre néanmoins des mêmes limites que celles des cellules du NP, avec également un phénotype éloigné du phénotype singulier des cellules du NP décrit précédemment (Paesold, Nerlich and Boos, 2007).

Ces dernières années, l'utilisation de Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) pour traiter la DD a été largement étudiée. L'utilisation des CSM s'est imposée grâce à leur propriété intrinsèque de différenciation (**Figure 9**), permettant de répondre à l'objectif de rétablissement de l'homéostasie discale à l'aide de cellules capables de sécréter une MEC fonctionnelle. S'ajoute à cette propriété de différenciation un rôle trophique potentiel des CSM avec des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires (Gugjoo *et al.*, 2020).

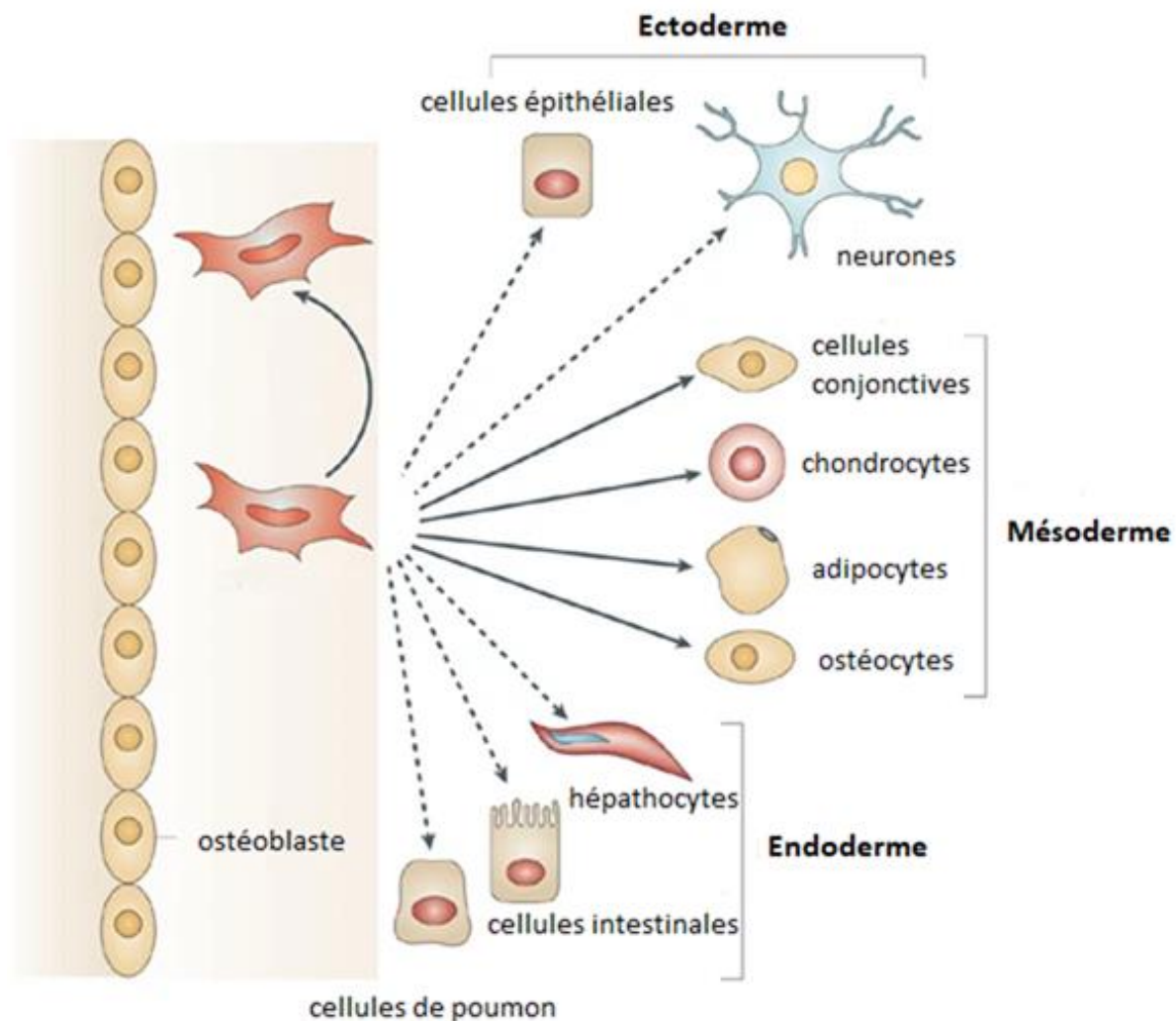


Figure 9 : Propriétés de différenciation et de transdifférenciation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM).

Cette figure montre la capacité des CSM de la moelle osseuse à s'auto-renouveler et à se différencier vers la lignée mésodermique. Les CSM possèdent aussi la capacité signalée à se transdifférencier en cellules d'autres lignées (ectoderme et endoderme) (adaptée d'après Uccelli *et al.* 2008).

Les CSM présentent également une capacité d'auto-renouvellement et une tolérance immunitaire liée à un phénotype immun spécifique (CD90+, CD73+, CD105 +, CD34, CD45)(Nauta and Fibbe, 2007). Les CSM peuvent être d'origine autologue (patient),

allogénique (donneur) ou xénogénique (animal). L'origine autologue des CSM, utilisant les cellules du patient, implique cependant une amplification *in vitro* avant implantation, ce qui augmente largement le temps de prise en charge du patient avec deux temps opératoires espacés de quelques semaines. Cela n'est pas le cas lors de l'utilisation de cellules d'origine allogénique (issues d'un donneur et conservées *via* des banques de cellules) ou xénogénique (d'origine animale). L'utilisation des cellules allogéniques ou xénogéniques, plus facilement disponibles, a également été évaluée, avec des résultats comparables et sans réaction immunitaire, compte tenu de l'hypovascularisation et du privilège immunitaire du DIV (Henriksson *et al.*, 2009; Prologo *et al.*, 2012; Pettine *et al.*, 2015). Différentes sources de CSM peuvent être distinguées : moelle osseuse, tissu adipeux, derme, liquide synovial, cordon ombilical, placenta et liquide amniotique. Leur densité ainsi que leur capacité de différenciation au sein de ces différents tissus est variable. Cette densité varie de 0.002 % dans le liquide synovial, 0.01 % dans la moelle osseuse à 2 % dans le tissu adipeux (Kern *et al.*, 2006). Les capacités de différenciation en lignées ostéo- et chondrogéniques sont supérieures pour les CSM issues de moelle osseuse comparées aux CSM issues du tissu adipeux (Minteer, Marra and Rubin, 2013). Au regard de ces propriétés de différenciation et des différences phénotypiques entre les cellules du NP et les chondrocytes articulaires (évoquées précédemment), la différenciation nucléopulpogénique des CSM en NPCy a été investiguée. L'étude du Dr. Colombier, au sein du laboratoire RMeS, a permis de démontrer les propriétés de différenciation en NPCy des cellules stromales adipocytaires humaines (hCSA) (**Figure 10**). En effet, les résultats obtenus ont permis de définir un protocole de différenciation reproductible en associant les facteurs de croissance TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) et de GDF-5 (Growth Differnciation Factor-5)(Colombier *et al.*, 2016). Les propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires des CSM sont également aujourd'hui bien décrites. Différentes molécules sont ainsi sécrétées par les CSM à l'origine de ces propriétés. Il s'agit notamment de molécules de la famille des interleukines (IL-6, IL-10, PGE2...) (Murphy, Moncivais and Caplan, 2013). Certains résultats ont ainsi pu démontrer que l'expression de molécules pro-inflammatoires était diminuée par l'ajout de CSM au niveau du DIV dégénéré. Une diminution de l'expression des facteurs pro-inflammatoires, s'accompagnant d'une diminution de l'altération de la MEC et de la mort cellulaire, sont ainsi observées (Nauta and Fibbe, 2007; Miguélez-Rivera *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2018).

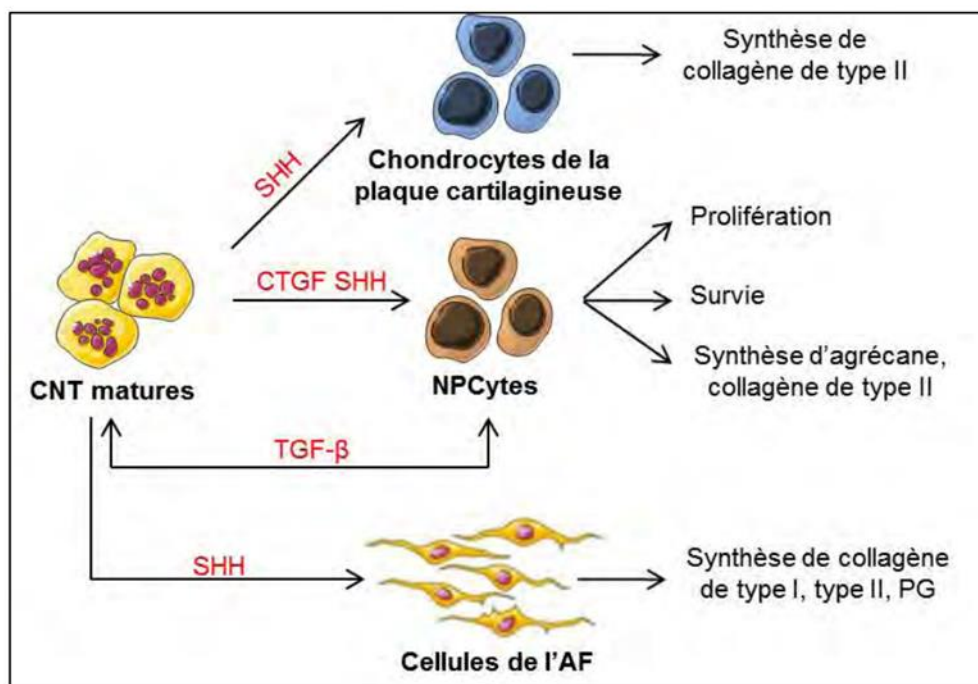


Figure 10 : Définition des facteurs sécrétés par les cellules notochordales (CNT) impliqués dans le dialogue cellulaire intradiscal.

Les CNT permettent la production de matrice extracellulaire (MEC) par les cellules de l'annulus fibrosus (AF) *via* la sécrétion de SHH. Les nucléopulposocytes, grâce à la sécrétion de TGF-β, de CTGF et de SHH, possèdent une meilleure prolifération et survie cellulaire et produisent plus de MEC. Les chondrocytes de la plaque cartilagineuse produisent plus de MEC grâce à la sécrétion de SHH (d'après la thèse de doctorat de Pauline Colombier 2016). TGF-béta: Transforming Growth Factor Beta CRGF: Corticotropin-Releasing Factor; SHH: Sonic hedgehog

Les propriétés des CSM en font ainsi des candidates certaines pour de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la DD et différentes études précliniques et cliniques ont ainsi été menées ces dernières années. Les études précliniques chez l'animal ont permis de confirmer la néo-synthèse d'une MEC adaptée, riche en protéoglycanes, s'accompagnant d'une réhydratation du DIV et une augmentation partielle de la hauteur discale (Jeong *et al.*, 2009; Marfia *et al.*, 2014; Omlor *et al.*, 2014). La comparaison des résultats et les conclusions obtenues sont néanmoins rendues difficiles par la multitude de modèles animaux (qu'ils soient spontanés ou induits), les concentrations variables en CSM injectées et les origines diverses des CSM (autologues ou allogénique). Ces résultats encourageants ont conduit à la réalisation d'essais cliniques chez l'homme. La sécurité et la faisabilité de l'utilisation de CSM non-différenciées ont été validées dans plusieurs études de cohorte non randomisées sur des personnes affectées par une lombalgie discogénique ($\geq$ stade II selon la classification de Pfirrmann) et ne répondant pas aux traitements standards. Collectivement, environ 65 % des patients ont signalé une amélioration de l'Indice d'Invalidité d'Oswestry (IDO) et de l'Echelle Visuelle Analogique (EVA) tout au long d'un suivi de 6 à 72 mois des patients (Orozco *et al.*, 2011). Dans une autre étude, environ 30 % des patients ont montré une amélioration du grade de Pfirrmann après 12 mois (Pettine *et al.*, 2015). Aucune de ces études n'a signalé d'effets

indésirables graves. Il faut toutefois souligner le faible nombre de patients inclus dans ces études, l'absence de randomisation et la grande variabilité de la source et de la concentration des cellules injectées. Actuellement, dix essais cliniques utilisant des cellules souches pour la régénérescence du DIV sont en cours. Parmi ceux-ci, 7 essais cliniques (EudraCT n° 2019-002749-4074, NCT03737461, NCT02412735, NCT03340818, NCT03692221, NCT03461458, NCT04759105) sont randomisés *versus* placebo, tandis que les 3 autres essais cliniques (NCT03912454, NCT0449910577, NCT04414592) constituent des études de cohorte non-randomisées. Les critères d'inclusion permettent le recrutement d'individus adultes affectés par une lombalgie chronique ne répondant pas aux traitements conventionnels et présentant des symptômes de DD identifiés en radiologie (confirmées par IRM selon la classification de Pfirrmann). L'objectif de ces études est d'évaluer l'efficacité d'une transplantation intradiscale de CSM en termes de sécurité et d'amélioration de la douleur, tout en évaluant les propriétés régénératives des CSM par imagerie (hauteur discale, signal en T2).

L'origine de ces CSM utilisées reste aussi un point de discussion. Ainsi, dans le cas des études utilisant des cellules d'origine autologue (Orozco *et al.*, 2011; Pettine *et al.*, 2015), (**Tableau 1**) une étape préalable de culture *in vitro* des cellules. Cette étape s'accompagne d'une augmentation du risque de contaminations (bactériennes, fongiques ou virales), implique deux temps opératoires pour le patient et un coût de préparation supérieur. Des limites éthiques et réglementaires sont aussi à prendre en compte. En effet, les médicaments de thérapie cellulaire appartiennent à la classe des Médicaments de Thérapie Innovante (MTI ou ATMP Advanced Therapy Medicinal Products) dont le règlement 1394/2007 donne le cadre pour l'autorisation de mise sur le marché (AMM). Ainsi, les approches de thérapie cellulaire ont montré des résultats satisfaisants mais ceux-ci restent perfectibles. La vectorisation des CSM au sein du NP et le risque de mort cellulaire lié aux forces de cisaillement mais également à l'environnement discal particulier (osmolarité, pH, hypoxie) ont conduit ces dernières années à envisager l'association de biomatériaux aux cellules transplantées. Cette approche correspond à la définition de l'ingénierie tissulaire développée ci-après.

Tableau I : Avantages et limites des différents types cellulaires utilisés dans le cadre d'une thérapie cellulaire discale.

Sources cellulaires	Avantage	Inconvénients
Cellules du NP autologues	- Phénotype identique - Synthèse de MEC discale	- Morbidité au site donneur - Risque de DD des étages adjacents - Faible nombre cellulaire - Risque de dédifférenciation lors des étapes d'amplification <i>in vitro</i>
Chondrocytes articulaires	- Similitudes phénotypiques	- Morbidité douloureuse au site donneur - Risque de dédifférenciation lors des étapes d'amplification <i>in vitro</i>
CSM	- Facilité d'accès (CSA++) - Importante capacité d'amplification <i>in vitro</i> - Multipotence et capacité de transdifférenciation - Tolérance immunitaire	- Nécessité de différenciation - Risque de dédifférenciation - Législation limitante face aux applications <i>in vivo</i>

B. Ingénierie tissulaire

Les biomatériaux représentent l'un des composants clés de l'ingénierie tissulaire. Les objectifs de leur utilisation sont multiples et sont dépendants des indications envisagées. Ainsi, les biomatériaux peuvent être utilisés afin de permettre la vectorisation *in situ* des cellules, de maintenir la viabilité des cellules, de permettre la prolifération et la différenciation des cellules réparatrices et enfin d'apporter des propriétés mécaniques adaptées au tissu visé par la thérapie. La biocompatibilité de ces biomatériaux est un critère majeur qui doit être pris en compte afin de permettre aux cellules d'apporter ensuite leurs propriétés régénératrices.

Dans le contexte d'une application discale, l'ingénierie tissulaire constitue une alternative prometteuse pour la restauration de la fonction physiologique d'un DIV endommagé (Schutgens *et al.*, 2015). Plusieurs études précliniques ont été menées, utilisant différents modèles animaux et ont montré des résultats prometteurs dans la régénérescence du DIV. Différents biomatériaux ont été utilisés, pouvant être classés en deux familles (Sakai and Andersson, 2015; Clouet *et al.*, 2018; Henry *et al.*, 2018a) : les biomatériaux d'origine naturelle et les biomatériaux d'origine synthétique. Les caractéristiques intrinsèques du tissu discal, en particulier l'hydratation élevée de la MEC du NP, conduisent à envisager l'utilisation de biomatériaux capables de former des hydrogels. Ces hydrogels présentent en effet un taux d'hydratation souvent élevé. Seuls ces biomatériaux seront traités ci-après.

1. Biomatériaux d'origine naturelle

Le collagène, protéine la plus abondante chez les mammifères, s'est naturellement imposé comme biomatériau pour différentes applications biomédicales (Sarker *et al.*, 2015). Son utilisation pour des applications discales a été décrite et montre des résultats intéressants compatibles à la régénération des DIV (Sarker *et al.*, 2015). L'atélocollagène, un dérivé du collagène dont l'immunogénicité serait moindre, est considéré comme une des matrices de base pour les matériaux implantables et a été notamment développé dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du DIV pour permettre une meilleure implantation des cellules dans le tissu et permettre une régénérescence du DIV (Lee *et al.*, 2012)

La fibroïne de soie peut elle aussi être utilisée. Il s'agit de la protéine constitutive à 65% de la soie produite notamment par le vers à soie (Liu *et al.*, 2015). Cette protéine de la soie possède une grande résistance à la compression (Salehi, Koeck and Scheibel, 2020). Biodégradable, ce biomatériau se dégradera après implantation selon un rythme suffisamment lent pour permettre la régénérescence correcte des tissus (Horan *et al.*, 2005). La fibroïne peut également être fonctionnalisée de façon covalente par des peptides d'intérêt. Cette fonctionnalisation a pour objectif l'amélioration de l'attachement des cellules au sein du tissu (Bhattacharjee *et al.*, 2016). A noter, que la soie a récemment été utilisée comme modèle afin de reproduire la structure fibreuse et l'orientation spatiale, ainsi que les propriétés mécaniques de l'AF (Bhunja, Kaplan and Mandal, 2018).

Le chitosan et l'alginate sont d'autres biomatériaux qui ont été proposés dans l'ingénierie tissulaire du DIV. Le chitosan est un polysaccharide constitué des monomères suivants : la D-glucosamine liée en β -(1-4) et de la N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée). Ce polymère est considéré comme biodégradable *via* la dégradation enzymatique de la chitosanase, enzyme présente dans le microbiote intestinal. Il est également considéré comme biocompatible, et démontre des propriétés antimicrobiennes (Ehmann *et al.*, 2015). L'alginate est un polysaccharide linéaire composé des monomères d'acide α -L-guluronique et d'acide β -D-mannuronique. En raison de sa biocompatibilité et de sa biodégradabilité (par l' α -amylase présente dans la salive), l'alginate est utilisé dans de nombreuses applications biomédicales, y compris dans l'ingénierie tissulaire (par exemple, comme matrice de support) et dans l'administration de médicaments (Growney Kalaf *et al.*, 2016). Ces deux matériaux ont été

utilisés dans de nombreuses études. Les résultats ont permis de démontrer des propriétés mécaniques similaires au DIV et la possibilité pour les cellules de proliférer au sein de ces biomatériaux (Shao and Hunter, 2007; Zhang *et al.*, 2014; Syeda Masooma Naqvi and Buckley, 2015; Growney Kalaf *et al.*, 2016).

2. Biomatériaux d'origine synthétique

En plus des polymères naturels et des matériaux dérivés des polymères naturels, les polymères synthétiques sont également largement utilisés dans l'ingénierie tissulaire (Baolin and Ma, 2014). Les polymères synthétiques présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux polymères naturels, notamment une synthèse reproductible, des propriétés prévisibles, une absence d'immunogénicité et une transformation facile en structures et implants souhaités. Par exemple, les polyesters synthétiques sont largement utilisés dans la régénération des tissus du DIV comme la polycaprolactone (PCL), l'acide polylactique (PLA) ou l'acide polyglycolique (PGA) et leurs copolymères produits à partir des monomères respectifs (Du *et al.*, 2019).

De récentes études sur le PCL ont été réalisées. Il s'agit essentiellement d'approches de reproduction de la structure de l'AF et ne seront pas traités ici (Christiani *et al.*, 2019; Gluais *et al.*, 2019).

Récemment, les études menées avec le PLA ont montré un intérêt certain pour le développement notamment de modèles de DIV obtenus par impression 3D. Ce modèle de DIV artificiel montre ainsi des propriétés biomécaniques proches de celles du DIV *in vivo*. Ces modèles permettent d'étudier l'effet des contraintes mécaniques sur le DIV mais aussi d'entrevoir la possibilité de remplacement du DIV par des systèmes complexes permettant une fonction proche de celle du DIV humain, voir même une re-cellularisation grâce à ces biomatériaux (M. Zhu *et al.*, 2021).

Le PGA a lui aussi été utilisé dans le développement d'hydrogels comportant des propriétés mécaniques proches du DIV. Une étude récente montre sa capacité de régénérescence d'un défaut induit par une injection au niveau d'un DIV bovin (J.-J. Yang *et al.*, 2018).

Le développement de ces biomatériaux permet d'envisager de nouvelles perspectives dans le domaine des biothérapies et peuvent aboutir à des stratégies multifactorielles intéressantes pour contrecarrer la DD.

C. Biothérapies

La physiopathologie discale complexe présentée ci-dessus permet aujourd'hui d'envisager la mise en place d'approches thérapeutiques bioinspirées. Parmi ces biothérapies, l'utilisation des anticorps monoclonaux, des facteurs de croissance, des peptides et des oligonucléotides a été considérée.

Le traitement par des anticorps monoclonaux, ciblant l'activité notamment des cytokines, a été évalué pour le traitement de la DD. L'essai clinique de phase III « BackToBasic » est actuellement en cours en Norvège pour déterminer l'efficacité de quatre perfusions intraveineuses (5 mg/kg) d'infliximab, un inhibiteur du TNF- α , chez des patients souffrant de lombalgie (Gjefsen *et al.*, 2020). Un autre traitement par un anticorps monoclonal anti-TNF- α , l'adalimumab, a également été testé chez des patients souffrant de sciatique sévère et aiguë et a permis une réduction de la nécessité à long terme d'une chirurgie dorsale (Genevay *et al.*, 2012). Une autre stratégie d'anticorps monoclonaux implique un traitement par l'anticorps anti-NGF (Neural Growth Factor), le tanezumab, visant à réduire le niveau de NGF dans le tissu discal. Dans un essai de phase III, impliquant 1 832 patients souffrant de lombalgie chronique, le traitement par tanezumab a permis une amélioration de la douleur par rapport au traitement par *placebo* (Pfizer, 2020). Cependant, le traitement n'a pas réussi à modifier la progression de la maladie et a eu des effets minimes en termes d'amélioration structurelle du NP. L'ensemble de ces approches consiste en l'utilisation d'anticorps monoclonaux injectés par voie systémique. Au-delà des effets indésirables systémiques potentiels, l'efficacité sur un processus intra-discal reste cependant hypothétique. Actuellement, aucun traitement de ce type ne dispose de l'AMM dans l'indication de prise en charge des lombalgies.

Les thérapies utilisant des facteurs de croissance ont également été évaluées au regard de leur intérêt pour stimuler l'anabolisme cellulaire et permettre la synthèse de protéines de la MEC. Leur utilisation, contrairement aux anticorps monoclonaux, est basée sur leur injection *in situ* au sein du NP. Leur intérêt résulte également d'études du polymorphisme génétique lié à certains gènes. Ainsi, au sein d'une cohorte de femmes, l'existence d'un polymorphisme

génétique au niveau du gène codant pour le GDF5 conduit à une diminution de sa transcription, s'accompagnant d'un risque de DD lombaire accru (Williams *et al.*, 2011, p. 5). Plusieurs études précliniques ont ainsi été menées afin d'évaluer l'intérêt d'une injection de GDF5 au sein du DIV. Dans un modèle de rat, l'injection du GDF5 a démontré une capacité à atténuer le processus de DD (Jian Zhu *et al.*, 2019). Des essais cliniques humains ont également débuté mais les résultats sont pour le moment inconnus (NCT00813813). L'intérêt de l'utilisation de facteurs de croissance est néanmoins limité par leur durée de vie nécessitant des injections répétées avec des conséquences potentielles sur le tissu traité. Ainsi, les systèmes à libération prolongée sont amenés à se développer afin de protéger le facteur de croissance et permettre une libération progressive et une certaine rémanence au sein du tissu garantissant un effet thérapeutique potentiel. Cette stratégie, avec l'utilisation de systèmes microparticulaires pour vectoriser le facteur de croissance a d'ores et déjà été envisagée au sein du laboratoire RMeS. Ainsi, une étude a permis de montrer que la co-délivrance *via* des systèmes microparticulaires (microparticules de pullulane), du GDF5 et de chimiokines (CCL5 notamment) permettait un recrutement (*in vitro* et *ex vivo*) des cellules progénitrices présentes en périphérie du DIV et permettait la néo-synthèse d'une MEC discale (Frapin *et al.*, 2020).

L'utilisation de biomolécules actives de petite taille est également envisagée mais les investigations sont particulièrement disparates. Il s'agit notamment du peptide YH14628, correspondant au site de liaison du TGF- β au niveau du biglycane. Ce peptide a fait l'objet de deux essais cliniques mais les résultats ne sont pour le moment pas publiés (Yuhan Corporation, 2015, 2016). En 2020, un essai clinique de phase I sur un oligomère d'ADN court (AMG0103) a été réalisé. Cet oligomère permet de supprimer l'expression du gène codant pour NF- κ B, qui inhibe un groupe de gènes impliqués dans les réponses immunitaires inflammatoires (AnGes, Inc., 2020). D'autres molécules sont actuellement en cours d'investigation mais ce type d'approche, comme pour les facteurs de croissance, souffre des mêmes inconvénients relatifs à leur durée de vie courte.

Ces différentes études montrent cependant que le ciblage spécifique des voies anaboliques, anti-cataboliques et inflammatoires est une stratégie prometteuse. L'utilisation d'oligonucléotides ayant une action sur différents gènes est également envisagée au regard des connaissances acquises autour de la physiopathologie discale. La découverte des miARN

et de leur rôle dans le processus de la DD soulève ainsi de nombreux espoirs. L'utilisation de ces miARN sera ainsi traitée dans la partie suivante.

III- Une nouvelle stratégie pour contrecarrer la dégénérescence discale : la vectorisation des miARN

Cette partie a pour objectif de présenter les grandes lignes relatives au miARN, leur implication dans la DD et le développement de vecteurs adaptés. Une revue, non finalisée, est jointe au manuscrit et sera soumise dans *Advanced Drug Delivery Reviews*.

1. miARN et dégénérescence discale

A. Découverte des miARN et généralités

L'attrait pour les séquences codantes pour des protéines a mis à l'écart pendant de nombreuses années l'étude de toutes les séquences non codantes. Ce n'est qu'en 1993 que l'importance des miARN a commencé à être révélée (Lee, Feinbaum and Ambros, 1993).

Il y a presque 30 ans, l'existence et l'importance des miARN étaient totalement inconnues. Jusqu'alors, la communauté scientifique se concentrait sur les gènes qui codent pour les protéines. En 1993, lin-4 fut le premier miARN à être découvert, par les efforts conjoints des laboratoires d'Ambros et de Ruvkun (Lee, Feinbaum and Ambros, 1993). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, le développement de tous les stades larvaires est contrôlé par différents gènes. L'un des gènes essentiels identifié est lin-4 dont l'absence s'accompagne d'un échec du développement larvaire (Horvitz and Sulston, 1980). Les animaux présentant des mutations de lin-4 sont ainsi dépourvus de certaines structures adultes, incapables de pondre des œufs et possèdent un développement larvaire tardif. En 1987, Ferguson *et al*, ont découvert qu'une mutation suppressive dans le gène lin-14 était capable d'inverser le phénotype de la mutation lin-4 (Ferguson, Sternberg and Horvitz, 1987). En réalité, les mutations du gène lin-14 ont provoqué un phénotype exactement opposé à celui des mutations lin-4. Ce phénotype opposé entre les défauts des gènes lin-4 et lin-14 indiquait que lin-4 pouvait réguler négativement lin-14 (Ferguson, Sternberg and Horvitz, 1987). En 1989, Ambros a travaillé sur le clonage du gène lin-14. Ambros a découvert qu'un fragment de 700 paires de bases pouvait contenir le gène lin-4, mais n'a pas trouvé les codons de départ et

d'arrêt conventionnels. Par conséquent, Ambros en a conclu que lin-4 ne codait pas pour une protéine (Lee, Feinbaum and Ambros, 2004). De plus, ils ont trouvé deux transcrits de petite taille de lin-4, respectivement de 61 et 22 nucléotides. Un nouveau mécanisme de régulation cellulaire inattendu impliquant un transcrit non codant pour les protéines avait donc été découvert. Ensuite, let-7 a été découvert : comme lin-4, let-7 est un gène de *C. elegans* et a été le deuxième miARN à être identifié. Reinhart *et al.* ont rapporté que let-7 était un ARN de 21 nucléotides contrôlant la transition L4-adulte du développement larvaire. La perte de l'activité de let-7 entraînait un dérèglement des statuts adultes des cellules larvaires au cours du développement, tandis que l'augmentation de l'activité de let-7 entraînait l'expression précoce des statuts adultes (Reinhart *et al.*, 2000). Contrairement à lin-4, la séquence de let-7 est conservée à travers les espèces, de la mouche à l'homme. Chez l'homme, il a notamment été détecté à différents niveaux d'expression dans la majorité des tissus (Pasquinelli *et al.*, 2000). Cette découverte fut à l'origine d'une véritable révolution dans la recherche d'une nouvelle classe de petits ARN non-codants, appelés miARN. Actuellement, des milliers de miARN ont été identifiés chez l'homme et au sein d'autres espèces, et des dépôts de séquences de miARN en ligne, telle que la base de données miRbase, sont disponibles (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). De plus, les outils et logiciels actuels développés pour la prédiction des cibles des miARN facilitent les études du réseau fonctionnel des miARN (Xia, Cao and Shao, 2009).

Les microARN (miARN) sont donc de petits ARN non-codants (ARNnc), d'environ 20 nucléotides de longueur. Ces miARN présentent la capacité de réguler l'expression post-transcriptionnelle des gènes en se liant soit (i) aux régions 3' UTR (Untranslated Transcribed Region) ; (ii) aux séquences codantes ; (iii) aux régions 5' UTR des ARN messagers (ARNm) cibles. Cette liaison conduit ainsi à l'inhibition de la traduction ou à la dégradation des ARNm. Il est estimé qu'environ 30 % du génome humain codant pour les protéines est régulé par les miARN (Filipowicz, Bhattacharyya and Sonenberg, 2008). Le contrôle de l'expression des gènes par les miARN se manifeste par des actions au niveau de différents processus biologiques, comme l'apoptose, la prolifération ou la différenciation cellulaire (Ambros, 2004).

B. Biogénèse et mécanisme d'action

La biogénèse des miARN débute par la transcription génique de l'ARN polymérase II/III de manière post- ou co-transcriptionnelle (Romero-Cordoba *et al.*, 2014a). Environ la moitié des miARN actuellement identifiés sont intragéniques et proviennent principalement d'introns. L'autre moitié des miARN sont intergéniques ou transcrits indépendamment, et sont régulés par leurs propres promoteurs (Kim and Kim, 2007; de Rie *et al.*, 2017). La biogénèse des miARN est possible selon les voies canoniques et non canoniques.

C. miARN et dégénérescence discale

Aujourd'hui, la physiopathologie discale est de mieux en mieux comprise et correspond à des altérations structurale et fonctionnelle du tissu discal. Les processus menant à la DD sont également de mieux en mieux documentés, comme évoqué précédemment. Récemment, le rôle des miARN dans ces processus a pu être identifié, avec des impacts sur l'apoptose, la différenciation ou la prolifération des cellules, l'atteinte de la MEC en jouant sur les voies anaboliques et cataboliques. Il s'agit notamment des miR-155, miR-146, miR-34 qui permettent de jouer sur plusieurs voies métaboliques en même temps (Wang *et al.*, 2011a; Chen *et al.*, 2015; W. L. Zhang *et al.*, 2017a; R.-S. Yang *et al.*, 2019a). Leur rôle est ainsi bien identifié et de ce fait peuvent représenter de nouvelles cibles thérapeutiques, soit en les inhibant (down-regulation) ou en les stimulant (up-regulation).

D. miR-155 : un miARN pivot dans la DD et un agent thérapeutique potentiel

Le miR-155 représente typiquement un miARN aux rôles multifonctionnels. Son implication dans différents processus biologiques a été largement démontrée (Faraoni *et al.*, 2009). Il s'agit notamment des processus hématopoïétique, inflammatoire, immunitaire et apoptotique (Rottiers and Näär, 2012). La dérégulation du miR-155 a notamment été associée à différents types de cancer, de maladies cardiovasculaires et d'infections virales (Mashima, 2015). Le gène codant pour le miR-155 se situe à l'intérieur d'un exon d'un ARN non codant transcrit à partir du cluster d'intégration des cellules B (BIC) situé sur le chromosome 21 (Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Le BIC présente une forte homologie de séquence entre l'homme, la souris et le poulet et est fortement exprimé dans les organes lymphoïdes. Par conséquent, la séquence du miR-155 a été ultra-conservée au cours de l'évolution et présente peu de polymorphisme génétique entre les espèces. Le gène BIC est composé de 3 exons qui

couvrent une région de 13 kb dans le chromosome 21 humain (Hsa21). Cette région de 13 kb abrite un transcrit primary-miR-155 (pri-miR-155) non-codant de 1500 pb dans l'inter-exon 3. Celui-ci est transformé en miR-155 mature (Tam 2001 ; Kim *et al.* 2009). L'expression du miR-155 varie selon le type cellulaire et l'environnement tissulaire et est régulée de manière coordonnée par de multiples voies en réponse à des signaux cellulaires. Une fois que le pri-miR-155 endogène est transcrit, il subit une transformation séquentielle dans le noyau cellulaire en un précurseur de 65 nucléotides (nt) sous forme tige-boucle, le pré-miR-155. Celui-ci est ensuite transformé dans le cytoplasme en générant des duplex de 22 nt. Le duplex miR-155 contient 2 brins désignés par le suffixe-5p (du brin 5' du pré-miR, miR-155-5p) ou le suffixe-3p (du brin 3' du pré-miR, miR-155-3p) (Eltonet *et al.* 2013). Le miR-155-5p est la forme la plus abondante et dominante dans l'organisme (Chiang *et al.* 2010).

Dans le DIV, le miR-155 a été identifié comme impliqué dans différents processus : apoptose, dégradation de la MEC et inflammation (Wang *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2016; W. L. Zhang *et al.*, 2017; C. Yang *et al.*, 2019). Plus récemment, le miR-155 a été proposé comme marqueur circulant de la lombalgie discogénique (Srikanth N. Divi *et al.*, 2020). Dans ce contexte, l'ensemble des données ci-dessus conduit à envisager avec intérêt l'utilisation du miR-155 comme agent thérapeutique, basé sur son injection *in situ* au niveau discal afin d'envisager sa sur-expression. Le miR-155 représentera ainsi le miR de référence utilisé pour l'ensemble des expérimentations menées dans le cadre de cette thèse.

Quel que soit le miARN dont l'utilisation serait envisagée comme agent thérapeutique, certaines contraintes à leur utilisation doivent être cependant prises en compte. En effet, ces miARN souffrent d'une demi-vie très courte suite à leur dégradation rapide *in vivo* via les nucléases. De plus, l'efficacité des miARN thérapeutiques est conditionnée à sa capacité à pénétrer au sein des cellules cibles. Ainsi, l'utilisation, comme agent thérapeutique implique au préalable de développer des systèmes de vectorisation adaptés. Parmi les différents systèmes de vectorisation, les systèmes de vectorisation nanoparticulaires représentent une option séduisante.

2. Systèmes de vectorisation des miARN

A. Introduction

Dès que l'activité des miARN fut confirmée chez l'homme, leur application clinique a suscité une grande attention, en raison de leurs atouts certains pour lutter contre une variété de maladies (Mori *et al.*, 2019). Cependant, malgré cet engouement, leur efficacité est fortement limitée par une dégradation enzymatique rapide qui se traduit par un temps de circulation court une fois administré, et par une faible spécificité (Ahmadzada, Reid and McKenzie, 2018). Pour surmonter ces obstacles, le développement de systèmes nanoparticulaires chargés en miRNA a été proposé. Ces systèmes nanoparticulaires permettront ainsi de protéger la molécule active de l'environnement externe, limitant ainsi sa dégradation, et améliorant son temps de circulation tout en permettant leur accumulation au site d'intérêt à traiter. En outre, l'utilisation des miARN à des fins thérapeutiques présente des avantages distincts par rapport à la thérapie génique traditionnelle qui implique l'administration de molécules plus grandes, telles que les ARNm ou l'ADN. Tout d'abord, les miARN ont un éventail plus large de cibles thérapeutiques, puisqu'un seul miARN peut réguler simultanément une multitude d'ARNm (Mori *et al.*, 2019). De plus, les miARN sous forme d'inhibiteur de ARNm peuvent réguler à la fois l'expression et la répression de plusieurs gènes, alors que l'activité des ARNm est limitée à la répression ou à l'augmentation de la régulation d'un gène spécifique. La faible taille des miARN permet également d'envisager leur encapsulation au sein des systèmes nanoparticulaires et permettre sa délivrance au niveau intra-cellulaire et permettre leur action thérapeutique (Ahmadzada, Reid and McKenzie, 2018).

Les systèmes nanoparticulaires représentent ainsi de véritables plateformes d'administration polyvalentes pour l'administration d'un miARN. Il existe trois grandes catégories de systèmes nanoparticulaires de vectorisation de miARN : les nanoparticules virales, organiques et inorganiques (Lin and Tam, 2015). Les vecteurs viraux sont apparus comme des systèmes de délivrance attrayants pour l'administration de transgènes au sein de types cellulaires cibles particuliers (Patel and Misra, 2011). Brièvement, les gènes pathogènes sont retirés de la séquence de ces virus et remplacés par les gènes « thérapeutiques ». Il existe différents types de vecteurs viraux en fonction de la spécificité de la cassette du transgène, de l'objectif thérapeutique (chronique ou non) et du type cellulaire ciblé. Il existe principalement quatre

systèmes de vecteurs viraux différents qui peuvent faciliter l'expression de transgènes et de miARN : les adénovirus et les virus adéno-associés, les rétrovirus et la sous-classe des lentivirus. Bien que les vecteurs viraux puissent délivrer efficacement les transgènes, les problèmes de toxicité, tels que l'immunogénicité élevée et le risque élevé de mutation, limitent fortement leur utilisation en clinique (Patel and Misra, 2011).

La conception ingénieuse de vecteurs non-viraux semble donc être la stratégie idéale pour pouvoir administrer en clinique un miARN. Cette stratégie offre la protection enzymatique des acides nucléiques, prolongeant ainsi leur demi-vie, favorisant également l'échappement endosomal et la libération intracellulaire. Par rapport aux vecteurs viraux, les vecteurs non-viraux peuvent être facilement fonctionnalisés en surface, afin de pouvoir être spécifiques de la cellule ou du tissu cible (Z. Bai *et al.*, 2019).

Les différentes classes de vecteurs pour la délivrance des miARN ont été traitées dans la revue suivante intitulée « miRNA as a new therapeutic agent for intervertebral disc degeneration » qui sera soumise dans Advanced Drug Delivery Reviews. Dans les paragraphes suivants nous développerons plus particulièrement les nanoparticules lipidiques, et notamment les nanocapsules lipidiques, vecteur historique du laboratoire MINT.

B. Les nanoparticules lipidiques

1. Généralités

Comme présenté dans la revue, il existe de nombreux systèmes nanoparticulaires pouvant vectoriser les miARN, avec leurs avantages et inconvénients respectifs. Les nanoparticules lipidiques (NPL) ont fait l'objet d'études approfondies pour l'administration de médicaments à base d'acides nucléiques, qui se sont conclues par la mise sur le marché du Onpattro® (Patisiran) pour le traitement de l'amylose en 2018 (Akinc *et al.*, 2019). Cela a permis de valider l'utilisation des NPL pour l'administration systémique de siRNA. Plus récemment, les NPL ont démontré leur intérêt majeur dans la lutte contre la pandémie à la COVID-19. Ce point sera développé ultérieurement.

Les NPL sont donc utilisées dans différents domaines applicatifs comme l'oncologie, les infections virales ou bactériennes, ou encore dans le domaine de l'édition du génome (Cullis and Hope, 2017). Les systèmes d'administration d'acides nucléiques par les NPL se sont éloignés des systèmes nanoparticulaires d'origine, les liposomes, pour permettre une

meilleure efficacité d'encapsulation et surtout une meilleure stabilité de la suspension (Lewis *et al.*, 2002). En effet, les NPL utilisées aujourd'hui pour l'administration de matériel génétique sont très différents des liposomes classiques. L'une des principales différences réside dans le fait que les NPL ne présentent pas de bicouche lipidique entourant un noyau aqueux. Les premières études sur l'encapsulation de certains acides nucléiques par des liposomes remontent à la fin des années 1970 (Hoffman, Margolis and Bergelson, 1978; Mannino, Allebach and Strohl, 1979; Monnard, Oberholzer and Luisi, 1997). Ces systèmes souffraient néanmoins d'une mauvaise encapsulation, en partie due à l'utilisation de lipides neutres et de procédures d'encapsulation passives. Les lipoplexes, complexes résultant de l'interaction électrostatique entre la charge négative des acides nucléiques et la charge positive du lipide, ont été largement utilisés *in vitro* pour l'expérimentation préclinique, mais ont démontré des problèmes de toxicité, de libération prématurée de l'acide nucléique et donc une efficacité limitée *in vivo* (Bulbake *et al.*, 2017). Lorsque les lipoplexes sont administrés par voie intraveineuse, une élimination rapide et une activation du système immunitaire sont généralement observées (Son *et al.*, 2020).

Les lipides cationiques ont également été utilisés dans des formulations lipidiques, ce qui a permis une encapsulation plus efficace des acides nucléiques (Zhuang *et al.*, 2020). Ces lipides sont souvent combinés avec des lipides PEGylés, afin d'obtenir un vecteur furtif, et permettre une augmentation du temps de circulation dans le sang afin d'améliorer la pharmacocinétique et la biodistribution de la molécule active. Ces lipides PEGylés peuvent également augmenter la stabilité des formulations, grâce à leurs propriétés de tensioactifs (Bandara *et al.*, 2020). En pratique, les NPL peuvent être formulées par différents procédés, avec ou sans solvant, notamment par microfluidique (Leung *et al.*, 2015), ultra-sonication (Malik *et al.*, 2014), technique des fluides supercritiques (Konwarh *et al.*, 2012), homogénéisation à haute pression (Bevilacqua *et al.*, 2007), par ultrafiltration (Medina-González *et al.*, 2011), ou encore par floculation (Malik *et al.*, 2014).

Pour terminer, les NPL présentent une structure matricielle, dense en son cœur. De plus, en raison de la conformation du lipide ionisable et des complexes formés avec les acides nucléiques, la structure du noyau des NPL dépend du degré de saturation et de la charge du lipide utilisé. Ce noyau est entouré d'une monocouche de lipides structuraux (phospholipides

ou cholestérol) et de lipides PEGylés situés en surface qui confèrent la stabilité de la nanoparticule.

2. Compositions

a) Les lipides cationiques

Le premier lipide cationique a été synthétisé par le Pr Felgner et son équipe en 1987. Il s'agissait du DOTMA (chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium). Le terme de « lipofection » a alors été introduit pour désigner la transfection en utilisant des lipides cationiques (Malone, Felgner and Verma, 1989). À cette même période, le Pr. Behr et son équipe mirent au point une lipopolyamine, appelée DOGS (dioctadécylamine-glycine-spermine (Boussif *et al.*, 1995). Depuis, de nombreux lipides cationiques ont été synthétisés, dont certains sont commercialisés pour des applications en biologie moléculaire. Les lipides cationiques ont généralement une même organisation structurale (Sean C. Semple *et al.*, 2010). Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile, d'un bras espaceur et d'un domaine hydrophobe. Ces domaines ont chacun un rôle particulier de par leurs propriétés physicochimiques. Schématiquement, la tête polaire hydrophile permet l'interaction électrostatique avec l'acide nucléique en question (Lin *et al.*, 2013). La taille et la nature du bras espaceur pourront avoir une influence sur la stabilité et la biodégradabilité du vecteur permettant aussi le ciblage ou l'amélioration de l'affinité avec la cible thérapeutique. Par exemple dans l'étude de Eun Ju Jeong en 2015, l'ajout d'un bras espaceur a permis une meilleure efficacité de transfection des siARN *in vitro* et *in vivo*, comparée à la formulation sans bras espaceur (Jeong *et al.*, 2015). Enfin, le domaine hydrophobe permettra l'assemblage supramoléculaire et l'interaction avec les membranes biologiques. La modification de l'un de ces domaines impactera leur efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* (Lin and Tam, 2015). Ces lipides cationiques, en plus de complexer le matériel génétique d'intérêt, seront responsables de l'échappement endosomal, nécessaire pour obtenir un matériel génétique intact dans le cytosol (Heyes *et al.*, 2005).

b) Les lipides PEGylés

Les lipides PEGylés sont un composant important des NPL qui jouent plusieurs rôles. Leur structure consiste en deux domaines : un polymère PEG hydrophile conjugué à un ancrage lipidique hydrophobe. Historiquement, ils étaient utilisés dans les systèmes liposomaux pour

prolonger le temps de circulation dans la circulation sanguine. Ainsi, le PEG agit comme un bouclier stérique, empêchant l'opsonisation, limitant l'élimination prématurée par le système réticulo-endothélial. Un temps de circulation prolongé dans le sang signifie que les NPL seront susceptibles de s'accumuler dans les sites pathologiques d'intérêt telles que les tumeurs solides, en raison de l'effet EPR, « Enhanced Permeability and Retention effect » (Bao *et al.*, 2013). Dans les NPL actuelles, les lipides PEGylés ont été conçus pour générer des formulations de taille maîtrisée. Le bouclier stérique des lipides PEGylés empêche la fusion entre-elles des nanoparticules lors de la formulation et permet ainsi d'obtenir une population de particules homogènes avec une faible polydispersité et un diamètre allant souvent de 50 à 100 nm, selon la quantité de lipides PEGylés utilisés (Mui *et al.*, 2013). De plus dans notre cas, les lipides PEGylés permettent l'inversion de phase eau dans huile/huile dans eau grâce au changement de propriétés de ces lipides lors d'une augmentation de température. Il est à noter que la PEGylation présente néanmoins un inconvénient. Elle réduit l'internalisation cellulaire et peut même conduire à une réponse immunitaire après des injections répétées. Ce phénomène est appelé le PEG dilemma.

A noter que dans le cadre d'une application discal, où les NPL sont injectées *in situ* et non de façon systémique, les propriétés conférées par les lipides PEGylés à limiter l'opsonisation sont peu recherchées. Les lipides PEGylés sont dans ce cas essentiellement utilisés afin d'obtenir des formulations stables et de taille maîtrisée.

c) Phospholipides et cholestérol

Les autres excipients qui entrent dans la composition des NPL sont, en règle générale, les phospholipides et le cholestérol dans le but d'augmenter la stabilité de la suspension dans le temps, contrôler précisément la taille des nanoparticules lors de la formulation et apporter une certaine rigidité à la NPL. Le cholestérol de par sa géométrie moléculaire peut également avoir un rôle sur l'efficacité biologique et la biodistribution des nanoparticules lipidiques. Par exemple, les analogues du cholestérol avec les C-24 alkyl phytostérols augmentent l'efficacité de d'internalisation cellulaire *in vivo* des formulations nanoparticules lipidiques-ARNm. La longueur des chaînes hydrophobes des analogues du cholestérol, la flexibilité des cycles stérols et la polarité des groupes alcools ont aussi un impact sur l'efficacité de la diffusion. Les

phospholipides comme le DOPE augmentent également la fusogénicité des nanoparticules (Kulkarni *et al.*, 2018).

3. Une preuve de concept récente : application au vaccin contre la COVID-19

Dans le contexte pandémique actuel lié au SRAS-Cov-2, les décisions sanitaires se sont naturellement orientées sur une stratégie vaccinale reposant sur des recherches et études déjà en cours depuis des années, des formulations de nanoparticules lipidiques pour l'administration d'un ARN messager (ARNm), permettant le développement et la mise sur le marché rapide de vaccins constitués de NPL chargés en ARNm contre la COVID-19. Par exemple, la formulation du mRNA-1273 a été produite par la société Moderna dans le mois qui a suivi la découverte de la séquence génomique du SRAS-CoV-2 (Gebre *et al.*, 2021). Après la disponibilité de la séquence, les phases I, II et III des essais cliniques ont pu être lancées après environ 2, 5 et 6 mois respectivement (Kim *et al.*, 2021). Enfin, la formulation des NPL chargées en mRNA-1273 a obtenu l'autorisation d'utilisation d'urgence de la FDA et l'autorisation conditionnelle de mise sur le marché de l'EMA en l'espace seulement d'un an (Gebre *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021).

L'autre formulation vaccinale obtenue à partir de LNC fut développé par la société Pfizer-BioNtech, chargée en ARN BNT162b2.

Ces deux formulations contiennent un lipide cationique fonctionnel, incorporé dans les NPL, permettant la libération endosomale de l'ARNm. Pendant la fabrication de ce vaccin, l'introduction d'une solution aqueuse d'ARNm dans un mélange lipidique contenant le lipide cationique conduit à une interaction électrostatique entre le squelette de l'ARNm chargé négativement et le lipide cationique chargé positivement. Dans la formulation de la société Pfizer-BioNtech ce lipide est l'ALC-031 tandis que dans la formulation de la société Moderna, c'est le lipide SM-102 qui est utilisé. Un lipide PEGylé est également utilisé dans la formulation afin de former une couche hydrophile protectrice, augmentant la stabilité de la suspension et réduisant son élimination prématurée par le système réticulo-endothélial. Plus précisément, dans la formulation de la société Pfizer-BioNtech, l'ALC-0159 est utilisé alors que dans la formulation de la société Moderna c'est le PEG₂₀₀₀ DMG qui est employé. Ensuite les deux formulations contiennent :

- Du cholestérol pour augmenter (i) la rigidité de la NPL et (ii) la stabilité de la suspension ;
- Du Distearoylphosphatidylcholine (DSPC) qui est un composant des membranes cellulaires et permet une meilleure internalisation ;
- Des excipients permettant l'injection et la conservation de ces formulations.

Désormais, cette validation clinique évidente de l'intérêt thérapeutique de l'ARNm ouvre la porte à un nombre d'études cliniques foisonnant, illustrée par de nombreuses formulations de NPL chargées en ARNm pour le traitement de diverses maladies comme les maladies infectieuses, le cancer ou des maladies génétiques (Sahin, Karikó and Türeci, 2014; Pardi *et al.*, 2018; Uchida *et al.*, 2020).

Dans notre maladie cible, la lombalgie discogénique, le vecteur utilisé pour administrer un miARN fut les nanocapsules lipidiques, très similaires aux vecteurs décrits précédemment et brevetées depuis plus de 20 ans par le laboratoire MINT.

4. Les Nanocapsules lipidiques

a) Découverte et formulation

Les nanocapsules lipidiques (LNC) sont des nanomédicaments étudiés et brevetés par le laboratoire MINT depuis 2002 (Heurtault B., 2002). Les LNC sont constituées d'un cœur de triglycérides à chaînes moyennes (Labrafac®), autour duquel s'organise un surfactant hydrophile majoritaire à base d'hydroxystéarate de polyéthylène glycol (HS-PEG) (Kolliphor® HS15) responsable de l'inversion de phase, et un surfactant lipophile composé principalement de phosphatidylcholine (lécithine, Lipoid®) qui apporte la rigidité de la coque. Le diamètre de ces objets varie de 20 à 100 nm en fonction des proportions en excipients (Heurtault *et al.*, 2003). Les LNC sont formulées par un procédé d'inversion de phase. Ce procédé repose sur le changement des propriétés physico-chimiques de l'hydroxystéarate de PEG en fonction de la température (Heurtault *et al.* 2002). En effet, à température ambiante, cette molécule présente un caractère plutôt hydrophile, résultant en une émulsion huile dans eau (H/E ou o/w). Après augmentation de la température, le tensioactif se déshydrate et devient moins hydrophile. Les liaisons hydrogènes entre ce tensioactif et l'eau se délitent et une émulsion eau dans l'huile (E/H ou w/o) se forme, *via* le passage par une microémulsion. La microémulsion en question se caractérise par un réseau bicontinu de micelles cylindriques, thermodynamiquement stable et macroscopiquement transparente. A la température

caractéristique de la zone d'inversion de phase (ZIP), de l'eau est ajoutée afin de rompre le réseau tubulaire et former des LNC de taille homogène, stables dans le temps. Ce procédé de formulation est simple, peu consommateur en énergie et n'utilise pas de solvant organique (**Figure 11**). Les LNC offrent la possibilité de fonctionnaliser leur surface, afin d'adapter le comportement pharmacologique en fonction de la cible thérapeutique (Perrier *et al.*, 2010). Un ciblage actif par l'intermédiaire de ligands spécifiques reconnaissant des antigènes ou des protéines de surfaces peut être ainsi réalisés. La décoration en surface peut se faire de façon covalente ou par adsorption physico-chimique (Béduneau *et al.*, 2007). Ces différents avantages font des LNC un véritable outil versatile pouvant être utilisé dans de nombreux domaines (Morille *et al.*, 2009).

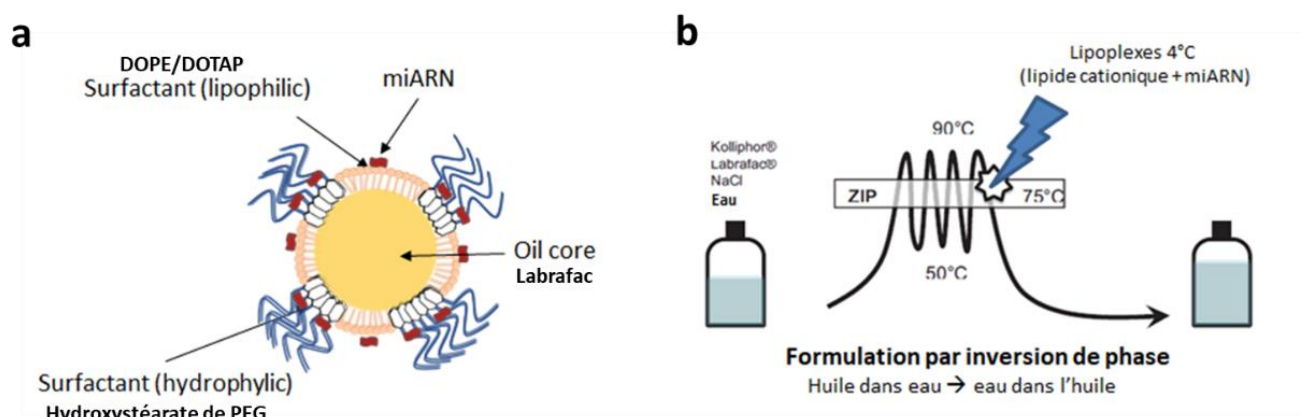


Figure 11 : Représentation schématique de la formulation de nanocapsules lipidiques (LNC).

(a) représentation schématique des différents composants d'une LNC (b) Représentation schématique de la formulation de LNC par inversion de phase.

b) Utilisation des LNC

Depuis leur création, l'encapsulation de nombreux principes actifs a été réalisée au sein des LNC. L'encapsulation d'anticancéreux hydrophobes tels que le paclitaxel ou les ferrocifènes a notamment été étudiée (Nguyen *et al.*, 2008). Ces anticancéreux lipophiles s'intègrent dans le cœur huileux des LNC avec une efficacité d'encapsulation importante. De plus, les LNC ont démontré pouvoir encapsuler différents acides nucléiques, tels qu'un plasmide ou un siARN (Morille *et al.*, 2009). Pour permettre l'encapsulation de ces molécules hydrophiles, la formulation des LNC a dû être optimisée. La lécithine initialement présente dans la LNC est supprimée et des lipoplexes sont ajoutés à l'eau de trempe lors du procédé d'inversion de

phase. Les travaux réalisés ont montré une accumulation tumorale des LNC chargées en plasmide dans un modèle murin de gliome en sous-cutané, et le succès de l'internalisation cellulaire de ces nanoparticules *in vivo* (Morille *et al.*, 2009). Plus récemment, des travaux ont permis de montrer la possibilité d'encapsuler des siARN avec des résultats prometteurs *in vivo* (Resnier *et al.*, 2017b). Les siARN sont, de par leur structure, très proches des miARN, et nous permettent de pouvoir envisager la formulation de LNC chargées en miARN *via* le même procédé de formulation.

d) Fonctionnalisation de surface

La fonctionnalisation de surface pour le ciblage actif de médicaments et/ou d'agents de contraste est une composante importante dans le développement des nouvelles stratégies nanoparticulaires. Pour ce faire, les nanoparticules peuvent être décorées en surface pour permettre de cibler spécifiquement une cible moléculaire surexprimée par les cellules ou le tissu d'intérêt. Deux stratégies s'offrent à l'expérimentateur : la modification des excipients avant formulation ou la décoration après formulation des nanoparticules. Dans cette dernière stratégie, le greffage covalent ou l'adsorption physico-chimique simple sont deux choix potentiels, ayant leurs propres avantages et inconvénients.

Le choix varié de molécules disponibles pour décorer la surface des NPs permet d'adapter la fonctionnalisation. Il s'agit notamment de protéines de petite taille, de peptides, d'anticorps, d'aptamères, de sondes fluorescentes ou encore d'oligosaccharides (Yoo *et al.*, 2019). En plus d'apporter une spécificité au vecteur, la modification biochimique en surface des nanoparticules avec un ligand peut être nécessaire pour réduire la toxicité (comme cela est largement réalisé pour les nanoparticules d'argent) et pour augmenter leur stabilité dans les fluides biologiques (Guerrini, Alvarez-Puebla and Pazos-Perez, 2018; Borowik *et al.*, 2019). Par exemple, la fonctionnalisation de surface par l'albumine humaine permet la réduction de la toxicité de la suspension et son ciblage actif (D. Li *et al.*, 2018).

Les LNC ont déjà été fonctionnalisés en surface pour permettre un meilleur ciblage d'un type cellulaire ou d'un tissu précis. Récemment, des résultats ont permis de démontrer que l'adsorption du peptide NFL en surface des LNC permettait une meilleure internalisation des LNC dans des cellules humaines de glioblastome (Karim *et al.*, 2018).

Dans la perspective d'un traitement basé sur l'utilisation de LNC dans le DIV, la fonctionnalisation de ces LNC a été envisagée afin de cibler spécifiquement les cellules du NP. Au regard de la littérature, différents peptides ont été envisagés, parmi lequel le peptide short Link-N. Le peptide Link-N (DHLSDNYTLHDHRAIH) est un peptide qui est présent naturellement dans les DIV et le cartilage, obtenu après clivage protéolytique de la protéine Link. Plusieurs études ont identifié ce peptide comme présentant des propriétés anaboliques au sein de la MEC du DIV. Un peptide plus court, issu d'un clivage enzymatique du Link-N, a été également identifié. Ce peptide, constitué de 8 acides aminés (mettre la séquence) porte le nom de short Link-N (sLink-N). Son injection au sein d'un modèle *ex-vivo* de DIV a permis de montrer une augmentation des quantités de protéoglycanes, de collagène de type II (AlGarni *et al.*, 2016). Les résultats montrent que ce sLink-N agit via des interactions avec les cellules du NP qui présentent à leur surface le récepteur BMPRII (**Figure 12**) induisant une cascade métabolique provoquant l'augmentation de la synthèse de collagène de type II et d'agrécan. Dans ce contexte, l'utilisation de ce peptide a été envisagée afin de combiner un effet anabolique à une amélioration de l'internalisation au sein des cellules du NP (Noorwali *et al.*, 2018). L'ensemble des expérimentations menées dans la dernière partie de ce manuscrit sera basé sur la fonctionnalisation des LNC par le sLink-N.

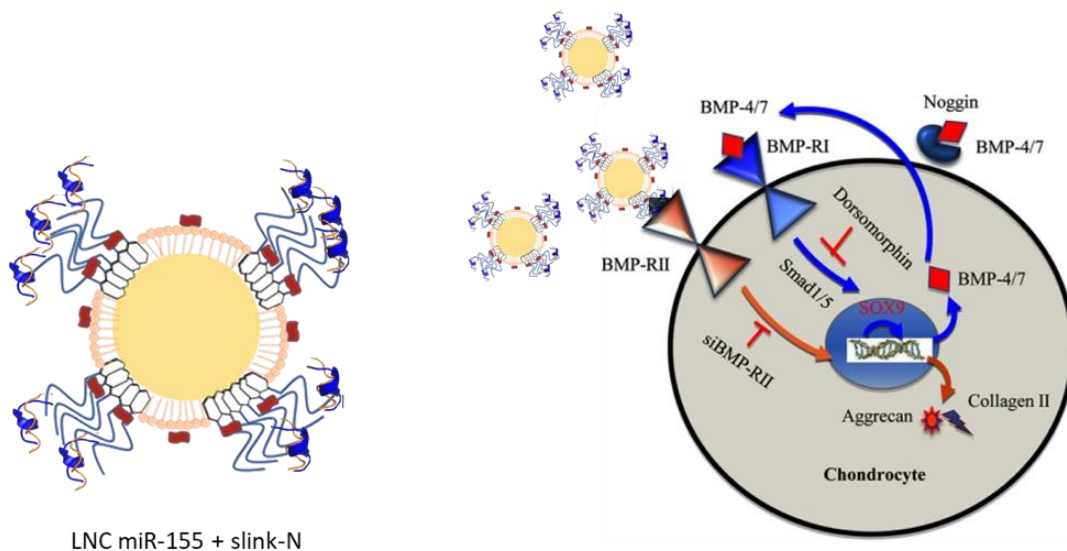


Figure 12 : Représentation schématique de la fixation du peptide sLink-N lié aux LNC et à son récepteur cellulaire.

Le peptide sLink-N initie une cascade de signalisation par association directe avec son récepteur BMPRII. Cette association déclenche la signalisation Smad qui initie la transcription des gènes BMP, entraînant l'expression et la production de protéines BMP, notamment BMP-4 et BMP-7. Par le biais d'une boucle cellulaire autonome, la BMP-4 et la BMP-7 se fixent au récepteur BMPRI pour soutenir ou amplifier la transduction du signal Smad,

favorisant l'expression de SOX9 et des gènes de production d'agrécan et de collagène de type II, qui sont les composants majoritaires de la MEC du NP (modifié à partir de Wang Z et al. 2013).

3. miRNA as a new therapeutic agent for intervertebral disc degeneration

Les connaissances actuelles au sujet des miARN sont nombreuses, mais ce n'est que très récemment que les chercheurs se sont intéressés aux miARN dans le processus de la DD. Ces miARN permettent de cibler les processus impliqués dans la dégénérescence discale et pourrait ainsi être des agents thérapeutiques efficaces. L'état de l'art sur les miARN dans le DIV, ainsi que les limites et les solutions pour développer une stratégie thérapeutique adaptée à la nature des miARN ont fait l'objet de la revue scientifique ci-dessous. Cette revue sera soumise prochainement dans *Advanced Drug Delivery Reviews*.

miRNA as a new therapeutic agent for intervertebral disc degeneration

Brian Le Moal¹, Valérie Geoffroy^{1,2}, Catherine Passirani³, Angélique Galvani^{1,2}, Catherine Levisage^{1,2}, Jérôme Guicheux^{1,2,5}, Élise Lepeltier^{3*}, Johann Clouet^{1,4,6*}

1 Inserm, UMRS1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton, Université de Nantes, ONIRIS, Nantes, F-44042, France;

2 Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France;

3 MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Angers, France;

4 Université de Nantes, UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Nantes, F-44035, France;

5 CHU Nantes, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France ;

6 CHU Nantes, Pharmacie Centrale, PHU 11, Nantes, F-44093, France.

** Co-last author*

Corresponding author:

Pr Jerome Guicheux, jerome.guicheux@univ-nantes.fr
Inserm, UMRS 1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton
1 Place Alexis Ricordeau, 44042, Nantes Cedex, France
Phone: +33240412916, Fax: +33240083712

Abstract

The low back pain is a common global burden widespread in the world and approximately 40 % are due to intervertebral disc degeneration (IDD). At this time, there is no etiopathogenic treatment. However, the knowledge about physiopathology of IDD increased since few years. MicroRNAs (miRNA) are a class of small noncoding RNA molecules that negatively regulate gene expression at the post-transcriptional levels. miRNA not only regulate various normal physiological processes, but also play an important role in several disorders, including degenerative disc disease. A variety of miRNA are differentially expressed in degenerative human intervertebral disc (IVD) tissues and cells. However, miRNA are vulnerable to endogenic nucleases. It is thus essential to protect them for an *in vivo* administration. Therefore, efforts on nanoparticle approaches are intense and recent progresses to encapsulate genetic material leads to the first FDA approval of RNAi therapeutic strategy using liposomes. The aim of this review will be to present exhaustively the different miRNA involved in IDD and their potential therapeutic interests, with the perspective to use a nanoparticulate approach in order to consider a potential future treatment.

Introduction

The intervertebral disc (IVD) is a fibrocartilagenous tissue located between each of the 25 vertebrae of the spine, subdivided into 7 cervical, 12 thoracic, 5 lumbar vertebrae and 1 sacral [1]. It is made up of three principal components: cartilaginous endplates (CEPs), nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus (AF). The inner part of IVD is NP, surrounded by the AF and CEPs, allowing them to attach the vertebrae [2]. The composition of IVD allow a good flexibility and facilitate the movement of the spine [3]. The IVD is the largest avascular structure in the body, capillary supplying the AF through the CEPs and deliver the nutrient for the IVD: the integrity of this system was demonstrated as an efficient part against IDD [4]. Additionally, the IVD is largely aneural, with nerve endings only reaching the periphery of the AF [5]. Due to all the physical constraints support by the column, the intervertebral disc (IVD) degenerate along life. However, there are no etiopathogenic treatments: there are only analgesics or surgical treatments. Nevertheless, the recent knowledge of physiopathology allowed the development of new methods for IVD regenerative medicine. The decreasing of cell number is one of the main causes of the IDD, that's why cell therapy was investigating with attention. However, due to obvious ethical

problems, the clinical pursuit of this strategy is difficult. More recently, the role of genes like interfering RNA (RNAi) and especially microRNA (miRNA) in IDD was highlighted [6]. miRNA are small non-coding RNA (20 to 25 nucleotides), encoded by their own genes. miRNA are intronic, exonic or intergenic, have particular and specific biogenesis and they specifically target a metabolic pathway, especially by modifying the protein synthesis [7]. The miRNA is only present at 1 % to 3 % in whole genome, but they are able to regulate approximately 30 % of the proteome in human [8]. Indeed the impact of miRNA in a number of diseases is well established: in IDD, they are identified to impact different metabolism pathways, including cell proliferation, lineage determination, apoptosis, cytokine release, as well as ECM anabolism and catabolism [9]. Despite the huge progress in miRNA basic science, many challenges are still ahead, particularly their protection and vectorization for an in vivo administration and to permit their delivery into the cells of interest. Indeed, the direct injection of miRNAs and antagomiRNAs could be a simple method but the effect would typically be shortened due to the endonucleases [10]. Consequently, the improvement of delivery systems will be needed for the future clinical application of miRNAs. Nanoparticular platforms could be particularly adapted for miRNA vectorization, allowing for their transfer and release in the cell cytoplasm [11]. Nanoparticles are usually divided in 3 different groups, regarding their origin and excipients used: virus particles, inorganic and organic nanoparticles.

In the current review, miRNA biogenesis pathways were described, summarizing the expression patterns of miRNAs in degenerative human IVD tissues, and the emerging pathogenic implications and therapeutic potential in disc degeneration have been developed. The nanoparticular approach will be then explored as perspectives, with advantages and limits, for a potential future administration strategy in the IVD context [12].

miRNA, a drug of tomorrow

I- miRNA biogenesis

miRNA were firstly described in 1993, by the identification of short RNA called lin-4 in nematode *Caenorhabditis elegans* [13]. Many miRNA have been then discovered, especially with the help of bioinformatics and computational technologies. Following the miRbase data center, 1914 miRNA in human and 38589 miRNA in all species have been identified [14]. miRNA is a short non-coded RNA of 20 to 25 nucleotides in length. Its production is a multistep process and is divided in two main categories: canonical and non-canonical pathways Figure 1. The majority of miRNA is transcribed in the nucleus by RNA polymerase II (RNA pol II) (canonical pathway). RNA pol II transcribes a primary-miRNA of around hundred nucleotides, in stem loop structure [15]. After the transcription, the stem-loop structure of pri-miRNA is cleaved by ribonuclease complex (Drosha) and its cofactor DiGeorge syndrome critical gene 8 (DGCR8) [16]. The cleaved form, called precursor-miRNA (pre-miRNA) containing 65 to 78 nucleotides, is a single double strand hairpin RNA. After the cleaving of Drosha and DGCR8, pre-miRNA are exported to the cytoplasm by exportin 5, a dsRNA-binding protein mediating the nuclear export. In the cytoplasm, the dsRNA endonuclease, Dicer and its catalytic partner « Transactivating response RNA-binding protein » (TRBP) remove the stem-loop end of the pre-miRNA [17]. The miRNA duplex of 20 to 22 nucleotides consists in one mature miRNA guide strand and a complementary passenger miRNA strand. The miRNA duplex is then separated by helicases and the complementary miRNA strand is degraded. The mature miRNA guided strand is integrated into the RNA-induced silencing complex (RISC) through the interaction with Argonaute proteins [18]. In the protein complex RISC, the guide strand miRNA recognizes and binds through complementary sequences to the 3'-UTR of their messengerRNA (mRNA) targets, resulting in mRNA destabilization, partial mRNA degradation or prevention of protein translation. Thus, the overall effect of a miRNA displays a significant reduction of target gene-encoded protein content. The majority of miRNA are synthesized by the canonical pathway but some are synthesized by the non-canonical pathway. This last

synthesis, involved the spliceosome, allowing the splicing and debranching into a pre-miRNA. Afterwards, the pre-miRNA take the same machinery as the canonical pathway [15].

II- Physiological challenges to overcome

After an intravenous injection, miRNA, (unmodified or modified) are eliminated in the 30 min following injection, due notably to a poor bioavailability, a nuclease degradation and the renal excretion: Figure

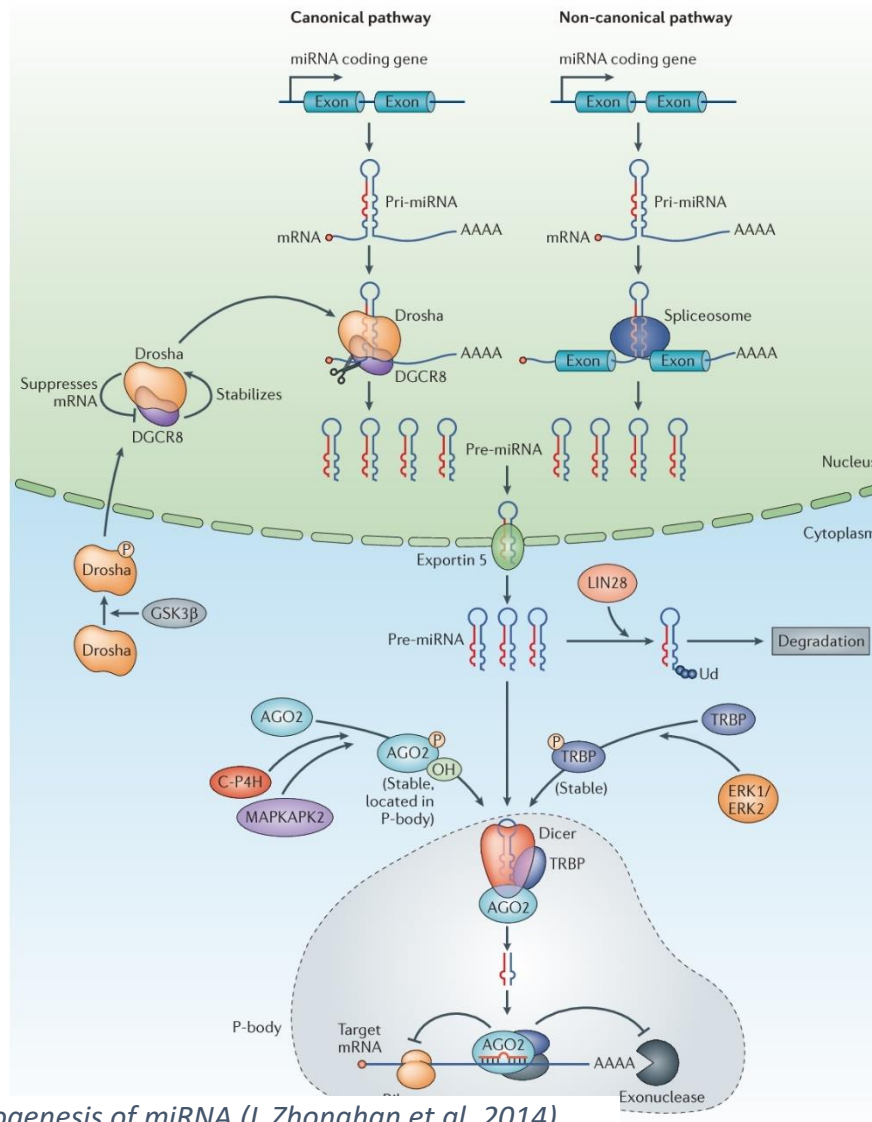


Figure 1: Biogenesis of miRNA (L.Zhonghan et al.,2014).

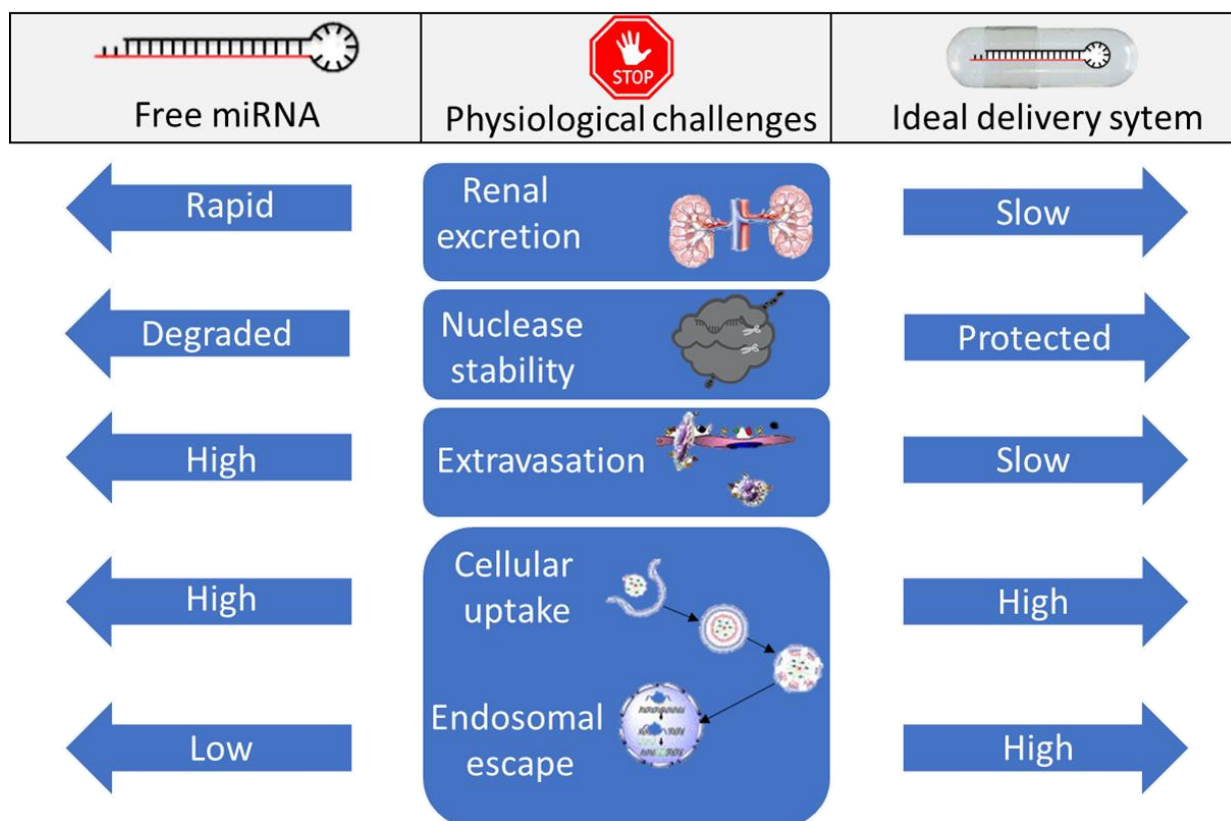


Figure 2: Physiological challenges to overcome for a free miRNA compared to embedded miRNA in an ideal delivery system.

a) Renal excretion

The renal excretion acts as a filtration and possesses a cut off for glomerular object around 30 to 50 kDa. miRNA is thus fastly and extensively excreted, due to its low molecular weight, approximately 14 kDa [19]. Naked miRNAs are degraded within seconds by the abundant nucleases such as serum RNase A-type nucleases in the blood [20]. In addition, naked miRNAs are cleared rapidly via renal excretion, leading to a short half-life in systemic circulation [21].

b) Nuclease stability

Nuclease degradation is a primary means of miRNA removal from the blood after systemic administration. Unmodified RNA oligonucleotides are unsuitable for therapeutic applications because they are sensitive to serum nucleases and possess a quickly turned over ($T_{1/2} = 4\text{--}14\text{ h}$) in vivo [22,23].

Several chemical modifications were studied to increase the stability of a RNA molecule, including: modification of 5'-Br-Ura and 5'-I-Ura bases, modification of the phosphate group with boronated or thiolated groups and chemical changes like 2'-F, 2'-O-Me, 2'-NH₂ on the C2' RNA carbon and locked nucleic acids. However, these different approaches remain constraining, costly and difficult to be scaled-up [24,25].

c) Cellular uptake

The cell membrane is another biological barrier to be overcome: the hydrophilicity of miRNA leading to a poor cell membrane diffusion, highlighting again the need of an efficient drug delivery system. Cellular membrane is composed mainly by a phospholipid bilayer negatively charged due to its composition in salicylic acid. miRNA is a negatively charged and hydrophilic nucleic acid: miRNA cannot thus cross the cell membrane due to its charge and its hydrophilic state [26]. In natural cell mechanisms, the main miRNA regulation is performed by exosomes and microvesicles which

encapsulated miRNA inside phospholipid bilayer incoming from cell membrane. To deliver miRNA inside the cells, the need of nanoparticles is then crucial to cross phospholipid cell membrane bilayer [27].

d) Endosomal escape

The next challenge to brave is the endosomal escape: the endosome and lysosome are acidic and contain enzymes, leading to miRNA degradation [28],[29]. Polyethylenimine (PEI) has been shown to act as a proton sponge to improve endosomal escape of DNA polyplexes [30] and although toxicity may prevent the use of PEI in humans, it is a useful experimental tool to induce in vitro and in vivo silencing [17]. Recently, polyamines like spermine or TPA were investigated and showed good properties for endosomal escape [31]. However, more studies need to be performed for overcoming endosomal escape, for specific therapeutic strategies based on miRNA.

Nanoparticles as a miRNA delivery system

Since the first publication on RNA interference in 1998 [32], several RNAi-based therapeutic approaches have been proposed for promising clinical applications. The miRNA administration and transfection are however challenging [26]. Nanotechnologies could offer versatile targeted delivery platforms for RNAi administration. To overcome the cell barrier and protect the miRNA, the need of delivery systems is obvious. There are three classes of miRNA vectors: viral, natural or synthetic nanoparticle (Figure 3).

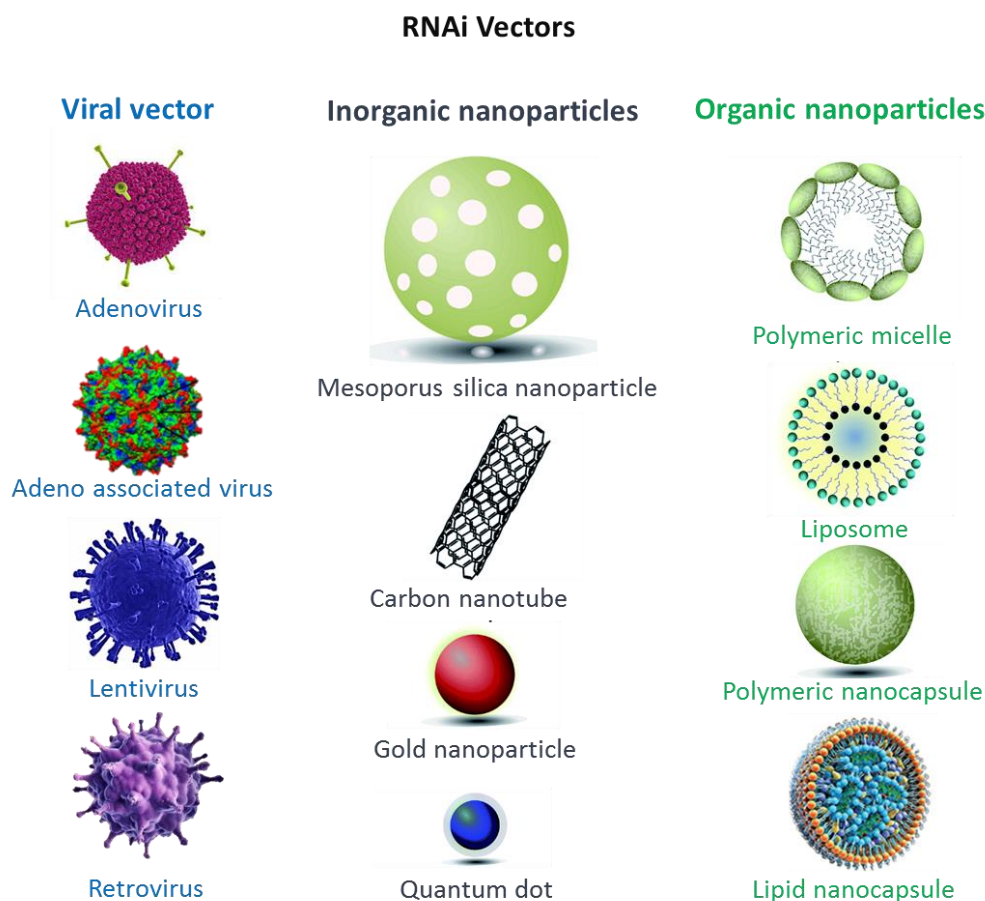


Figure 3: Different class of vectors for miRNA delivery.

a) Viral vectors

Viral vectors have emerged as attractive vehicles for the delivery of transgenes to particular target cell types. In the simplest version, the pathogenic genes are removed from these viruses and replaced by the therapeutic genes. One vector may be more suitable than other systems, depending on the specificity of the transgene cassette, the therapeutic purpose (acute or chronic), and the targeted cell type. There are mainly four different viral vector systems that can facilitate a high level transgene and miRNA expression: adenovirus and adeno-associated virus, retrovirus, and the subclass lentivirus [33].

I- Retroviruses

Retroviruses are characterized by enveloped virion particles and single stranded RNA of around 10 kb. A retroviral vector is usually composed of a simple genome encoding the Gag, Pol, and Env proteins flanked by long terminal repeats [34]. The RNA genome is copied upon cell entry by the virus-encoded reverse transcriptase enzyme into double stranded DNA and integrated randomly in the genome. This integration property is favorable for the durable expression of inserted transgenes; however, the random integration possibly causes major mutation. To avoid this risk, all protein-encoding sequences can be replaced by foreign sequences, to target specific region of the genome [35]. For example, miR-138 was induced about more than 1,000-fold in mouse embryonic fibroblasts in order to enhance the production of pluripotent stem cells [36].

Retrovirus are less and less used due to the potential immunogenicity risk and its inefficient *in vivo* transduction, due to all attenuation risk factors [37].

II- Adenovirus

Members of the *adenoviridae* family are non-enveloped viruses including a linear dsDNA genome with constant terminal repeat sequences of 37 kb. Adenoviruses are responsible for the major upper respiratory infections in children. Their cell internalization occurs by the interaction between the ubiquitously expressed CAR receptor and the integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ [38]. Adenoviral vectors are widely used due to the ease of the manipulation. Therefore, adenovirus have the ability to transduce and deliver a cargo of interest in various cell types. There are two serotypes generally used for gene delivery, serotypes 2 and 5 which are the most efficient [39]. The first generation of adenovectors provides a maximum of 8 kb insert length, without the E1 gene region. The second-generation of adenovectors were designed without the protein E2, E3, and E4 to reduce the immunogenicity. The adenovectors are generally used for a short-term gene therapy because recombinant adenoviral vectors are replication deficient and do not integrate into the host genome [40]. One of the major drawbacks is the immune response induced, leading to a quick elimination of the vector.

Adenoviral vectors can indeed be used for *in vitro* and *in vivo* delivery of miRNA expression cassettes. For example, adenovirus-mediated miR-21 gene therapy effectively reduced neointimal formation in vein grafts, after *in vitro* investigation [41].

III- Adeno-associated Virus

Adeno-associated virus (AAV) is a non-enveloped virus with icosahedral capsids and a single-stranded DNA (ssDNA) genome of 4.7 kb flanked by inverted terminal repeats that are required for replication of the genome, its packaging, and integration. AAV vectors can transduce both dividing and nondividing cells. AAV virus integrate the genome in episomal forms, and sometimes the virus remains latent by integrating its DNA into the AAVS1 region of chromosomes [42].

The 11 known AAV serotypes exhibit distinct host cell tropisms as well as varying immunological properties. Some serotypes are specific to their target and can be used as active targeting nanomedicines. Different types of capsids were used to counteract the *in vivo* antibodies detection, leading to improve the *in vivo* transduction efficiency [43].

The absence of AAV pathogenicity in humans makes them an attractive therapeutic vehicle. In contrast to other viral vectors, AAV is the only vector system for which the wild-type virus is not associated with

human malignancies. AAV has a relatively small packaging capacity, sufficient for miRNA encapsulation. Accordingly, many *in vivo* studies were performed with AAV-RNAi vectors against cancers, muscular dystrophies, neurodegenerative disorders, and cardiac, retinal, metabolic, and infectious diseases: a proof of efficacy and safety was demonstrated [44]. For example, a single systemic administration of AAV9-miR-298 resulted in a sustained expression of the miRNA, an efficient transduction of muscle and motor neurons, a down-regulation of androgen receptor expression, and an improvement of the disease phenotype in spinal and bulbar muscular atrophy mice [45].

IV- Lentiviruses

Lentiviruses (LV) is one of the subgroup of the Retroviridae family including the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) [46]. HIV-1 encodes the standard retrovirus proteins Gag, Pol, and Env, but has others proteins, Tat and Rev proteins and the accessory Vif, Vpr, Vpu, Nef proteins. Tat is the viral trans-activate protein that induces HIV-1 transcription from the LTR promoter. The Rev protein is responsible for exporting of singly spliced and unspliced HIV-1 transcripts from the nucleus. Regulatory sequence is kept in the HIV-based lentiviral vector and there is no more protein specific to virion formation [47].

A main benefit of lentivirus compared to retrovirus vectors is that they are able to transduce dividing and nondividing cells. Lentivirus vectors allow persistent transgene expression by stably integration into the host DNA, although a transcriptional silencing may occur over time. Lentivirus vectors have a better safety profile than retrovirus vectors because they favor integration within active transcriptional units, thereby reducing the risk of insertional oncogenesis. In addition, safer SIN-based LV variants were designed and successfully tested [48].

Several studies tested different LV-miRNA combinations [49], for example, LV-delivered anti-osteopontin miRNAs could inhibit cell proliferation and tumor growth in hepatocellular carcinoma [50].

V- Synthetic vectors

a) Organic

Organic nanoparticles are composed of organic excipients, which can either be from a natural or a synthetic source. Organic nanoparticles are typically prepared from polymers (synthetic, either be degradable or non-degradable, to natural materials such as proteins) or surfactant molecules that can self-assemble into nanosystems. There are various structures of organic nanoparticles possibly obtained such as liposomes, lipid nanocapsules, micelles or polymer nanoparticles. The nanoparticles are often surface functionalized to act as efficient active targeting drug carriers [51].

Due to their relative simplicity and safety, lipid-based nanoparticles (LNPs) have been widely used in systemic delivery of siRNA and miRNA as nanocarriers [52][53]. LNPs are able to protect nucleic acids from enzymatic degradation, facilitate the cellular uptake and prolong the circulation half-life time of siRNA and miRNA [54]* Until now, some lipid-based nanocarriers have been used in clinical trials [55]. Commonly, a typical cationic lipid-based nanoparticle formulation for *in vivo* delivery consists of cationic lipids, neutral lipids and PEG-phospholipids. Negatively charged hydrophilic miRNAs can bind to the positively charged lipids, leading to efficient cellular uptake of the incorporated miRNAs by interaction between the positively charged complexes and negatively charged cell membrane [56]. Liposomes belong to LNP with a particularity: phospholipids are organized in a bilayer structure with an aqueous core. Recently, DSPE-PEG2000-tLyp-1 showed an encapsulation efficiency of the engineered miRNA greater than 80%, and an efficient intracellular penetration with promising properties to reduce tumor growth in cancer-bearing mice [57]. Recently, LNPs complexed with RNAi named Patisiran[®] was FDA approved in 2018. Patisiran[®] is a double-stranded small interfering ribonucleic acid, formulated as a lipid complex for a delivery to hepatocytes. Patisiran[®] specifically binds to a genetically conserved sequence in the 3' untranslated region (3'UTR) of mutant and wild-type transthyretin (TTR) messenger RNA (mRNA). Patisiran[®] causes degradation of mutant and wild-type TTR mRNA through RNA interference, which results in a reduction of serum TTR protein and TTR protein deposits in tissues [58]. This first example of a FDA approved nanosystem for RNAi delivery shows the promising aspect of LNP to be used for human miRNA administration.

Regarding the polymeric nanoparticles, one of the most studied is the PLGA nanosystem. PLGA is composed of glycolic and lactic acid building blocks and has been approved by the FDA. PLGA can be hydrolyzed and broken into nontoxic monomers and consequently be metabolized by the body without any side effects [59]. Furthermore, the formed PLGA nanoparticles can escape from the endo-lysosomal compartment to the cytoplasmic compartment, leading to sustained intracellular release of encapsulated agents with prolonged therapeutic efficacy [60]. For instance, miR-99 were complexed and encapsulated in PLGA nanoparticles to form nanoparticles with a diameter of 50.1 ± 1.2 nm with a drug loading of $79.0 \pm 2.1\%$. In vitro and in vivo results revealed that miRNA loaded PLGA nanoparticles with a specific ligand target was promising to cure carcinoma cancer [61].

b) Inorganic

In the last 15 years, the use of inorganic nanoparticles (gold, magnetic, silica and quantum dots) as miRNAs delivery agents has been investigated and extensively described [62].

Among the different metals, gold nanoparticles are really attractive due to its inactive nature, simplicity of formulation, functionalization and targeted capacity [63]. Therefore, it is widely used for different applications including gene delivery. In 2013, cysteamine-functionalized gold nanoparticles (AuNPs) were designed. This AuNPs were capable of delivering up to a 10–20 folds overexpression of mature miRNAs compared to the conventional liposome-mediated transfection. This nanosystem had a diameter of 13 nm and a drug loading of 100ng/ μ g and was able to deliver unmodified miRNAs that resulted in an efficient endosomal release and a long half-life [64]. Since then, other formulations were performed from gold nanoparticles and this system seems to be a good strategy for miRNA delivery [65].

Carbon nanotube is another promising nanovector due to the easy functionalization property of this material [66]. For instance, carbon nanotubes can be functionalized with DOTAP for enhancing its complexation properties with miRNA and showed 82.6 % of silencing activity and 92 % of transfection efficiency in cancer cells lines [67].

Mesoporous silica nanoparticles have a large surface area for functionalization and tunable pore size, an ideal biomaterial for different therapeutic applications [169], such as miRNA delivery [68]. For example, mesoporous silica nanoparticles functionalized with dopamine were used to deliver miR-155 for colorectal cancer therapy. The nanoparticles had a diameter of 169.4 ± 4.5 nm with 50 mg of formulation containing optical density of miR-155. The in vivo effect evaluated on colorectal cancer mice model was promising [69].

Quantum dots (QD) are semiconductor-based, monodispersed, nanometer-sized crystals, which can be formulated by different methods including colloidal or plasma synthesis mechanisms [70]. For instance, QD were used to deliver miR-26a to induce cycle arrest, and trigger proliferation inhibition in HepG2 cells. QD were coated with polyethyleneimine to permit the interaction with miRNA. The nanoparticles had a diameter of 120 nm with 1 mg /mL of miR- 26a and showed promising in vitro results on cell proliferation and cycle [71]. QD were also used for imaging and detection of miRNA. X. Qiu et al. demonstrated that with multiplexing of QD, different miRNA were detected with precision in biological condition [72]. All these studies demonstrated that QD nanocarrier systems are potent for early detection, monitoring and localized treatment of specific diseases, such as IDD.

miRNA in IDD

IDD has been suggested as a cascade that begins with changes at the local cellular microenvironment and progresses to impairment of their structure and function. Even if the involved mechanisms are not fully understood, it is well established that apoptosis, ECM disruption, cell proliferation and inflammatory response play critical roles in promoting the development of disc degeneration. Notably, some miRNAs have been confirmed to play a role in IDD by affecting these pathological processes.

I- miRNA affecting apoptosis in IVD

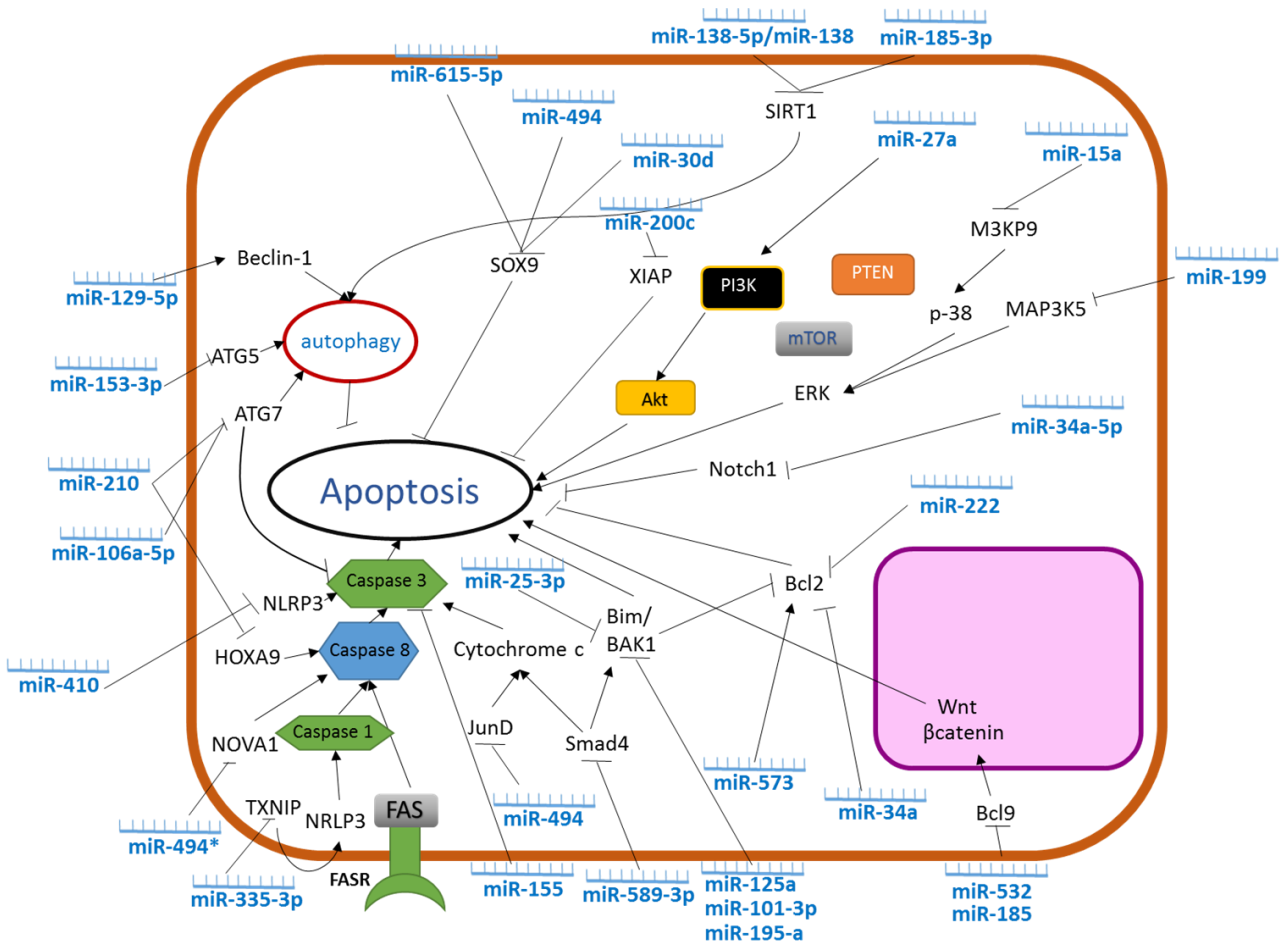


Figure 4: Schematic representation of miRNA activity in apoptosis

Apoptosis requires the involvement of caspases in both extrinsic and intrinsic pathways [73]. Apoptosis is characterized by the apoptotic body formation, chromosomal concentration, DNA degradation and cell narrowing. There has been a large amount of evidence demonstrating that apoptosis is related with different physiological processes, but is also widely involved in many degenerative pathological diseases, such as cardiovascular, neurological, auto-immune disorders and intervertebral disc degeneration [74–76]. NP cells play a crucial role in maintaining in vitro and in vivo structural stability, via the synthesis of ECM components, to resist to mechanical constraint. It is well established that the decrease of NP cells is an important mechanism for IVD degeneration [77].

In apoptosis regulation by miRNA there is two types of approaches. miRNA directly target apoptosis pathways or miRNA targeting signaling influencing apoptosis (Figure 4).

Fas-mediated pathway is known to be one of the direct apoptosis pathways in cell metabolism. miR-155 has been identified to directly target the 3'-UTRs of FADD and caspase-3: in vitro miR-155 repression by the use of antgomiR-155 in lentivirus resulted in the up-regulation of FADD and caspase-3 and consequently increased apoptosis of NP cells [78]. miR-210 is also involved in Fas-mediated apoptosis pathway by directly target the HOX9 protein. The downregulation of miR-210 by in vitro lentiviral method promoted Fas-mediated apoptosis by regulating HOXA9 protein expression [79]. There is a new class of long non coding RNA called circular RNAs, circRNA, proven to be a competing endogenous RNAs to interact with microRNAs and influence the expression of miRNA [80].

The Growth arrest-specific transcript 5, GAS5, is a long non coding RNA known to directly target the miR-155. In IDD, the GDF5 is upregulated and seems to upregulate the caspase 3 and downregulate

Bcl-2 leading to apoptosis of NP cells. These results were in accordance with previous study highlighting the impact of miR-155 on apoptosis. The GAS5 acted as a miR-155 sponge, leading to the bcl-2 downregulation and caspase 3 upregulation.

One of the major apoptosis actors is also the Bcl-2 family protein known to directly impact the Fas-mediated apoptosis in cell metabolism. Many miRNA is known to interact with this family in intervertebral disc. The miR-125a downregulated the BAK1 protein, known to form a complex with bcl-2 and release pro-apoptotic factors by an increase of mitochondria membrane permeability, leading to an alleviation of apoptosis. The impact of miR-125a was highlighted by P. Liu *et al.*, on IDD by RT-QPCR and Western blot analysis on IDD tissues collected from patient and confirmed by Ma *et al.* [81],[82]. The miR-34a is also known to inhibit Bcl-2 expression by directly targeting their 3'-untranslated regions, and this inhibition was abolished by mutation of the miR-34a binding sites. In vitro knockdown of miR-34a in human endplate chondrocytes resulted in overexpression of Bcl-2, whereas upregulation of miR-34a led to repression of Bcl-2 and an increase of apoptosis [83]. Thus, the downregulation of miR-34a was a promising way to limit the apoptosis of human endplates chondrocytes. These results were confirmed by the use of lnc HOTAIR circRNA, to adsorb miR-34a and reduced its effect [84]. Another miRNA directly targets the Bcl-2 protein, the miR-222 was discovered to target Bcl-2 using miRanda, miRDB and TargetScan. These predictive results were confirmed by RT-QPCR and western blot analysis. As previously described, Bcl-2 is one of the main proteins involved in apoptosis pathway. Therefore, the effect of miR-222 on apoptosis was also confirmed by CCK-8 test [85].

Bax is also an important member of the Bcl-2 family. It has been well documented that increased Bcl-2 expression and decreased Bax expression reduced mitochondrial membrane permeability and suppressed the release of apoptotic activators including cytochrome c, which then reduced the caspase-3 and caspase-9 activations and led to inhibition of cell apoptosis. The miR-573 directly target the Bax protein. miR-573 was downregulated in IDD and correlated with the increase of Bax protein. This interaction was confirmed by luciferase assay. miR-573 significantly increased the expression of Bcl-2 and decreased the expression of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 in degenerative NP cells through the downregulation of Bax. [86].

SNHG6 a long non coding RNA also impact the Bax/Bcl-2 protein. SNHG6 act as a sponge of miR-101-3p and induce an upregulation of Bax/Bcl-2 leading to apoptosis. SHG6 has been identified to be upregulated in IDD. The exact mechanism is not described [87].

Bax/Bak complex protein is involved in upregulation of apoptosis and ECM degradation in IDD. This complex is targeted by miR-195-a and reduce its expression. This mechanism was identified through the use of NEAT1 a long non coding RNA sponging the miR-195-a. miR-195-a upregulation can be a good strategy to counteract the IDD [88].

Bim is also a Bcl-2 family protein, and was recently identified to be targeted from miR-25-3-p inducing downregulation of Bim protein. The downregulation of Bim lead to reducing of cell apoptosis and counteract IDD [89].

Another direct pathway of apoptosis is the caspase-cytochrome C metabolic way. Just one miRNA was described for now, the miR-494. TNF- α induced NP apoptosis and in vitro model demonstrated the involvement of miR-494 in the IDD. Lentivirus antago-miR-494 and miR-494 infection studies showed that miR-494 targeted JunD protein, known to play a role in apoptosis by caspase-JunD-cytochrome C pathway. However, further experiments need to be done to confirm these results, by especially quantify the different caspase expression levels [90].

There is many indirect pathways involved in apoptosis in IDD, Akt, MAPK, Autophagy and others. miRNA interact with a lot of indirect pathways and impact the NP cell apoptosis. PI3K/Akt signaling is phosphorylation cascade impacting many important cell metabolism pathways. The miR-27a effect in IDD was studied by FACS, MTT, RT-QPCR and western blot analysis in primary cell line of NP. Taken together, obtained results showed that an up-regulation of miR-27a expression might be responsible for

the apoptosis of NP cells induced by PI3K, and that miR-27a interacted with its target gene PIK3CD, to regulate the apoptotic process by facilitating activation of the PI3K/Akt signaling pathway [91].

A recent study identified SIRT1 as a novel target of miR-138-5p and shown that downregulation of miR-138-5p suppresses TNF- α -induced apoptosis in human NP cells by targeting SIRT1 through PTEN/PI3K/Akt signaling, demonstrating the role of miR-138-5p in the IDD etiology. These results indicate that miR-138-5p might be a protective factor against NP cell apoptosis through SIRT1/PTEN/PI3K/Akt signaling [92].

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) modules containing three sequentially activated protein kinases are key components of a series of vital signal transduction pathways that regulate important metabolism processes. MAP3K9, an upstream activator of MAPK kinase, was identified to be a potential target of the miR-15a: it was confirmed by western blot and RT-QPCR experiments. Further analysis demonstrated that miR-15a promoted cell apoptosis and reduced proliferation by reducing the p-38 and ERK proteins through downregulation of M3KP9 [93]. MAP3K5 is also an activator of MAPK signaling and was expressed at high levels in TNF- α treated human nucleus pulposus cells. It was identified that miR-199 directly target this protein. Additionally, MAP3K5 over-expression plasmid exacerbated TNF- α induced apoptosis, inhibited by miR-199, demonstrating that miR-199 may play a role in TNF- α , in inducing apoptosis of human nucleus pulposus cells by regulating MAP3K5 [94].

The Wnt signaling pathways are signal transduction pathways which begin with proteins that pass signals into a cell through cell surface receptors. Wnt signaling lead to many effects in cell like apoptosis.

Z.Shun et al. demonstrated that the expression of β -catenin, c-Myc and Survivin proteins were down-regulated by miR-532 [95]. In addition, miR-532 has a central role in the regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. Wnt/ β -catenin signaling is also modulated by a series of β -catenin-interacting co-factors at the transcriptional level. Among these co-factors, B-cell lymphoma 9 (Bcl-9) can strengthen the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway. In brief, miR-532 targets Bcl-9 protein which down-regulates Wnt/ β -catenin pathway and leads to apoptosis of human nucleus pulposus cells. As miR-532, miR-185 could promote nucleus pulposus cell viability and inhibit nucleus pulposus cell autophagy and apoptosis but by suppressing Galectin-3 and blocking the Wnt/ β -catenin signaling pathway in IDD, thus impeding the development of IDD [96].

Autophagy is an essential, conserved self-eating process that cells perform to allow degradation of intracellular components, including soluble proteins, aggregated proteins, organelles, macromolecular complexes, and foreign bodies. Transfection of miR-129-5p mimic significantly decreased Beclin-1 expression and inhibited NP cell autophagy, whereas miR-129-5p inhibitor had the opposite effect indicating that miR-129-5p suppresses NP cell autophagy by regulating Beclin-1 expression. Similarly, dysregulated miR-129-5p may prevent autophagy in human IDD by inhibiting Beclin-1, suggesting that miR-129-5p could be an etiological factor in this disease [97].

miR-106a-5p suppressed the expression of ATG7 by directly binding to its 3'UTR in AF cells of patients with DD. ATG7 is essential for maintaining the homeostasis of axons and for preventing their degeneration. ATG7 was negatively correlated with the activity of caspase-3 which is cleaved by PARP and induced apoptosis in AF cells. Then, the miR-106a-5p induced apoptosis of AF cells by targeting ATG7 pathway in IDD [98]. miR-202-5p has been also identified to targeted ATG7 and increase the apoptosis in NP cells with the same mechanism of miR-106a-5p in AF cells [99].

Notch-1 is also phosphorylation cascade pathway implicated in many metabolic incidences. In IDD miRNA-34a-5p promotes NP cell apoptosis via targeting Notch1 for degradation, and HOTAIR can serve as a miR-34a-5p sponge, sequestering it and thereby preventing it from driving Notch1 degradation and apoptotic cell death. HOTAIR overexpression can decrease rates of apoptosis in both healthy and degenerative NP cells, and this HOTAIR/miR-34a-5p/Notch1 pathway is thus a key regulator of NP cell apoptotic death, which may be worthy of investigation as a therapeutic target [100].

Another pathway impacting cell apoptosis in NP was identified in the study of L.Yu *et al.*, they confirmed that TXNIP expression at mRNA and protein levels was increased in IDD patients, compared to patients with spinal cord injury [101]. In addition, knockdown of TXNIP reduced NLRP3, caspase-1, IL-1 β protein levels and IL-1 β production, as well as the cell apoptosis of NPCs, whereas LINC00969

multigene family, consisting of 19 members of closely related metalloproteinases.

Correlation between miR-155, MMP-16, and IDD was found in clinical cases, and showed that miR-155 and MMP-16 could be combined in the luciferase report gene. This process has been proved in animal models. The present study demonstrated, for the first time, that miR-155 regulates IDD by targeting MMP-16 and elucidated the pathway in an animal model of disc degeneration [103]. Disc degeneration is characterized by matrix degradation and decreased cellularity [32]. This study focused on the degradation of the extracellular matrix and the role of MMP-16 in degradation of the extracellular matrix was defined. Down-regulation of miR-155 directly up-regulates MMP-16, and MMP-16 further degrades aggrecan [104]. MMP-16 is also targeted by miR-503 and have then the same effect on its down-regulation. This binding was discovered through the use of LncRNA MALAT1 acting as a sponge for miR-503 [105].

MMP13 was suggested to be a direct target for miR-155 confirmed by dual-luciferase reporter assay. MMP13 levels in the cells and cultured supernatant were significantly reduced, whereas type II collagen expression was significantly elevated when annulus fibrosis cells were transfected by miR-155. In conclusion, negative association between miR-155 and MMP13. In patients with spinal tuberculosis-induced intervertebral disc destruction, miR-155 expression was decreased, affecting its target MMP13 by downregulating expression and further influencing type II collagen expression [106].

miR-27b was lower in human degenerative NP tissues and that its level was associated with disc degeneration grade. The downregulation of miR-27b induces type II collagen loss by directly targeting MMP13, leading to the development of IDD. Therefore, strategies to maintain the expression or to prevent the repression of miR-27b have the potential to become a possible therapeutic strategy for human IDD [107].

A complementary sequence of miR-93 was identified on the MMP3 mRNA website 3'UTR and the overexpression of miR-93 resulted in a significant reduction in MMP3 expression. MMP3 was upregulated in degenerative tissues of human cells compared to healthy cells, and the expression level of MMP3 was inversely correlated with the expression of miR-93. It is considered that a reduced expression of miR-93, increase the level of MMP3, leading to degrading ECM components such as type II collagen and aggrecan. The reduction of miR-93 contribute to the degradation of IVD [108].

MMP-1 expression was potentially regulated by miR-202-3p confirmed by luciferase test on 3'UTR-MMP1. After induce MMP-1 production by the addition of IL-1 β , the miR-202-3p shown to downregulate the production of MMP1 compared to the control. Therefore, inhibition with antagomiR-202-3p caused higher decrease of Collagen II than in IL-1 β control. Taking together these results confirm that miR-202-3p is directly inhibit the production of MMP1 and help to counteract the ECM degradation in IDD [109].

After qRT-PCR confirmation, miR-133a was significantly down-regulated in degenerative NP tissues. Moreover, its level was inversely correlated with grade of disc degeneration. Through gain and loss of function studies, miR-133a was demonstrated to significantly promote type II collagen expression in NP cells. MMP9 was identified as a target of miR-133a. Knockdown of MMP9 induced effects on NP cells, similar to those induced by miR-133a. Expression of MMP9 was inversely correlated with miR-133a expression in degenerative NP tissues [110]. The impact of the expression of miR-133a, MMP9, Collagen II, Collagen I and Collagen IX on the intervertebral disc was explored, in particular the role played by miR-133a in spinal tuberculosis and its mechanisms. MMP9 and the above-mentioned types of collagen are the only proteins targeted by miR-133a: therefore, further researches and investigation are needed to determine additional miR-133a targets in the hope of finding a novel therapeutic tool for better IDD treatment [111].

ADAMT17 is a direct target of miR-145 confirmed by luciferase test. ADAMT17 is known to be involved in degeneration of IVD. MiR-145 downregulated the expression of ADAMT17 and restore the expression and protein level of COL2A1 and Aggrecan in nucleus pulposus cells. In brief the miR-145 decrease the level of ADAMT17 and restore the level of COL2A1 and Aggrecan to counteract the degeneration of IVD [112].

miR-3150a-3p was significantly up-regulated in NP tissues from patients with IDD. miR-3150a-3p sequence had a binding site for the 3'-UTR of wild-type ACAN and confirm this downregulated effect on

western blot and RT-QPCR. Taking together these results show that miR-3150a-3p downregulated the ACAN leading to ECM degradation in NP and IDD [113].

One of pathway affecting the ECM is the pathway of TGF indeed TGF is known to be involved in ECM communication in fibrosis leading to increase or loss of ECM. miR-100 has been identified to bind to FGFR3 transcripts and to inhibit its regulation, leading to an increase of FGF1. MMP13 has been shown to be regulated by fibroblast growth factor 2 (FGF2) through binding to fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) and FGFR3, competitors for FGF2 bindings. Hence, FGFR3 is suggested to have a negative effect on FGF2-mediated MMP13 expression. Thus, miR-100 inhibits the FGFR3/FGF2 binding by downregulation of FGF3 and thereby increases the FGFR1/FGF2 binding and synthesis of MMP13 led to ECM degradation in hNPCs [114]. It has been proved that miR-589-3p targeted and down-regulated Smad4, a co-activator and mediator of TGF- β signal pathway. Thus, miR-589-3p negatively regulates Smad4 expression in NP cells, consistent with the previous study [115]. These results suggested that miRNA-589-3p may affect the ECM and inflammation and taken together, these results indicated an important effect of miR-589-3p on IDD progress [116].

The effect of miR-665 on GDF5 expression was proven by dual-luciferase test. The ectopic expression of miR-665 decreased luciferase activity in the wild-type; however, the mutant luciferase activity has not changed. In fact, the overexpression of miR-665 inhibited the expression of GDF5 in the NP cell. As a member of the TGF- β family, GDF5 was important for skeletal development and it could inhibit ECM degradation and promote ECM anabolism in IVD cells. Overexpression of GDF5 promoted the expression of aggrecan and type II collagen in IVD cells. In addition, ectopic expression of GDF5 inhibited catabolic metabolism by suppressing catabolic gene expression. miR-665 overexpression increased NP cell proliferation and decreased aggrecan and Col II expression. In brief, ectopic expression of miR-665 increased the expression of MMP-3 and MMP-13 by targeting GDF5 expression in NP cells. Therefore, these results suggested that the negative modulation of GDF5 by miR-665 contributed to the degradation of ECM in the development of IDD. [117] induced by LPS stimulation. In conclusion, the present study may lead to a greater understanding of IVD degeneration and provide new insights into the treatment of this disease [118].

Inflammatory pathway impact as well the production of extracellular matrix. Inflammatory pathway will directly impact the MMP and ADAMTS or impact the extracellular content by indirect metabolic effect. In example, circSEMA4B negatively regulated miR-431 expression through direct targeting, indicating that miR-431 might modulate the progression of IDD. Contrary to circSEMA4B, miR-431 overexpression enhanced the IL-1 β -induced degenerative process, manifested as a reduced Collagen II and Aggrecan proteins, a suppressed NPCs proliferation and a promoted senescence. SFRP1/GSK-3 β rescue by circSEMA4B, inhibit IL-1 β -induced degenerative process in NPCs through Wnt signaling [119].

miR-132 targets in the 3'-UTR of GDF5 gene. GDF5 is known to increased ECM synthesis in NP cells and especially the aggrecan and type 2 collagen. The targeting was confirmed by knockdown of GDF5 which inhibited the effect of miR-132. These results show that miR-132 is directly involved in IDD progression [120].

Previously identified interaction of miR-149 and MyD88 using bioinformatics tools was confirmed by luciferase test. myD88 is play a vital role in intervertebral role in IDD. H. Tan *et al.* show that miR-149 inhibits the TLR4 signal pathway by targeting MyD88, which suppresses LPS-induced inflammatory responses, leading to decreased ECM degradation and NP cell apoptosis. Therefore, miR-149 may be a possible target for IDD therapy development [121].

III- miRNA affecting inflammation in IDD.

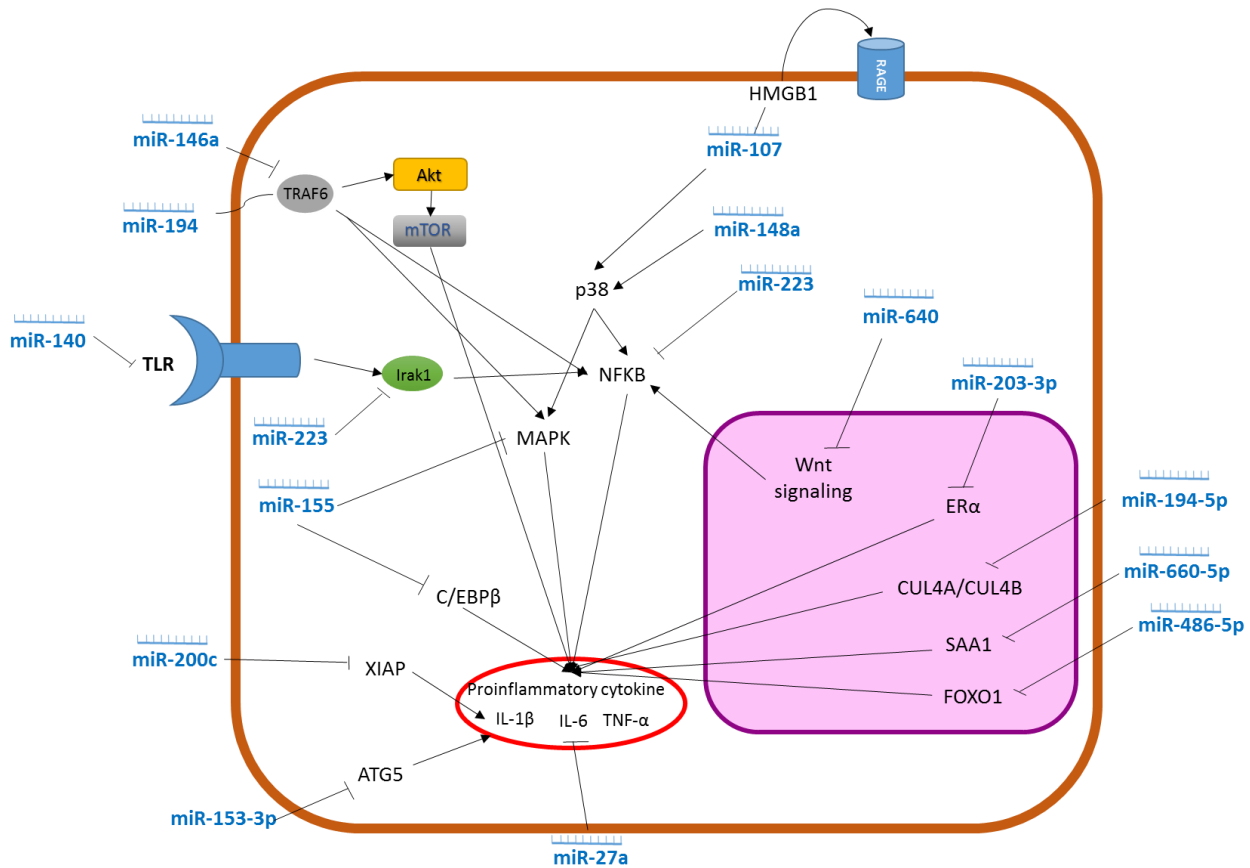


Figure 7: Schematic representation of miRNA activity in inflammation

Inflammatory cytokines also, impact the ECM degradation indirectly. miR-146a suppresses IL-1-mediated induction of ECM-degrading enzymes, including MMP-13, ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in bovine nanoparticles cells. miR-146a significantly suppresses the induction of TRAF6 protein levels by IL-1. Since miR146a did not reduce TRAF6 mRNA levels, it appears that miR-146a can control the translation and/or degradation of the TRAF6 protein. The experimental increase in miR-146a levels also suppresses the upward regulation of COX2, IL-6, iNOS and TNF- α IL-1, and these results are an additional indication of its anti-inflammatory and antioxidant effects on the intervertebral disc. Finally, the loss of IL-1 mediated PGs and the expression of MMP-13 and ADAMTS-5 were more intense in miR-146a KO mouse discs than in WT discs [122].

miR-140 directly bound to the 3'UTR of CREB1, and thus negatively regulated the protein levels of CREB1, miR-140 overexpression, decrease IL-1 β - or TNF- α -induced ECM degradation in human NP cells by suppressing CREB1 and its impact on MMP-3 and ADAMTS5 proteins. Furthermore S. Yang *et al.* indicated miR-140 increased or act as double agent with aucubin to decrease the effect of CREB1 and its impact on cell metabolism [123].

miR-15b levels increased in human degenerative NP tissues. miR-15b regulates IL-1b-induced NP ECM degradation by directly targeting SMAD3. IL-1b-induced downregulation of aggrecan and type II collagen expression and upregulation of MMP3, MMP13, ADAMTS4, and ADAMTS5 expression effected by miR-15b silencing. Therefore, strategies to downregulate the expression or to prevent the upregulation of miR-15b may have the potential to become a possible therapeutic and/or preventive approach for human IDD [124].

IL-6 expression level was positively correlated with disc degeneration, while the IL-6 expression level was negatively correlated with the miR-98 level and the collagen II expression. Indeed, the activation of STAT3 induces transcription of target genes, including Bcl-2, Mcl-1, cyclin D1 and MMP2 and miR-

98 was identified to target STAT3. In vitro functional studies confirmed that miR-98 inhibits the IL-6/STAT3 signaling pathway in IDD [125].

LPS stimulation resulted in significant increases in TLR4 expression and decreases in miR-140 expression in nucleus pulposus (NP) cells and TLR4 was identified as a target of miR-140 by dual-luciferase reporter assay. The overexpression of miR-140 inhibited the upregulation of the expression of TLR4, TNF- α , IL-1 β and IL-6 inflammation cytokines, and the activation of NF- κ B and reversed the downregulation of the expression of aggrecan and collagen type II.

ECM degradation can be modulated by several transcription and growth factor. For example, RP11-296A18.3 knockdown significantly suppressed HNPCs proliferation, as well as the protein levels of disc degeneration ECM markers, Collagen I and MMP-13. RP11-296A18.3 is a long non coding RNA acting as a circRNA and adsorbs specifically the miR-138. miR-138 impacts the HNPCs proliferation and ECM synthesis through HIF1A expression modulation. HIF1A overexpression increases proliferation and MMP13/COL1 expression, leading to a degeneration of ECM in HNPCs. Then, targeting RP11-296A18.3 to rescue miR-138 expression in HNPCs and IDD tissues could be a promising strategy for IDD improvement [126].

The transcription factor TCF7L2 was identified to be regulated by miR-155, which is refractory to inflammatory cytokine stimulation, the suppression of TCF7L2 through the p65/NF- κ B signaling pathway which plays an important role in the regulation of matrix metabolism by TCF7L2, and TCF7L2 is regulated by miR-155, a sustainable factor in IDD impacting ECM in NP cells [127].

The overexpression of SOX9 in NP cells results in an accumulation of proteoglycan and collagen. Moreover, the overexpression of SOX9 inhibited the apoptosis and extracellular matrix degradation of degenerative human NP cells by promoting the expression of Col2a1 and aggrecan and inhibiting the expression of MMP3/13 and ADAMTS4/5. miR-30d as a novel miRNA for targeting SOX9 in degenerative NP cells. Inhibition of miR-30d promoted SOX9 expression in degenerative NP cells and this effect contributed to inhibition of cell apoptosis and promotion of extracellular matrix synthesis. Then, the dysregulation of SOX9 by miRNA was associated with the degeneration process of NP cells. Targeting miR-30d to modulate SOX9 expression may represent a potential therapeutic approach for preventing IDD [128].

There is downregulation of the transcription factor, SOX9, its expression in severe IDD and an inverse correlation between miR-494 and SOX9 levels in degenerative NP cells. SOX9 knockdown reversed the effects of miR-494 inhibition on the expression of ECM markers such as type II collagen, aggrecan, sGAG, MMP3, MMP13, ADAMTS4, and ADAMTS5 and the rate of apoptosis in degenerative NP cells. Thus, negative regulation of SOX9 by miR-494 contributes to ECM degradation [129]. Through bioinformatical analysis, FGF14 was predicted to be a potential target of miR-154, which subsequently was confirmed via results from the luciferase reporter assay. Unlike other members of the FGF family, FGF14 is intracellular and interacts with the voltage-gated sodium channels and MAPK scaffold protein in brain. Overexpression of FGF14 and inhibition of miR-154 have the same profile and increase type II collagen and aggrecan and decrease expressions of MMP13 and ADAMTS4 [130].

eEF2 a specific transcription factor, was found to be targeted by miR-143-5p with target scan analysis and was confirmed by luciferase assay. miR-143-5p was observed to inhibit NP cell senescence and apoptosis and promote cell proliferation and differentiation via repressing the activity of the AMPK signaling pathway eventually by the effect on eEF2. However, the exact mechanism was not fully characterized [131]. Notch-1 is a transcription factor implicated in transmembrane communication. The miR-146 played an important role in negatively regulating Notch1 receptor expression. Cell proliferation rate and relative protein expression levels of ACAN and COL II in miR-146 over-expression group were remarkably higher than normal one. Indicated that Notch1 downregulation by miR-146 can be a good strategy to counteract IDD [132].

ECM metabolism will also be modulating by other pathways. ERK1/2 is one of the proteins known to be involved in MAP kinase known to interact with ECM modulation. Overexpression or inhibition of miR-155 had no effects on the expression level of mRNA ERK1/2 in nucleus pulposus cell. Inhibited miR-155 decreased the expressions of extracellular matrix collagen II and glycosaminoglycan

while increasing expression of ERK1/2. According to the mentioned above, miR-155 decreased the expressions of extracellular main matrix collagen II and glycosaminoglycan and increased expression of ERK1/2 [133].

ψεRACK activation, a specific activator of PKCε, sequentially led to prolonged activation of ERK1/2, an increase in the abundance of the first ATF, CREB1 and Fos gene products with a simultaneous reduction in transcription for Ki67 and an increase in mRNA expression for aggrecan. More importantly, ψεRACK has induced an upward regulation of hsa-miR-377 expression, associated with a decrease in ADAMTS5 and cleaved aggrecan [134].

Autophagy specific protein is also impactful in ECM degradation in NP cells. miR-210 expression levels are higher in human degenerated NP tissues than in healthy controls, and are positively correlated with disc degeneration grade. Importantly, miR-210 directly targets ATG7 and then prevents autophagy, resulting in upregulation of MMP-3 and MMP-13 and subsequent degradation of Col II and aggrecan in human degenerated NP cells. These findings have brought a novel light on the role of miR-210 in the pathogenesis of IDD [135].

Wnt can also regulate the ECM degradation in IDD. miR-431 has been identified to bound to the 3'UTR of SFRP1 or GSK-3β, respectively, to inhibit their expression. CircSEMA4B is known to be complementary to the miR-431 sequence. Then, miR-431 inhibition partially reversed the effect of circSEMA4B, knockdown on NPCs upon IL-1β stimulation. As a further confirmation of the above findings, the miR-431 expression was significantly up-regulated, while GSK-3β and SFRP1 expression was down-regulated in IDD specimens: miR-431 was negatively correlated in IDD, while GSK-3β and SFRP1 were positively correlated with circSEMA4B in tissue samples, indicating that circSEMA4B directly targeted miR-431 to serve as a miRNA sponge, thus rescuing the expression of GSK-3β and SFRP1, two downstream target genes of miR-431 and negative regulators of Wnt signaling. GSK-3β and SFRP1 rescue possibly lead to the regeneration of IVD [42].

Cyclin/CDK impact cell metabolism and was identified using Target scan, to be targeted by miR-222-3p confirmed by dual luciferase assay. Therefore, the miR-222-3p is upregulated in IDD by interrogation of the data bank GE1993 clinical assay. Western blot and Q-PCR analysis show that when the miR-222-3p is upregulated the level of COL2A1 and ACAN decrease and the level of MMP-3 increase. Then, the miR-222-3p downregulated CDKN1B and promote the IDD. However, the exact mechanism needs to be further investigated [136].

Cartilaginous endplate carrying nutrients for the intervertebral disc and is crucial for the synthesis of ECM by NP cells. miR-20a directly target the 3'UTR-ANKH and downregulate it. The downregulation of ANKH promotes the calcification of endogenous endplate. Therefore, the calcification reduces the nutrient supply for IVD, leading to ECM degradation of IVD [137].

The expression of miR-206 was down regulated in degenerated NP tissues compared to normal NP samples and lower miR-206 expression was correlated with early disc degeneration grade. Ectopic expression of miR-206 suppressed NP cell proliferation and suppressed the Type II collagen and aggrecan expression and enhanced the expression of MMP13 and ADAMTS4. However, the exact pathway is not fully characterized. This study was done by X. Wang *et al.* through the lncRNA RMRP which act as a sponge for the miR-206 [138].

IV- miRNA affecting proliferation in IDD

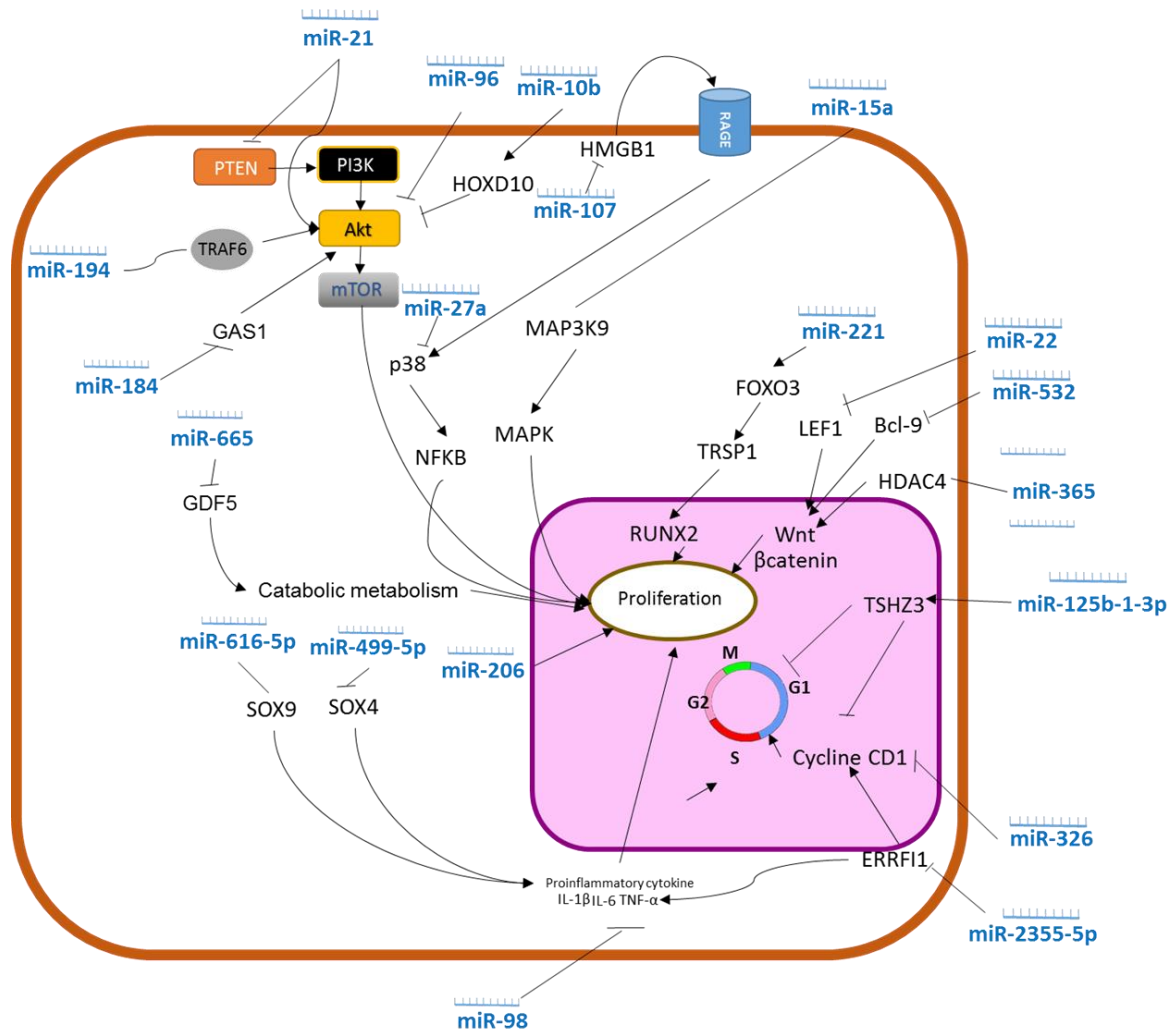


Figure 6: Schematic representation of miRNA activity in proliferation

The healthy human IVDs contain specific cells with low density and with specific proliferation profile. A characteristic feature of disc degeneration is the appearance of cell clusters, particularly in damaged areas. Since NP cells are the most important cells within the discs, aberrant proliferation of these cells has been considered as the main cause of cell cluster formation and plays a crucial role in IDD. A variety of factors, such as $TNF-\alpha$, PDGF, IGF-1 and thymosin beta-4 (TB-4), have been reported to modulate NP cell proliferation. Similar to these factors, miRNAs are also associated with the proliferation of NP cells (Figure 6) [139].

Cyclin/CDK complexes is known to directly impact the proliferation in all cell lines, in NP cells some miRNA can target this complex. After luciferase test, which identified the binding of miR-125b-1-3p to TSHZ3 gene, X. Meng *et al.* investigated the expression of cell cycle associated proteins in NP cells by western blot analysis following TSHZ3 silencing [140]. The results revealed that the expression of cyclin D1 associated with the G1 phase and cyclin B1 associated with the G2/M phase of the cell cycle were significantly decreased, indicating that the inhibition of TSHZ3 may induce G1 and G2/M phase arrest, thus blocking the proliferation of NP cells. In conclusion the miR-125-1-3p inhibited the cell proliferation through the repression of TSHZ3 protein level.

Using Target scan the miR-2355-5p was identified to target ERRFI1 also known as Mig-6, an inhibitor of the EGFR receptor inducing decrease of the proliferation. These binding was confirmed by luciferase assay. With western blot and Q-PCR analysis the overexpression of miR-2355 was shown to downregulated ERRFI1 which decrease the level of Cyclin D1 and PCNA known to be involved in proliferation

pathway. The ERRF1 protein also reduced the level of IL-6, TNF- α and IL-1 β after LPS-induced degeneration of NP cells [141].

miR-326 also impact the cyclin D1 and was downregulate in IDD especially caused by the sponge effect of SNHG1 which is a long non coding miRNA. miR-326 directly target the expression of Cyclin D1 (CCND1). These results, show that SNHG1 downregulated miR-326 in IDD and induced aberrant proliferation due to lack of CCND1 [83].

Phosphorylation cascade pathways have huge impact on cell metabolism, and was regulated by miRNA expression resulting of cell proliferation modulation in NP cells. For example, blocking of the PTEN/Akt/mTOR pathway by Tep, MK-2206 or Tem significantly reversed the upward regulation of the expression SQSTM1/p62, MMP-3 and MMP-9 as well as the downward regulation of the expression Beclin-1, LC3-II/LC3-I, Col II and aggrecan induced by miR-21 mimic in degenerate human NP cells. Thus, miR-21-induced inhibition of autophagy and loss of ECM are mainly attributed to activation. miR-21 silences the PTEN protein that blocks Akt/mTOR phosphorylation and allows autophagy in hNPC. Second, inhibition of autophagy resulted in increased degradation of MMP/MMP13 and ECM. Inhibition of miR-21 may be a good strategy to counter IDD [142].

Akt phosphorylation is regulated by the expression of miR-96. miR-96 was significantly increased in degenerated NP tissues compared with control NP tissues, and positively associated with the disc degeneration grade. ARID2 is a direct target of miR-96. Indeed, a loss of ARID2 is reported to enhance Akt activation leading to upregulation of cyclin D1 and downregulation of p27, which subsequently increases growth and survival in various cell types. Thus, miR-96 reduce the cell proliferation through the targeting of ARID2/ Akt pathway [143]. miR-10b was identified to indirectly interact with Akt phosphorylation. miR-10b was overexpressed in human degenerative NP tissues and its level was positively associated with disc degeneration grade. However, the miR-10b directly target the HOXD10 protein. HOXD10 has been known to repress expression of genes involved in cell proliferation, including RhoC. RhoC is directly related to the Akt phosphorylation and impact the cell proliferation by this pathway. The role of miR-10b is not fully understood but this study highlighted an abnormal cell proliferation of NP cells could impact the IVD degeneration [144].

As mentioned before the miR-15a directly targeting MAP3K9 witch is down-regulated significantly the expression of p-ERK and p-p38 involved in proliferation mechanisms [93].

Wnt is also known to be a phosphorylation pathway. miR-365 inhibit the post-transcription of HDAC4, which further modulates activation of the Wnt/ β -catenin pathway. This impact the level of complexed E-catenin/ β -catenin leading to an abnormal proliferation and homeostasis of endplate chondrocyte leading to IDD [145].

LEF1 is a protein known to impact the expression of Wnt signaling. miR-22 bind to the 3'UTR negatively regulated LEF1, further indicating that Lnc RNA H19 serves as a sponge for miR-22 to inhibit its expression, and competes with LEF1 for the miR-22 link. LEF1 is involved in the activation of the Wnt/ β catenin channel impacting cell proliferation [146].

Transcription factors and protein impact the modulation of DNA will also impact the proliferation in NP cells. miR-138 might possess a binding site of RP11-296A18.3 and HIF1A which is previously described. These interactions were confirmed that RP11-296A18.3 bound to miR-138 to inhibit its expression. Furthermore, miR-138 inhibits HIF1A expression through direct targeting. Interestingly, RP11-296A18.3 shared an identical binding site of miR-138 with HIF1A, suggesting that RP11-296A18.3 might act as a competing endogenous RNAs (ceRNAs) to regulate HIF1A expression through sponging miR-138. It was well documented that HIF1A could regulate the transcription of several genes to promote cell proliferation under hypoxia [126]. miR-138 inhibits HIFA1 and promotes cell proliferation, this result has been confirmed by B. Wang et al. by MTT and BRCU tests [92].

FOXO family protein is transcription growth factor. miR-221 target FOXO3, FOXO3 is involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) by induction of SOD2, an enzyme having an important role in the response to cellular stress. Consistently, a remarkable increase in SOD2 expression was observed following an antagomiR-221 treatment, showing that the increase in FOXO3 mediated by the miR-221 silencer is accompanied by a significant effector of FOXO signaling such as SOD2. In addition, the antagomiR-221 treatment maintained low basal expression levels of RUNX2. RUNX2 is the master

regulator of osteogenesis. TRPS1 expression can help maintain the basal level of RUNX2 and suppress RUNX2 transactivation of genes associated with cartilage hypertrophy and ECM degradation, such as the alpha 1 chain of type X collagen (COL10A1), alkaline phosphatase (ALP) and MMPs, also in in vitro tissue [147].

Sox protein family is a transcription factor protein family previously described to impact several pathways in NP cells. In healthy IVD Circ-4099 has increased by a factor of about six, which can have biological consequences on the progression of degeneration. Overexpression of circ-4099 increased the expression of collagen II and aggrecan. TNF- α promoted the expression of Circ-4099 through MAPK and NF- κ B. Circ-4099 functions as a "sponge" by the competitive binding of miR-616-5p, which reverses the suppression of Sox9 by miR-616-5p, and participates in ECM synthesis in NP cells. Previous studies have shown that a decrease in Sox9 expression in NP cells is associated with degeneration of IVDs. Sox9 is a main regulator of NP cell differentiation, and Sox9 overexpression can improve the expression of typical genes encoding matrix proteins (Col2, Aggrecan, Versican, etc.). Sox9 overexpression can also reverse the IL-induced upward regulation of MMP-3, MMP-13, ADAMTS-5 by IL-1 β 34 [148].

miR-499a-5p was identified by bioinformatics analysis and confirmed by luciferase assay to directly target SOX4. SOX4, one of the SoxC family transcription factors, is dysregulated (and participates) in various diseases. In IDD, SOX4 is upregulated and promote the level expression of TNF- α . Upregulation of TNF- α will upregulate the apoptosis and ECM degradation in nucleus pulposus cells confirmed by western blot analysis of caspases and Collagen II. The inhibition of SOX4 by upregulation of miR-499a-5p can be a good strategy for the therapy of IDD [149].

The growth factor GAS1 was identified as a direct target gene of miR-184. miR-184 was upregulated in degenerative NP tissues compared with control NP tissues and expression of miR-184 was positively related with disk degeneration grade. GAS1 was downregulated in degenerative NP tissues compared with the control NP tissues and the GAS1 expression was inversely related with disk degeneration grade. Ectopic expression of GAS1 decreased the miR-184 overexpressing and its Akt phosphorylation and NP cell proliferation induced [150].

The overexpression of miR-665 in NP cells was previously described, briefly miR-665 promote ECM anabolism in the IVD cell by targeting the growth factor, GDF5. Ectopic expression of GDF5 inhibited catabolic metabolism by suppressing catabolic gene expression. Overexpression of miR-665 increased the proliferation of NP cells [117].

The previously described miR-206 is involved in proliferation. Ectopic expression of miR-206 suppressed NP cell proliferation. However, the exact pathway is not fully characterized [81].

Therapeutic approaches for miRNA in IDD

There are two different approaches for the miRNA use in therapy: the knock-down or the enhancement of miRNA involved in IDD metabolism pathways (Figure 8).

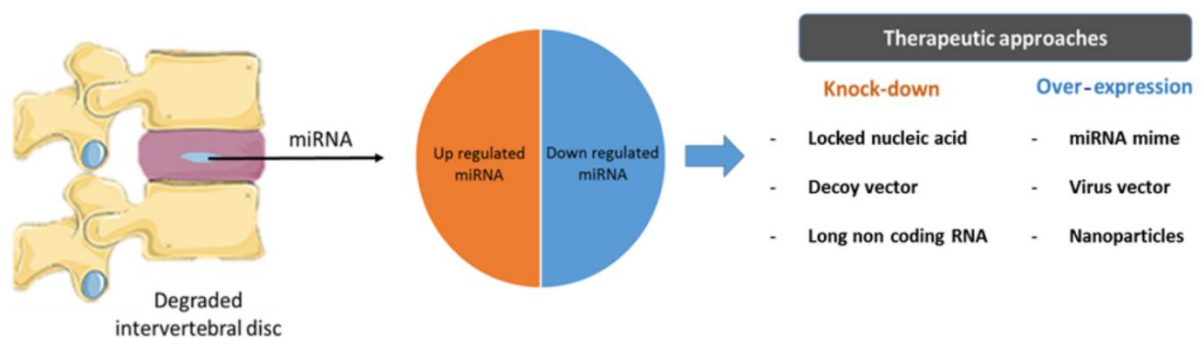


Figure 8: intervertebral disc miRNA therapeutic approaches.

I- Knock-down technics

a) Locked Nucleic Acid (LNA)

LNA anti-miR is a modified RNA that binds to its complementary sequence of RNA with unprecedented affinity and specificity to silence endogenous miRNA by strong liaison base pairing [164]. More precisely, the furanose rings are locked in the monomers unit in a spatial structure of endo/N-type C3 comparable to RNA structure. Its sugar ring is complexed with a methylene unit between O-2' and C-4', while it locks the ribose ring, enhancing the pairing capacity of LNA. So LNA is defined as 2'-O, 4'-C-Methylene- β -d-ribofuranosyl [165]. LNA is known to be in vivo very stable due to its composition and possess a high binding specificity with their miRNA target: siRNA [166]. LNA have the possibility to twist the conformation of adjacent DNA monomers toward the RNA-like N-type conformation in DNA/LNA mixmers.

LNA oligonucleotides can enter the cell using the appropriate gene delivery method. They are stable and non-toxic with good aqueous solubility and effective antisense performance within the cell and they do not cause any immune response. These properties led LNA oligonucleotides to be used as a strong and useful silencing tool based on special antisense in gene therapy [167]. Recent developments also provide a new perspective for the regulation of gene expression by another class of RNA: the Long Non-Coding RNAs (LncRNAs) [168].

b) Long Non Coding RNA

LncRNAs is known to interact with protein, chromatin and regulate the methylation [169]. This kind of sequences interact with RNA and DNA by complementary Watson–Crick base pairing to form hetero- or homo-duplexes. LncRNAs can form DNA-RNA-DNA triplexes through their unique conformation properties. LncRNAs can also recognize chromatin conformation and RNA special binding sites [168]. The inherent flexibility of RNA permits the formation of complex secondary structures that can function as binding domains for proteins or small molecules. The combination of these properties enables a much wider range of functions than is possible with miRNAs. LncRNAs can also contain multiple binding sites allowing multiple binding of different structures. The long non coding RNA can be present in 2 forms circular or linear in nature due to differences in epissage of DNA [170]. The goal is to choose the LncRNAs corresponding to the number of binding sites of targeted miRNA to downregulate its effect. Emergence of LncRNAs as inhibitor of miRNAs was first supported by the discovery of IPS1 in *A. thaliana*. Now lots of approaches was developed in all diseases to inhibit miRNA action and especially in cancer therapy, and some scientist try to synthetized LncRNAs with specific binding site to target specific miRNA acting as decoy vector [171].

c) Decoy vector

RNA molecules carrying target sequences for the desired miRNA constitute the most widely employed type of miRNA inhibitor [172]. The basic strategy is to provide a surplus of miRNA recognition sites exposed in a structural RNA context that optimizes affinity and specificity for the mature miRNA. By attracting the miRNA-loaded silencing complex, inhibitors should serve to reduce miRNA binding to the natural mRNA target. For vector-encoded inhibitors, expressed RNAs containing miRNA recognition sites range from short and simple antisense transcripts without additional sequences to structured scaffolds encompassing multiple miRNA binding sites. Depending on the specific application, both RNA Pol III- and RNA Pol II-transcribed decoy-type inhibitors would be applicable for suppressing miRNA function [173].

II- Enhancement approach

a) miRNA mimic

In addition to miRNA inhibition as a major miRNA therapeutic approach, miRNA replacement treatment with miRNA mimics should be another miRNA therapeutic approach in disease associated with decreased miRNAs expressions [174]. Synthetic miRNA mimics can assume the regulatory role of natural miRNAs. In diseases such as cancer, some tumor suppression-related miRNAs are downregulated. Therefore, artificial double-stranded miRNA (miRNA mimic) has been introduced to inhibit cancer through inhibiting proliferation in many cancer types [175]. Therefore, two types of RNA based therapy has been recently approved by FDA, Patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis

and inotersen (Tegsedi™), an antisense oligonucleotide inhibitor of mutant and wild-type human transthyretin, for the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis [176].

Conclusion

The IVD degeneration is a multifactorial and complex process. Although there is an incomplete understanding of miRNA pathways and targets in IDD, it is clear that a number of miRNAs are differentially expressed in degenerative human IVD tissues and cells. Among these, some miRNAs have been shown to play a positive or negative role in the progression of disc degeneration by regulating apoptosis, ECM remodeling, cell proliferation and inflammatory response. Thus, these altered miRNAs may be used as novel diagnostic and prognostic biomarkers of IDD. miRNA targeting therapy is expected to open a new hope for the management of degenerative disc disease.

Despite the large progress in this field, many challenges are still ahead. Approximately 100 miRNAs have been characterized in IDD but a lot more was upregulated. Thus, more investigations are required to elucidate the effects of other miRNAs on IDD. Considering that the majority of miRNAs have multiple targets, identification of all miRNA-related IDD targets is also essential to establish their contribution during degeneration. The miRNA-based therapeutic potential for disc degeneration comes mainly from *in vitro* experiments. There is still a lack of studies performed in animal models and patients with degenerative disc disease. Thus, both preclinical and clinical trials are urgently required for a better definition of the effectiveness and safety of miRNA targeting therapy. In addition, improvement of *in vivo* delivery systems of miRNAs is necessary for their clinical application. Recently, several novel delivery strategies have been developed to reduce miRNA disruption, especially nanoparticles characterized by an improved stability, a sustained release, a small size, a biocompatibility. New studies aim at developing active targeting nanoparticles containing a specific molecule. Nanotechnology in miRNA delivery field holds promises to detect and control various diseases and can be the newest promising treatment for IDD.

References

- [1] J.A. Waxenbaum, B. Futterman, Anatomy, Back, Intervertebral Discs, StatPearls Publishing, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262063> (accessed December 10, 2018).
- [2] G. Fontana, E. See, Current trends in biologics delivery to restore intervertebral disc anabolism, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 84 (2015) 146–158. doi:10.1016/J.ADDR.2014.08.008.
- [3] S.B.G.B.G. Blanquer, D.W.W. Grijpma, A.A.A. Poot, Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 84 (2015) 172–187. doi:10.1016/J.ADDR.2014.10.024.
- [4] N. Henry, J. Clouet, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux, Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery systems, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 281–294. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.009.
- [5] B.R. Whatley, X. Wen, Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 32 (2012) 61–77. doi:10.1016/J.MSEC.2011.10.011.
- [6] C. Wang, W.-J.J. Wang, Y.-G.G. Yan, Y.-X.X. Xiang, J. Zhang, Z.-H.H. Tang, Z.-S.S. Jiang, MicroRNAs: New players in intervertebral disc degeneration, *Clin. Chim. Acta.* 450 (2015) 333–341. doi:10.1016/j.cca.2015.09.011.
- [7] X. Luo, B. Yang, S. Nattel, MicroRNAs and atrial fibrillation: Mechanisms and translational potential, *Nat. Rev. Cardiol.* 12 (2015) 80–90. doi:10.1038/nrcardio.2014.178.
- [8] E. Araldi, A. Chamorro-Jorganes, C. van Solingen, C. Fernández-Hernando, Y. Suárez,

- Therapeutic Potential of Modulating microRNAs in Atherosclerotic Vascular Disease., *Curr. Vasc. Pharmacol.* (2013). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23713860> (accessed December 10, 2018).
- [9] N. Henry, P. Colombier, L. Lescaudron, O. Hamel, J. Le Bideau, J. Guicheux, J. Clouet, Regenerative medicine of the intervertebral disc: from pathophysiology to clinical application., *Med. Sci. (Paris)*. 30 (2014) 1091–1100. doi:10.1051/medsci/20143012012.
 - [10] H. Tani, H. Sato, M. Torimura, Rapid monitoring of RNA degradation activity in vivo for mammalian cells, *J. Biosci. Bioeng.* 123 (2017) 523–527. doi:10.1016/J.JBIOSEC.2016.11.010.
 - [11] F. Lagarce, C. Passirani, Nucleic-Acid Delivery Using Lipid Nanocapsules., *Curr. Pharm. Biotechnol.* 17 (n.d.) 723–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27033510> (accessed October 1, 2018).
 - [12] Y.K. Sung, S.W. Kim, Recent advances in the development of gene delivery systems, *Biomater. Res.* 23 (2019). doi:10.1186/s40824-019-0156-z.
 - [13] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*., *Cell*. 75 (1993) 843–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621> (accessed December 10, 2018).
 - [14] A. Kozomara, S. Griffiths-Jones, miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) D68–D73. doi:10.1093/nar/gkt1181.
 - [15] J.O. Westholm, E.C. Lai, Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing., *Biochimie*. 93 (2011) 1897–904. doi:10.1016/j.biochi.2011.06.017.
 - [16] T.A. Nguyen, M.H. Jo, Y.-G. Choi, J. Park, S.C. Kwon, S. Hohng, V.N. Kim, J.-S. Woo, Functional Anatomy of the Human Microprocessor, *Cell*. 161 (2015) 1374–1387. doi:10.1016/J.CELL.2015.05.010.
 - [17] S.L. Romero-Cordoba, I. Salido-Guadarrama, M. Rodriguez-Dorantes, A. Hidalgo-Miranda, miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer., *Cancer Biol. Ther.* 15 (2014) 1444–55. doi:10.4161/15384047.2014.955442.
 - [18] A.A. Sarshad, A.H. Juan, A.I.C. Muler, D.G. Anastasakis, X. Wang, P. Genzor, X. Feng, P.-F. Tsai, H.-W. Sun, A.D. Haase, V. Sartorelli, M. Hafner, Argonaute-miRNA Complexes Silence Target mRNAs in the Nucleus of Mammalian Stem Cells, *Mol. Cell*. 71 (2018) 1040-1050.e8. doi:10.1016/J.MOLCEL.2018.07.020.
 - [19] P. Resnier, T. Montier, V. Mathieu, J.-P. Benoit, C. Passirani, A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer, *Biomaterials*. 34 (2013) 6429–6443. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.04.060.
 - [20] K. Raemdonck, R.E. Vandenbroucke, J. Demeester, N.N. Sanders, S.C. De Smedt, Maintaining the silence: reflections on long-term RNAi, *Drug Discov. Today*. 13 (2008) 917–931. doi:10.1016/j.drudis.2008.06.008.
 - [21] B. Yu, X. Zhao, L.J. Lee, R.J. Lee, Targeted Delivery Systems for Oligonucleotide Therapeutics, *AAPS J.* 11 (2009) 195–203. doi:10.1208/s12248-009-9096-1.
 - [22] G. Hutvagner, M.J. Simard, C.C. Mello, P.D. Zamore, Sequence-specific inhibition of small RNA function., *PLoS Biol.* 2 (2004) E98. doi:10.1371/journal.pbio.0020098.
 - [23] M.J. Marzi, F. Ghini, B. Cerruti, S. De Pretis, P. Bonetti, C. Giacomelli, M.M. Gorski, T. Kress, M. Pelizzola, H. Muller, B. Amati, F. Nicassio, Degradation dynamics of micrnas revealed by a novel pulse-chase approach, *Genome Res.* 26 (2016) 554–565. doi:10.1101/gr.198788.115.
 - [24] A. Patra, C. Richert, High fidelity base pairing at the 3'-terminus, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 12671–12681. doi:10.1021/ja9033654.
 - [25] Y. Singh, P. Murat, E. Defrancq, Recent developments in oligonucleotide conjugation., *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 2054–2070. doi:10.1039/b911431a.
 - [26] R.A. Boon, K.C. Vickers, Intercellular transport of MicroRNAs, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

- 33 (2013) 186–192. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300139.
- [27] S.W.L. Lee, C. Paoletti, M. Campisi, T. Osaki, G. Adriani, R.D. Kamm, C. Mattu, V. Chiono, MicroRNA delivery through nanoparticles, *J. Control. Release.* 313 (2019) 80–95. doi:10.1016/j.jconrel.2019.10.007.
 - [28] N.D. Sonawane, F.C. Szoka, A.S. Verkman, Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 44826–31. doi:10.1074/jbc.M308643200.
 - [29] S.C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A.P. Sandhu, B.L. Mui, C.K. Cho, D.W.Y. Sah, D. Stebbing, E.J. Crosley, E. Yaworski, I.M. Hafez, J.R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K.G. Rajeev, K.F. Wong, L.B. Jeffs, L. Nechev, M.L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M.A. Maier, M. Srinivasulu, M.J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S.A. Barros, S. De, S.K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W.L. Cantley, Y.K. Tam, M. Manoharan, M.A. Ciufolini, M.A. Tracy, A. de Fougères, I. MacLachlan, P.R. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery., *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 172–6. doi:10.1038/nbt.1602.
 - [30] J.H. Ryu, R.T. Chacko, S. Jiwanich, S. Bickerton, R.P. Babu, S. Thayumanavan, Self-cross-linked polymer nanogels: {A} versatile nanoscopic drug delivery platform, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 17227–17235. doi:10.1021/ja1069932.
 - [31] E. Kanber, H. Yamada, B. Loretz, E. Lepeltier, C.M. Lehr, Design of Polyamine-Grafted Starches for Nucleotide Analogue Delivery: In Vitro Evaluation of the Anticancer Activity, *Bioconjug. Chem.* 27 (2016) 2431–2440. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00396.
 - [32] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature.* 391 (1998) 806–811. doi:10.1038/35888.
 - [33] D. Bouard, N. Alazard-Dany, F.L. Cosset, Viral vectors: From virology to transgene expression, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 153–165. doi:10.1038/bjp.2008.349.
 - [34] S. Worgall, R.G. Crystal, Gene Therapy, in: *Princ. Tissue Eng.*, Elsevier, 2014: pp. 657–686. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00034-3.
 - [35] P. Lesbats, A.N. Engelman, P. Cherepanov, Retroviral DNA Integration, *Chem. Rev.* 116 (2016) 12730–12757. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00125.
 - [36] D. Ye, G. Wang, Y. Liu, W. Huang, M. Wu, S. Zhu, W. Jia, A.N.M. Deng, H. Liu, J. Kang, MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the P53 signaling, *Stem Cells.* 30 (2012) 1645–1654. doi:10.1002/stem.1149.
 - [37] C.J. Burrell, C.R. Howard, F.A. Murphy, Retroviruses, in: *Fenner and {White}'s {Medical} {Virology}*, Elsevier, 2017: pp. 317–344. doi:10.1016/B978-0-12-375156-0.00023-0.
 - [38] Y. Zhang, J.M. Bergelson, Adenovirus Receptors, *J. Virol.* 79 (2005) 12125–12131. doi:10.1128/jvi.79.19.12125-12131.2005.
 - [39] W.S.M. Wold, K. Toth, Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy., *Curr. Gene Ther.* 13 (2013) 421–433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24279313> (accessed October 15, 2019).
 - [40] C.S. Lee, E.S. Bishop, R. Zhang, X. Yu, E.M. Farina, S. Yan, C. Zhao, Z. Zeng, Y. Shu, X. Wu, J. Lei, Y. Li, W. Zhang, C. Yang, K. Wu, Y. Wu, S. Ho, A. Athiviraham, M.J. Lee, J.M. Wolf, R.R. Reid, T.C. He, Adenovirus-mediated gene delivery: {Potential} applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine, *Genes Dis.* 4 (2017) 43–63. doi:10.1016/j.gendis.2017.04.001.
 - [41] X.W. Wang, C. Zhang, K.C. Lee, X.J. He, Z.Q. Lu, C. Huang, Q.C. Wu, Adenovirus-mediated gene transfer of {microRNA}-21 sponge inhibits neointimal hyperplasia in rat vein grafts, *Int. J. Biol. Sci.* 13 (2017) 1309–1319. doi:10.7150/ijbs.20254.
 - [42] M.F. Naso, B. Tomkowicz, W.L. Perry, W.R. Strohl, Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy, *BioDrugs.* 31 (2017) 317–334. doi:10.1007/s40259-017-0234-5.

- [43] L. Lisowski, S.S. Tay, I.E. Alexander, Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics, *Curr. Opin. Pharmacol.* 24 (2015) 59–67. doi:10.1016/j.coph.2015.07.006.
- [44] F. Borel, C. Mueller, Design of AAV vectors for delivery of RNAi, in: *Methods Mol. Biol.*, Humana Press Inc., 2019: pp. 3–18. doi:10.1007/978-1-4939-9139-6_1.
- [45] N. Pourshafie, P.R. Lee, K.L. Chen, G.G. Harmison, L.C. Bott, K.H. Fischbeck, C. Rinaldi, Systemic delivery of {microRNA} using recombinant adeno-associated virus serotype 9 to treat neuromuscular diseases in rodents, *J. Vis. Exp.* 2018 (2018). doi:10.3791/55724.
- [46] D.H. Patel, A. Misra, Gene Delivery Using Viral Vectors, in: *Challenges Deliv. Ther. Genomics Proteomics*, Elsevier Inc., 2011: pp. 207–270. doi:10.1016/B978-0-12-384964-9.00005-0.
- [47] Q. Teng, T. Federici, N.M. Boulis, Viral Vector Axonal Uptake and Retrograde Transport: Mechanisms and Applications, in: *Gene Ther. Cent. Nerv. Syst. From Bench to Bedside*, Elsevier Inc., 2006: pp. 253–271. doi:10.1016/B978-012397632-1/50021-6.
- [48] L.I. Marquez Loza, E.C. Yuen, P.B. McCray, Lentiviral vectors for the treatment and prevention of cystic fibrosis lung disease, *Genes (Basel)*. 10 (2019). doi:10.3390/genes10030218.
- [49] M.C. Milone, U. O'Doherty, Clinical use of lentiviral vectors, *Leukemia*. 32 (2018) 1529–1541. doi:10.1038/s41375-018-0106-0.
- [50] B.S. Sun, Q.Z. Dong, Q.H. Ye, H.J. Sun, H.L. Jia, X.Q. Zhu, D.Y. Liu, J. Chen, Q. Xue, H.J. Zhou, N. Ren, L.X. Qin, Lentiviral-mediated miRNA against osteopontin suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma, *Hepatology*. 48 (2008) 1834–1842. doi:10.1002/hep.22531.
- [51] G. Romero, S.E. Moya, Synthesis of organic nanoparticles, in: *Front. Nanosci.*, Elsevier Ltd, 2012: pp. 115–141. doi:10.1016/B978-0-12-415769-9.00004-2.
- [52] Y. Li, Y. Duo, J. Bi, X. Zeng, L. Mei, S. Bao, L. He, A. Shan, Y. Zhang, X. Yu, Targeted delivery of anti-miR-155 by functionalized mesoporous silica nanoparticles for colorectal cancer therapy, *Int. J. Nanomedicine*. 13 (2018) 1241–1256. doi:10.2147/IJN.S158290.
- [53] J. Liang, X. Zhang, S. He, Y. Miao, N. Wu, J. Li, Y. Gan, Sphk2 {RNAi} nanoparticles suppress tumor growth via downregulating cancer cell derived exosomal {microRNA}, *J. Control. Release*. 286 (2018) 348–357. doi:10.1016/j.jconrel.2018.07.039.
- [54] K.T. Love, K.P. Mahon, C.G. Levins, K.A. Whitehead, W. Querbes, J.R. Dorkin, J. Qin, W. Cantley, L.L. Qin, T. Racie, M. Frank-Kamenetsky, K.N. Yip, R. Alvarez, D.W.Y.Y. Sah, A. De Fougères, K. Fitzgerald, V. Kotliansky, A. Akinc, R. Langer, D.G. Anderson, Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 1864–1869. doi:10.1073/pnas.0910603106.
- [55] X. Lin, L. Li, R. Wang, D. Wilcox, X. Zhao, J. Song, X. Huang, T.M. Hansen, P. Dande, C. Wada, R.D. Hubbard, W.M. Kohlbrenner, S.W. Fesik, Y. Shen, A robust in vivo positive-readout system for monitoring {siRNA} delivery to xenograft tumors, *RNA*. 17 (2011) 603–612. doi:10.1261/rna.2546011.
- [56] H. Xue, P. Guo, W.-C. Wen, H. Wong, Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery, *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 3140–3147. doi:10.2174/1381612821666150531164540.
- [57] Y. Yan, X.Q. Li, J.L. Duan, C.J. Bao, Y.N. Cui, Z.B. Su, J.R. Xu, Q. Luo, M. Chen, Y. Xie, W.L. Lu, Nanosized functional miRNA liposomes and application in the treatment of TNBC by silencing slug gene, *Int. J. Nanomedicine*. 14 (2019) 3645–3667. doi:10.2147/IJN.S207837.
- [58] H. Wood, {FDA} approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis, *Nat. Rev. Neurol.* 14 (2018) 570. doi:10.1038/s41582-018-0065-0.
- [59] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers (Basel)*. 3 (2011) 1377–1397. doi:10.3390/polym3031377.
- [60] K.K. Cherreddy, V.L. Payen, V. Préat, PLGA polymer: From a classic drug carrier to a novel therapeutic activity contributor, *J. Control. Release*. 289 (2018) 10–13. doi:10.1016/J.JCONREL.2018.09.017.

- [61] C. Cai, Y. Xie, L. Wu, X. Chen, H. Liu, Y. Zhou, H. Zou, D. Liu, Y. Zhao, X. Kong, P. Liu, PLGA-based dual targeted nanoparticles enhance miRNA transfection efficiency in hepatic carcinoma, *Sci. Rep.* 7 (2017). doi:10.1038/srep46250.
- [62] A. Kumawat, P. Dapse, N. Kumar, D.K. Mishra, R. Maheshwari, P. Bhattacharya, R.K. Tekade, Budding Alliance of Nanotechnology in RNA Interference Therapeutics, *Curr. Pharm. Des.* 24 (2018) 2632–2643. doi:10.2174/1381612824666180807113948.
- [63] A. Kumar, X. Zhang, X.J. Liang, Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 593–606. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.10.002.
- [64] R. Ghosh, L.C. Singh, J.M. Shohet, P.H. Gunaratne, A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells, *Biomaterials.* 34 (2013) 807–816. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.023.
- [65] S. Huang, S. Duan, J. Wang, S. Bao, X. Qiu, C. Li, Y. Liu, L. Yan, Z. Zhang, Y. Hu, Folic-Acid-Mediated Functionalized Gold Nanocages for Targeted Delivery of Anti-miR-181b in Combination of Gene Therapy and Photothermal Therapy against Hepatocellular Carcinoma, *Adv. Funct. Mater.* 26 (2016) 2532–2544. doi:10.1002/adfm.201504912.
- [66] K. Bates, K. Kostarelos, Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: Past achievements, present challenges and future goals, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 2023–2033. doi:10.1016/j.addr.2013.10.003.
- [67] H. Li, Y. Hao, N. Wang, L. Wang, S. Jia, Y. Wang, L. Yang, Y. Zhang, Z. Zhang, DOTAP functionalizing single-walled carbon nanotubes as non-viral vectors for efficient intracellular siRNA delivery, *Drug Deliv.* 23 (2016) 830–838. doi:10.3109/10717544.2014.919542.
- [68] R. Narayan, U.Y. Nayak, A.M. Raichur, S. Garg, Mesoporous silica nanoparticles: {A} comprehensive review on synthesis and recent advances, *Pharmaceutics.* 10 (2018). doi:10.3390/pharmaceutics10030118.
- [69] L. Lei, Z. Liu, P. Yuan, R. Jin, X. Wang, T. Jiang, X. Chen, Injectable colloidal hydrogel with mesoporous silica nanoparticles for sustained co-release of {microRNA}-222 and aspirin to achieve innervated bone regeneration in rat mandibular defects, *J. Mater. Chem. B.* 7 (2019) 2722–2735. doi:10.1039/c9tb00025a.
- [70] V.G. Reshma, P. V. Mohanan, Quantum dots: Applications and safety consequences, *J. Lumin.* 205 (2019) 287–298. doi:10.1016/j.jlumin.2018.09.015.
- [71] G. Liang, Y. Li, W. Feng, X. Wang, A. Jing, J. Li, K. Ma, Polyethyleneimine-coated quantum dots for miRNA delivery and its enhanced suppression in HepG2 cells, *Int. J. Nanomedicine.* 11 (2016) 6079–6088. doi:10.2147/IJN.S120828.
- [72] X. Qiu, N. Hildebrandt, Rapid and Multiplexed MicroRNA Diagnostic Assay Using Quantum Dot-Based Förster Resonance Energy Transfer, *ACS Nano.* 9 (2015) 8449–8457. doi:10.1021/acs.nano.5b03364.
- [73] C. Rogers, T. Fernandes-Alnemri, L. Mayes, D. Alnemri, G. Cingolani, E.S. Alnemri, Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death, *Nat. Commun.* 8 (2017) 14128. doi:10.1038/ncomms14128.
- [74] B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio, V. De Laurenzi, Role of apoptosis in disease., *Aging (Albany. NY).* 4 (2012) 330–349. doi:10.18632/aging.100459.
- [75] M. Ji, X. Zhang, P. Shi, J. Lu, S. Wang, Q. Chang, H. Chen, C. Wang, Downregulation of microRNA-193a-3p is involved in intervertebral disc degeneration by targeting MMP14, *J. Mol. Med.* 94 (2016) 457–468. doi:10.1007/s00109-015-1371-2.
- [76] S. Zhou, J. Jin, J. Wang, Z. Zhang, J.H. Freedman, Y. Zheng, L. Cai, miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges, *Acta Pharmacol. Sin.* 39 (2018) 1073–1084. doi:10.1038/aps.2018.30.
- [77] F. Ding, Z. Shao, L. Xiong, Cell death in intervertebral disc degeneration, *Apoptosis.* 18 (2013) 777–785. doi:10.1007/s10495-013-0839-1.

- [78] H.Q. Wang, X.D. Yu, Z.H. Liu, X. Cheng, D. Samartzis, L.T. Jia, S.X. Wu, J. Huang, J. Chen, Z.J. Luo, Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3, *J. Pathol.* 225 (2011) 232–242. doi:10.1002/path.2931.
- [79] D.-Y. ZHANG, Z.-J. WANG, Y.-B. YU, Y. ZHANG, X.-X. Zhang, Role of microRNA-210 in human intervertebral disc degeneration., *Exp. Ther. Med.* 11 (2016) 2349–2354. doi:10.3892/etm.2016.3176.
- [80] X. Cheng, L. Zhang, K. Zhang, G. Zhang, Y. Hu, X. Sun, C. Zhao, H. Li, Y.M. Li, J. Zhao, Circular RNA VMA21 protects against intervertebral disc degeneration through targeting miR-200c and X linked inhibitor-of-apoptosis protein, *Ann. Rheum. Dis.* 77 (2018) 770–779. doi:10.1136/annrheumdis-2017-212056.
- [81] P. Liu, F. Chang, T. Zhang, G. Gao, C. Yu, S.-Q. Ding, G.-L. Zuo, X.-H. Huang, Downregulation of microRNA-125a is involved in intervertebral disc degeneration by targeting pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1., *Iran. J. Basic Med. Sci.* 20 (2017) 1260–1267. doi:10.22038/IJBMS.2017.9542.
- [82] J.F. Ma, L.N. Zang, Y.M. Xi, W.J. Yang, D. Zou, MiR-125a Rs12976445 Polymorphism is Associated with the Apoptosis Status of Nucleus Pulposus Cells and the Risk of Intervertebral Disc Degeneration, *Cell. Physiol. Biochem.* 38 (2016) 295–305. doi:10.1159/000438630.
- [83] H. Chen, J. Wang, B. Hu, X. Wu, Y. Chen, R. Li, W. Yuan, MiR-34a promotes Fas-mediated cartilage endplate chondrocyte apoptosis by targeting Bcl-2, *Mol. Cell. Biochem.* 406 (2015) 21–30. doi:10.1007/s11010-015-2420-4.
- [84] Y. Yu, X. Zhang, Z. Li, L. Kong, Y. Huang, LncRNA HOTAIR suppresses TNF- α induced apoptosis of nucleus pulposus cells by regulating miR-34a/Bcl-2 axis, *Biomed. Pharmacother.* 107 (2018) 729–737. doi:10.1016/j.biopha.2018.08.033.
- [85] W. Wang, J. Wang, J. Zhang, W. Taq, Z. Zhang, {miR}-222 induces apoptosis in human intervertebral disc nucleus pulposus cells by targeting {Bcl}-2., *Mol. Med. Rep.* (2019). doi:10.3892/mmr.2019.10732.
- [86] R. Wang, B. Wen, D. Sun, miR-573 regulates cell proliferation and apoptosis by targeting Bax in nucleus pulposus cells., *Cell. Mol. Biol. Lett.* 24 (2019) 2. doi:10.1186/s11658-018-0132-y.
- [87] G. ZX, L. YC, W. ZP, Z. P, C. QH, Y. LH, W. FH, C. YJ, F. MH, C. CG, G. YC, LncRNA SNHG6 can regulate the proliferation and apoptosis of rat degenerate nucleus pulposus cells via regulating the expression of miR-101-3p, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 24 (2020). doi:10.26355/EURREV_202008_22621.
- [88] N. Tang, Y. Dong, J. Liu, H. Zhao, Silencing of Long Non-coding RNA NEAT1 Upregulates miR-195a to Attenuate Intervertebral Disk Degeneration via the BAX/BAK Pathway, *Front. Mol. Biosci.* 7 (2020). doi:10.3389/fmolb.2020.00147.
- [89] Z. Zhao, J. Zheng, Y. Ye, K. Zhao, R. Wang, R. Wang, MicroRNA-25-3p regulates human nucleus pulposus cell proliferation and apoptosis in intervertebral disc degeneration by targeting Bim, *Mol. Med. Rep.* (2020). doi:10.3892/mmr.2020.11483.
- [90] T. Wang, P. Li, X. Ma, P. Tian, C. Han, J. Zang, J. Kong, H. Yan, MicroRNA-494 inhibition protects nucleus pulposus cells from TNF- α -induced apoptosis by targeting JunD, *Biochimie.* 115 (2015) 1–7. doi:10.1016/j.biochi.2015.04.011.
- [91] G. Liu, P. Cao, H. Chen, W. Yuan, J. Wang, X. Tang, MiR-27a Regulates Apoptosis in Nucleus Pulposus Cells by Targeting PI3K, *PLoS One.* 8 (2013) e75251. doi:10.1371/journal.pone.0075251.
- [92] B. Wang, D. Wang, T. Yan, H. Yuan, MiR-138-5p promotes TNF- α -induced apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting SIRT1 through PTEN/PI3K/Akt signaling, *Exp. Cell Res.* 345 (2016) 199–205. doi:10.1016/j.yexcr.2016.05.011.
- [93] P. Cai, T. Yang, X. Jiang, M. Zheng, G. Xu, J. Xia, Role of miR-15a in intervertebral disc degeneration through targeting MAP3K9, *Biomed. Pharmacother.* 87 (2017) 568–574.

doi:10.1016/j.biopha.2016.12.128.

- [94] W. Wang, Z. Guo, S. Yang, H. Wang, W. Ding, Upregulation of miR-199 attenuates TNF- α -induced Human nucleus pulposus cell apoptosis by downregulating MAP3K5, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018). doi:10.1016/J.BBRC.2018.09.194.
- [95] Z. Sun, Y. Jian, H. Fu, B. Li, MiR-532 downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling via targeting Bcl-9 and induced human intervertebral disc nucleus pulposus cells apoptosis, *J. Pharmacol. Sci.* (2018). doi:10.1016/j.jpshs.2018.10.007.
- [96] Z. Yun, Y. Wang, W. Feng, J. Zang, D. Zhang, Y. Gao, Overexpression of microRNA-185 alleviates intervertebral disc degeneration through inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and downregulation of Galectin-3, *Mol. Pain.* 16 (2020). doi:10.1177/1744806920902559.
- [97] K. Zhao, Y. Zhang, L. Kang, Y. Song, K. Wang, S. Li, X. Wu, W. Hua, Z. Shao, S. Yang, C. Yang, Methylation of microRNA-129-5P modulates nucleus pulposus cell autophagy by targeting Beclin-1 in intervertebral disc degeneration, *Oncotarget.* 8 (2017) 86264–86276. doi:10.18632/oncotarget.21137.
- [98] B. Hai, Y. Ma, X. Pan, L. Yong, C. Liang, G. He, C. Yang, B. Zhu, X. Liu, Melatonin benefits to the growth of human annulus fibrosus cells through inhibiting {miR}-106a-5p/{ATG7} signaling pathway., *Clin. Interv. Aging.* 14 (2019) 621–630. doi:10.2147/CIA.S193765.
- [99] J. Chen, Q. Sun, G.-Z. Liu, F. Zhang, C.-Y. Liu, Q.-M. Yuan, X.-S. Di, S.-W. Long, Y.-S. Jia, Y.-J. Wang, Effect of miR-202-5p-mediated ATG7 on autophagy and apoptosis of degenerative nucleus pulposus cells., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 24 (2020) 517–525. doi:10.26355/eurrev_202001_20027.
- [100] T. Shao, Y. Hu, W. Tang, H. Shen, Z. Yu, J. Gu, The long noncoding RNA HOTAIR serves as a microRNA-34a-5p sponge to reduce nucleus pulposus cell apoptosis via a NOTCH1-mediated mechanism, *Gene.* (2019) 144029. doi:10.1016/J.GENE.2019.144029.
- [101] L. Yu, Y. Hao, C. Xu, G. Zhu, Y. Cai, LINC00969 promotes the degeneration of intervertebral disk by sponging miR-335-3p and regulating NLRP3 inflammasome activation, *IUBMB Life.* (2018). doi:10.1002/iub.1989.
- [102] J. Zhang, J. Zhang, Y. Zhang, W. Liu, W. Ni, X. Huang, J. Yuan, B. Zhao, H. Xiao, F. Xue, Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration through inhibiting pyroptosis, *J. Cell. Mol. Med.* (2020). doi:10.1111/jcmm.15784.
- [103] W.L. Zhang, Y.F. Chen, H.Z. Meng, J.J. Du, G.N. Luan, H.Q. Wang, M.W. Yang, Z.J. Luo, Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration, *J. Orthop. Res.* 35 (2017) 1323–1334. doi:10.1002/jor.23313.
- [104] W.-L.L. Zhang, Y.-F.F. Chen, H.-Z.Z. Meng, J.-J.J. Du, G.-N.N. Luan, H.-Q.Q. Wang, M.-W.W. Yang, Z.-J.J. Luo, Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration, *J. Orthop. Res.* 35 (2017) 1323–1334. doi:10.1002/jor.23313.
- [105] H. Zheng, T. Wang, X.X. Li, W. He, Z. Gong, Z. Lou, B. Wang, X.X. Li, {LncRNA} {MALAT1} exhibits positive effects on nucleus pulposus cell biology in vivo and in vitro by sponging {miR}-503, *BMC Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 23. doi:10.1186/s12860-020-00265-2.
- [106] C. Yang, Z. Shi, J. Hu, R. Wei, G. Yue, D. Zhou, {miRNA}-155 expression and role in pathogenesis in spinal tuberculosis-induced intervertebral disc destruction., *Exp. Ther. Med.* 17 (2019) 3239–3246. doi:10.3892/etm.2019.7313.
- [107] H.R. Li, Q. Cui, Z.Y. Dong, J.H. Zhang, H.Q. Li, L. Zhao, Downregulation of MIR-27b is involved in loss of Type II collagen by directly targeting matrix metalloproteinase 13 (MMP13) in human intervertebral disc degeneration, *Spine (Phila. Pa. 1976).* 41 (2016) E116–E123. doi:10.1097/BRS.0000000000001139.
- [108] W. Jing, W. Jiang, No Title, 48 (2015). doi:10.1111/cpr.12176.
- [109] C. Shi, L. Wu, W. Lin, Y. Cai, Y. Zhang, B. Hu, R. Gao, H.-J. Im, W. Yuan, X. Ye, A.J. van Wijnen,

- {MiR}-202-3p regulates interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinase 1 in human nucleus pulposus, *Gene*. 687 (2019) 156–165. doi:10.1016/J.GENE.2018.11.056.
- [110] Y. Xu, Z. Zhang, Y. Zheng, S. Feng, Dysregulated miR-133a Mediates Loss of Type II Collagen by Directly Targeting Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) in Human Intervertebral Disc Degeneration, *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 41 (2016) E717–E724. doi:10.1097/BRS.0000000000001375.
- [111] X.-W. Wang, J.-J. Liu, Q.-N. Wu, S.-F. Wu, D.-J. Hao, The in vitro and in vivo effects of microRNA-133a on intervertebral disc destruction by targeting MMP9 in spinal tuberculosis, *Life Sci*. 188 (2017) 198–205. doi:10.1016/j.lfs.2017.07.022.
- [112] J. Zhou, J. Sun, D.Z. Markova, S. Li, C.K. Kepler, J. Hong, Y. Huang, W. Chen, K. Xu, F. Wei, W. Ye, MicroRNA-145 overexpression attenuates apoptosis and increases matrix synthesis in nucleus pulposus cells, *Life Sci*. 221 (2019) 274–283. doi:10.1016/j.lfs.2019.02.041.
- [113] B. Zhang, W. Guo, C. Sun, H.-Q. Duan, B.-B. Yu, K. Mu, Y.-Y. Guan, Y. Li, S. Liu, Y. Liu, D.-X. Ban, W.-D. Ruan, X.-H. Kong, C. Xing, G.-Z. Ning, S.-Q. Feng, Dysregulated MiR-3150a-3p Promotes Lumbar Intervertebral Disc Degeneration by Targeting Aggrecan, *Cell. Physiol. Biochem*. 45 (2018) 2506–2515. doi:10.1159/000488269.
- [114] N. Yan, S. Yu, H. Zhang, T. Hou, No Title, 36 (2015). doi:10.1159/000430187.
- [115] P. Hu, B. Feng, G. Wang, B. Ning, T. Jia, Microarray based analysis of gene regulation by {microRNA} in intervertebral disc degeneration., *Mol. Med. Rep*. 12 (2015) 4925–4930. doi:10.3892/mmr.2015.4022.
- [116] A. Lu, Z. Wang, S. Wang, Role of miR-589-3p in human lumbar disc degeneration and its potential mechanism, *Exp. Ther. Med*. 15 (2017) 1616–1621. doi:10.3892/etm.2017.5593.
- [117] H. Tan, L. Zhao, R. Song, Y. Liu, L. Wang, microRNA-665 promotes the proliferation and matrix degradation of nucleus pulposus through targeting GDF5 in intervertebral disc degeneration, *J. Cell. Biochem*. 119 (2018) 1–8. doi:10.1002/jcb.26888.
- [118] Q. Zhang, Y. Weng, Y. Jiang, S. Zhao, D. Zhou, N. Xu, Overexpression of miR-140-5p inhibits lipopolysaccharide-induced human intervertebral disc inflammation and degeneration by downregulating toll-like receptor 4, *Oncol. Rep*. 40 (2018) 793–802. doi:10.3892/or.2018.6488.
- [119] X. Wang, B. Wang, M. Zou, J. Li, G. Lü, Q. Zhang, F. Liu, C. Lu, CircSEMA4B targets miR-431 modulating IL-1 β -induced degradative changes in nucleus pulposus cells in intervertebral disc degeneration via Wnt pathway, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis*. 1864 (2018) 3754–3768. doi:10.1016/j.bbdis.2018.08.033.
- [120] W. Liu, P. Xia, J. Feng, L. Kang, M. Huang, K. Wang, Y. Song, S. Li, X. Wu, S. Yang, C. Yang, MicroRNA-132 upregulation promotes matrix degradation in intervertebral disc degeneration, *Exp. Cell Res*. 359 (2017) 39–49. doi:10.1016/j.yexcr.2017.08.011.
- [121] C. Qin, Y. Lv, H. Zhao, B. Yang, P. Zhang, MicroRNA-149 Suppresses Inflammation in Nucleus Pulposus Cells of Intervertebral Discs by Regulating MyD88., *Med. Sci. Monit*. 25 (2019) 4892–4900. doi:10.12659/MSM.915858.
- [122] S.-X. Gu, X. Li, J.L. Hamilton, A. Chee, R. Kc, D. Chen, H.S. An, J.-S. Kim, C. Oh, Y.-Z. Ma, A.J. van Wijnen, H.-J. Im, MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc, *Gene*. 555 (2015) 80–87. doi:10.1016/j.gene.2014.10.024.
- [123] S. Yang, L. Li, L. Zhu, C. Zhang, Z. Li, Y. Guo, Y. Nie, Z. Luo, Aucubin inhibits IL-1 β - or TNF- α -induced extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cell through blocking the miR-140-5p/CREB1 axis, *J. Cell. Physiol*. (2019). doi:10.1002/jcp.28044.
- [124] L. Kang, C. Yang, H. Yin, K. Zhao, W. Liu, W. Hua, K. Wang, Y. Song, J. Tu, S. Li, R. Luo, Y. Zhang, MicroRNA-15b silencing inhibits IL-1 β -induced extracellular matrix degradation by targeting SMAD3 in human nucleus pulposus cells, *Biotechnol. Lett*. 39 (2017) 623–632. doi:10.1007/s10529-016-2280-3.
- [125] M.L. Ji, J. Lu, P.L. Shi, X.J. Zhang, S.Z. Wang, Q. Chang, H. Chen, C. Wang, Dysregulated miR-

- 98 Contributes to Extracellular Matrix Degradation by Targeting IL-6/STAT3 Signaling Pathway in Human Intervertebral Disc Degeneration, *J. Bone Miner. Res.* 31 (2016) 900–909. doi:10.1002/jbmr.2753.
- [126] X. Wang, G. Lv, J. Li, B. Wang, Q. Zhang, C. Lu, LncRNA-RP11-296A18.3/miR-138/HIF1A Pathway Regulates the Proliferation ECM Synthesis of Human Nucleus Pulposus Cells (HNPCs), *J. Cell. Biochem.* 118 (2017) 4862–4871. doi:10.1002/jcb.26166.
- [127] J. Sun, J. Hong, S. Sun, X. Wang, Y. Peng, J. Zhou, Y. Huang, S. Li, W. Chen, C. Li, K. Xu, W. Ye, Transcription factor 7-like 2 controls matrix degradation through nuclear factor κ B signaling and is repressed by {microRNA}-155 in nucleus pulposus cells, *Biomed. Pharmacother.* 108 (2018) 646–655. doi:10.1016/J.BIOPHA.2018.09.076.
- [128] J. Lv, S. Li, T. Wan, Y. Yang, Y. Cheng, R. Xue, Inhibition of microRNA-30d attenuates the apoptosis and extracellular matrix degradation of degenerative human nucleus pulposus cells by up-regulating SOX9, *Chem. Biol. Interact.* 296 (2018) 89–97. doi:10.1016/J.CBI.2018.09.010.
- [129] Lili, L. Zhang, Y. Zhang, Roles of miR-494 in intervertebral disc degeneration and the related mechanism, *World Neurosurg.* (2018). doi:10.1016/J.WNEU.2018.12.098.
- [130] J. Wang, X. Liu, B. Sun, W. Du, Y. Zheng, Y. Sun, Upregulated miR-154 promotes ECM degradation in intervertebral disc degeneration, *J. Cell. Biochem.* (2019). doi:10.1002/jcb.28471.
- [131] Q. Yang, X.-P. Guo, Y.-L. Cheng, Y. Wang, MicroRNA-143-5p targeting eEF2 gene mediates intervertebral disc degeneration through the AMPK signaling pathway, *Arthritis Res. Ther.* 21 (2019) 97. doi:10.1186/s13075-019-1863-5.
- [132] R.-S. Yang, Y.-H. Wang, C. Ding, X.-H. Su, X.-B. Gong, MiR-146 regulates the repair and regeneration of intervertebral nucleus pulposus cells via Notch1 pathway., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23 (2019) 4591–4598. doi:10.26355/eurrev_201906_18036.
- [133] D. Ye, L. Dai, Y. Yao, S. Qin, H. Xie, W. Wang, W. Liang, MIR-155 Inhibits Nucleus Pulposus Cells' Degeneration through Targeting ERK 1/2, *Dis. Markers.* 2016 (2016) 1–7. doi:10.1155/2016/6984270.
- [134] E. Tsirimonaki, C. Fedonidis, S.G. Pneumaticos, A.A. Tragas, I. Michalopoulos, D. Mangoura, PKC ϵ signalling activates ERK1/2, and regulates aggrecan, ADAMTS5, and miR377 gene expression in human nucleus pulposus cells, *PLoS One.* 8 (2013) e82045. doi:10.1371/journal.pone.0082045.
- [135] C. Wang, Z.-Z. Zhang, W. Yang, Z.-H. Ouyang, J.-B. Xue, X.-L. Li, J. Zhang, W.-K. Chen, Y.-G. Yan, W.-J. Wang, MiR-210 facilitates ECM degradation by suppressing autophagy via silencing of ATG7 in human degenerated NP cells, *Biomed. Pharmacother.* 93 (2017) 470–479. doi:10.1016/J.BIOPHA.2017.06.048.
- [136] J. Liu, J. Yu, W. Jiang, M. He, J. Zhao, Targeting of CDKN 1B by miR-222-3p may contribute to the development of intervertebral disc degeneration, *FEBS Open Bio.* 9 (2019) 728–735. doi:10.1002/2211-5463.12609.
- [137] M.-H. Liu, C. Sun, Y. Yao, X. Fan, H. Liu, Y.-H. Cui, X.-W. Bian, B. Huang, Y. Zhou, Matrix stiffness promotes cartilage endplate chondrocyte calcification in disc degeneration via miR-20a targeting ANKH expression, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25401. doi:10.1038/srep25401.
- [138] X. Wang, L. Peng, X. Gong, X. Zhang, R. Sun, J. Du, LncRNA-RMRP promotes nucleus pulposus cell proliferation through regulating miR-206 expression, *J. Cell. Mol. Med.* (2018). doi:10.1111/jcmm.13817.
- [139] A.D. Gaudet, P.G. Popovich, Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord, *Exp. Neurol.* 258 (2014) 24–34. doi:10.1016/j.expneurol.2013.11.020.
- [140] X. Meng, Y. Zhu, L. Tao, S. Zhao, S. Qiu, MicroRNA-125b-1-3p mediates intervertebral disc degeneration in rats by targeting teashirt zinc finger homeobox 3., *Exp. Ther. Med.* 15 (2018) 2627–2633. doi:10.3892/etm.2018.5715.
- [141] Y. Guo, L. Tian, X. Liu, Y. He, S. Chang, Y. Shen, ERFFI1 Inhibits Proliferation and Inflammation

- of Nucleus Pulposus and is Negatively Regulated by miR-2355-5p in Intervertebral Disc Degeneration., *Spine (Phila. Pa. 1976)*. (2019). doi:10.1097/BRS.0000000000003011.
- [142] W.-J.J. Wang, W. Yang, Z.-H.H. Ouyang, J.-B.B. Xue, X.-L.L. Li, J. Zhang, W.-S.S. He, W.-K.K. Chen, Y.-G.G. Yan, C. Wang, MiR-21 promotes ECM degradation through inhibiting autophagy via the PTEN/akt/mTOR signaling pathway in human degenerated NP cells, *Biomed. Pharmacother.* 99 (2018) 725–734. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.154.
 - [143] B. Tao, J. Yi, C. Huang, W. Xu, C. Qin, L. Chen, J. Chen, Y. Gao, R. Wang, microRNA-96 regulates the proliferation of nucleus pulposus cells by targeting ARID2/AKT signaling, *Mol. Med. Rep.* 16 (2017) 7553–7560. doi:10.3892/mmr.2017.7560.
 - [144] X. Yu, Z. Li, J. Shen, W.K.K.K. Wu, J. Liang, X. Weng, G. Qiu, MicroRNA-10b promotes nucleus pulposus cell proliferation through RhoC-Akt pathway by targeting HOXD10 in intervertebral disc degeneration, *PLoS One*. 8 (2013) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0083080.
 - [145] Q. Zheng, X.-X. Li, L. Xiao, S. Shao, H. Jiang, X.-L. Zhang, L.-Y. Sun, H.-G. Xu, MicroRNA-365 functions as a mechanosensitive microRNA to inhibit end plate chondrocyte degeneration by targeting histone deacetylase 4., *Bone*. (2019) 115052. doi:10.1016/j.bone.2019.115052.
 - [146] X. Wang, M. Zou, J. Li, B. Wang, Q. Zhang, F. Liu, G. Lü, LncRNA H19 targets miR-22 to modulate H₂O₂-induced deregulation in nucleus pulposus cell senescence, proliferation, and ECM synthesis through Wnt signaling, *J. Cell. Biochem.* 119 (2018) 4990–5002. doi:10.1002/jcb.26738.
 - [147] L. Penolazzi, E. Lambertini, L.S. Bergamin, T. Roncada, D. Bonis, M. Cavallo, R. Piva, P. De Bonis, M. Cavallo, R. Piva, MicroRNA - 221 silencing attenuates the degenerated phenotype of intervertebral disc cells, *Aging (Albany. NY)*. 10 (2018) 1–15. doi:10.18632/aging.101525.
 - [148] H. Wang, P. He, H. Pan, J. long, J. Wang, Z. Li, H. Liu, W. Jiang, Z. Zheng, Circular RNA circ-4099 is induced by TNF- α and regulates ECM synthesis by blocking miR-616-5p inhibition of Sox9 in intervertebral disc degeneration, *Exp. Mol. Med.* 50 (2018) 27. doi:10.1038/s12276-018-0056-7.
 - [149] J. Sun, B. Zheng, R. Sun, Y. Meng, S. Wang, H. Yang, Y. Chen, J. Shi, Y. Guo, MiR-499a-5p suppresses apoptosis of human nucleus pulposus cells and degradation of their extracellular matrix by targeting SOX4, *Biomed. Pharmacother.* 113 (2019) 108652. doi:10.1016/j.biopha.2019.108652.
 - [150] W. Li, P. Wang, Z. Zhang, W. Wang, Y. Liu, Q. Qi, MiR-184 Regulates Proliferation in Nucleus Pulposus Cells by Targeting GAS1, *World Neurosurg.* 97 (2017) 710-715.e1. doi:10.1016/j.wneu.2016.01.024.
 - [151] Z. Cao, L. Chen, Inhibition of miR-27a suppresses the inflammatory response via the p38/MAPK pathway in intervertebral disc cells, *Exp. Ther. Med.* 14 (2017) 4572–4578. doi:10.3892/etm.2017.5053.
 - [152] C.-C. Niu, S.-S. Lin, L.-J. Yuan, M.-L. Lu, S.W.N. Ueng, C.-Y. Yang, T.-T. Tsai, P.-L. Lai, Upregulation of miR-107 expression following hyperbaric oxygen treatment suppresses HMGB1/RAGE signaling in degenerated human nucleus pulposus cells, *Arthritis Res. Ther.* 21 (2019) 42. doi:10.1186/s13075-019-1830-1.
 - [153] L. Kong, M. Sun, Z. Jiang, L. Li, B. Lu, MicroRNA-194 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6), *Med. Sci. Monit.* 24 (2018) 3056–3067. doi:10.12659/MSM.907280.
 - [154] Z. Chen, Y. Han, C. Deng, W. Chen, L. Jin, H. Chen, K. Wang, H. Shen, L. Qian, Inflammation-dependent downregulation of miR-194-5p contributes to human intervertebral disc degeneration by targeting CUL4A and CUL4B, *J. Cell. Physiol.* (2019) jcp.28595. doi:10.1002/jcp.28595.
 - [155] Z. Cai, K. Li, K. Yang, D. Luo, H. Xu, Suppression of miR-203-3p inhibits lipopolysaccharide induced human intervertebral disc inflammation and degeneration through upregulating estrogen receptor α , *Gene Ther.* (2020). doi:10.1038/s41434-019-0118-z.

- [156] H.J. Zhang, X.H. Ma, S.L. Xie, S. Iian Qin, C.Z. Liu, Z.G. Zhang, Knockdown of miR-660 protects nucleus pulposus cells from TNF- α -induced apoptosis by targeting serum amyloid A1, *J. Orthop. Surg. Res.* 15 (2020) 7. doi:10.1186/s13018-019-1538-6.
- [157] J. Zhou, A. Liang, J. Hong, J. Sun, X. Lin, Y. Peng, X. Wang, S. Sun, D. Xiao, K. Xu, W. Ye, MicroRNA-155 suppresses the catabolic effect induced by TNF- α and IL-1 β by targeting C/EBP β in rat nucleus pulposus cells, *Connect. Tissue Res.* 60 (2019) 165–177. doi:10.1080/03008207.2018.1483356.
- [158] G. Zhang, W. Zhang, Y. Hou, Y. Chen, J. Song, L. Ding, Detection of miR-29a in plasma of patients with lumbar spinal stenosis and the clinical significance, *Mol. Med. Rep.* 18 (2018) 223–229. doi:10.3892/mmr.2018.8956.
- [159] W. Dong, J. Liu, Y. Lv, F. Wang, T. Liu, S. Sun, B. Liao, Z. Shu, J. Qian, miR-640 aggravates intervertebral disc degeneration via NF- κ B and WNT signalling pathway, *Cell Prolif.* (2019) e12664. doi:10.1111/cpr.12664.
- [160] G. Li, X. Tang, H. Chen, W. Sun, F. Yuan, miR-148a inhibits pro-inflammatory cytokines released by intervertebral disc cells by regulating the p38/MAPK pathway, *Exp. Ther. Med.* 16 (2018) 2665–2669. doi:10.3892/etm.2018.6516.
- [161] F. Lv, Y. Huang, W. Lv, L. Yang, F. Li, J. Fan, J. Sun, MicroRNA-146a Ameliorates Inflammation via TRAF6/NF- κ B Pathway in Intervertebral Disc Cells., *Med. Sci. Monit.* 23 (2017) 659–664. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28161709> (accessed October 8, 2018).
- [162] X. Chai, H. Si, J. Song, Y. Chong, J. Wang, G. Zhao, miR-486-5p Inhibits Inflammatory Response, Matrix Degradation, and Apoptosis of Nucleus Pulposus Cells Through Directly Targeting FOXO1 in Intervertebral Disc Degeneration, *Cell. Physiol. Biochem.* 52 (2019) 109–118. doi:10.33594/0000000008.
- [163] X.-B. Wang, H. Wang, H.-Q. Long, D.-Y. Li, X. Zheng, LINC00641 regulates autophagy and intervertebral disc degeneration by acting as a competitive endogenous RNA of miR-153-3p under nutrition deprivation stress, *J. Cell. Physiol.* 234 (2019) 7115–7127. doi:10.1002/jcp.27466.
- [164] P.H. Hagedorn, R. Persson, E.D. Funder, N. Albæk, S.L. Diemer, D.J. Hansen, M.R. Møller, N. Papargyri, H. Christiansen, B.R. Hansen, H.F. Hansen, M.A. Jensen, T. Koch, Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery, *Drug Discov. Today.* 23 (2018) 101–114. doi:10.1016/j.drudis.2017.09.018.
- [165] A.A. Koshkin, J. Fensholdt, H.M. Pfundheller, C. Lomholt, A simplified and efficient route to 2'-O, 4'-C-methylene-linked bicyclic ribonucleosides (locked nucleic acid)., *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8504–12. doi:10.1021/jo010732p.
- [166] U.A. Ørom, S. Kauppinen, A.H. Lund, LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function., *Gene.* 372 (2006) 137–41. doi:10.1016/j.gene.2005.12.031.
- [167] Y. Zhang, Z. Qu, S. Kim, V. Shi, B. Liao, P. Kraft, R. Bandaru, Y. Wu, L.M. Greenberger, I.D. Horak, Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid ({LNA})-based antisense oligonucleotides without transfection, *Gene Ther.* 18 (2011) 326–333. doi:10.1038/gt.2010.133.
- [168] E. Ntini, A. Marsico, Functional impacts of non-coding RNA processing on enhancer activity and target gene expression., *J. Mol. Cell Biol.* (2019). doi:10.1093/jmcb/mjz047.
- [169] D.J. Hanly, M. Esteller, M. Berdasco, Interplay between long non-coding RNAs and epigenetic machinery: Emerging targets in cancer?, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373 (2018). doi:10.1098/rstb.2017.0074.
- [170] C. Li, Z. Wang, J. Zhang, X. Zhao, P. Xu, X. Liu, M. Li, C. Lv, X. Song, Crosstalk of mRNA, miRNA, lncRNA, and circRNA and Their Regulatory Pattern in Pulmonary Fibrosis., *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 18 (2019) 204–218. doi:10.1016/j.omtn.2019.08.018.
- [171] R. Li, L. Fang, Q. Pu, H. Bu, P. Zhu, Z. Chen, M. Yu, X. Li, T. Weiland, A. Bansal, S.Q. Ye, Y. Wei, J. Jiang, M. Wu, MEG3-4 is a miRNA decoy that regulates IL-1 abundance to initiate and then limit inflammation to prevent sepsis during lung infection, *Sci. Signal.* 11 (2018).

doi:10.1126/scisignal.aao2387.

- [172] R.O. Bak, A.K. Hollensen, J.G. Mikkelsen, Managing microRNAs with vector-encoded decoy-type inhibitors, *Mol. Ther.* 21 (2013) 1478–1485. doi:10.1038/mt.2013.113.
- [173] B.C. Bernardo, P. Gregorevic, R.H. Ritchie, J.R. McMullen, Generation of MicroRNA-34 sponges and tough decoys for the heart: Developments and challenges, *Front. Pharmacol.* 9 (2018). doi:10.3389/fphar.2018.01090.
- [174] G. Reid, S.C. Kao, N. Pavlakis, H. Brahmbhatt, J. MacDiarmid, S. Clarke, M. Boyer, N. Van Zandwijk, Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer, *Epigenomics.* 8 (2016) 1079–1085. doi:10.2217/epi-2016-0035.
- [175] N. Hosseinahli, M. Aghapour, P.H.G. Duijf, B. Baradaran, Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review., *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 5574–5588. doi:10.1002/jcp.26514.
- [176] S.J. Keam, Inotersen: First Global Approval, *Drugs.* 78 (2018) 1371–1376. doi:10.1007/s40265-018-0968-5.

4. Objectifs de la thèse

L'ensemble des données présentées ci-dessus a permis de préciser les éléments clefs de la dégénérescence discale et l'intérêt des thérapies bio-inspirées. Parmi les cibles potentielles, le rôle des miARN est aujourd'hui clairement établi. L'utilisation de ces nouvelles cibles, mais aussi comme agent thérapeutique innovant, est considérée avec intérêt par la communauté scientifique.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est intéressé, dans un premier temps, au développement de systèmes nanoparticulaires permettant la vectorisation de miARN, en particulier le miR-155 dont le rôle pléiotrophique dans la DD a été démontré. Parmi les systèmes nanoparticulaires, nous nous sommes concentrés sur le développement de nanocapsules lipidiques (LNC) capables de protéger et de délivrer un matériel génétique intact au sein de cellules d'intérêt. Le système LNC miR-155 a fait ensuite l'objet d'investigations afin de définir la capacité de protection du miARN par les LNC, son internalisation cellulaire, la biocompatibilité du système LNC miR-155 et le contrôle de l'activité biologique du miR-155. Finalement, une étude de sécurité et de faisabilité de l'injection des LNC miR-155 a été menée chez un modèle spontané de DD chez le gros animal (brebis). Les résultats de cette partie du travail a fait l'objet d'un article soumis à publication dans le International Journal of Pharmaceutics (IJP).

Dans un second temps, au regard de l'environnement discal particulier, la possibilité de fonctionnaliser la surface des LNC avec un peptide a été étudiée. Le short Link-N (sLink-N) a été identifié comme un candidat d'intérêt au regard de ses propriétés pro-anaboliques et d'interaction avec les membranes cellulaires des cellules du NP. Ainsi, la fonctionnalisation en surface des LNC chargées en miR-155 avec le sLink-N a été étudiée. L'analyse des propriétés d'internalisation des LNC miR-155 décorées, leur biocompatibilité vis à vis des cellules du NP et l'activité biologique *in vitro* ont été déterminées.

L'ensemble de ce travail de thèse s'inscrit ainsi dans le développement d'approches innovantes de médecine régénératrice du DIV.

PARTIE II :

**CONTRIBUTIONS AU DÉVELOPPEMENT
D'UNE STRATÉGIE DE MÉDECINE
RÉGÉNÉRATRICE DU DISQUE
INTERVERTÉBRAL BASÉE SUR L'EFFET
THERAPEUTIQUE DES miARN**

I. Contexte

Dans le domaine de la médecine régénératrice du DIV, les stratégies de biothérapie représentent des approches prometteuses du fait des connaissances obtenues ces dernières années autour de la physiopathologie discale et des processus de DD. Ainsi, l'addition ou l'inhibition de facteurs impliqués dans le processus de DD pour stimuler les cellules résidentes du NP apparaît comme une technique prometteuse afin de rétablir l'homéostasie discale, limiter la dégénérescence discale et ainsi prévenir l'apparition de douleurs lombaires (Henry *et al.*, 2018b). La découverte récente de l'implication des miARN dans le processus de DD représente une nouvelle opportunité quant à leur utilisation comme nouvel agent thérapeutique. L'action de ces agents thérapeutiques est encore peu étudiée mais la compréhension quant à leur rôle dans le processus de DD commence à être bien établi (Jinwen Zhu *et al.*, 2019). Ainsi, différents miARN ont été décrits dans la littérature et permettent d'envisager leur utilisation pour cibler certains processus de la DD. Parmi eux, le miR-155 a été décrit comme présentant différentes actions. Il permet tout d'abord d'augmenter la synthèse de la MEC en ciblant (inhibition) directement les métalloprotéinases. Le miR-155 présente aussi un rôle anti-apoptotique en agissant sur la voie caspase3/FADD (Wang *et al.*, 2011a), ainsi qu'un rôle anti-inflammatoire en ciblant le complexe CEBP conduisant à une réduction de l'effet de l'IL-6 (C. Yang *et al.*, 2019b), cytokine communément décrite lors du processus de DD. Au regard du rôle pléiotrophique du miR-155 celui-ci a constitué le miARN d'intérêt pour l'ensemble des travaux menés lors de cette thèse.

Le grand défi de l'utilisation des miARN en thérapeutique est conditionné à augmenter leur durée de vie in situ (demi-vie courte du fait de l'action des endonucléases) et permettre leur internalisation cellulaire indispensable pour permettre d'assurer leur rôle thérapeutique. Afin de répondre à ce défi, différentes techniques ont été développées ces dernières années dont fait partie la vectorisation nanoparticulaire. Théoriquement, cette approche garantit une protection des miARN vis à vis des endonucléases et permet l'internalisation cellulaire du miARN. Différents systèmes de vectorisation nanoparticulaires ont ainsi été développés ces dernières années, parmi lesquels les nanoparticules lipidiques. Parmi, ces nanoparticules lipidiques les nanocapsules lipidiques (LNC) présentent l'intérêt d'encapsuler efficacement les acides nucléiques, de ne pas nécessiter de solvant dont les résidus seraient potentiellement toxiques post-formulation, de nécessiter peu d'énergie pour une formulation reproductible et dont la

transposition (scale-up) à grande échelle semble envisageable. Le laboratoire MINT d'Angers bénéficie d'une expertise reconnue dans la formulation de ces LNC (brevet US20030152635A1). Dans ce contexte, c'est tout naturellement que le laboratoire RMeS s'est rapproché du laboratoire MINT. Une collaboration transdisciplinaire afin de développer des LNC miR-155 a ainsi vu le jour avec la co-direction de cette thèse. Deux grandes étapes dans ce travail de thèse ont ainsi été définies et permis de contribuer au développement d'une stratégie de médecine régénératrice du DIV basée sur l'effet thérapeutique des miARN.

La première étape a consisté au développement de LNC chargées en miR-155 afin permettre leur délivrance au sein de cellules du NP (nucléopulpecytes). Différentes expérimentations ont ainsi été menées et ont fait l'objet d'une publication soumise au International Journal of Pharmaceutics. Le manuscrit sera présenté dans le paragraphe suivant. Brièvement, différents travaux ont été menés. Tout d'abord *in vitro* afin de : (i) formuler et caractériser les LNC ; (ii) définir la cinétique de libération du miR-155 ; (iii) définir les propriétés d'internalisation des LNC seules et chargées en miR-155 ; (iv) évaluer la biocompatibilité du système LNC-miR155 sur différents types cellulaires ; (v) définir la bioactivité du miR-155 une fois libéré au sein de la cellule cible. Ensuite *in vivo* afin d'évaluer la faisabilité et la sécurité de l'injection du système LNC-miR-155 au sein d'un modèle spontané de dégénérescence discale du DIV chez l'animal (brebis). Ces derniers travaux ont été réalisés en collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS), et en particulier le Dr Marion Fusellier.

La seconde étape a consisté à la fonctionnalisation des LNC miR-155, ceci afin de tenir compte et d'anticiper d'éventuels obstacles liés à l'environnement discal, souvent considéré comme « hostile ». En effet, comme précisé dans la partie « Généralités » du manuscrit, la MEC du NP est caractérisée par une osmolarité importante, un pH acide, une faible teneur en oxygène (hypoxie). Au regard de cet environnement, l'hypothèse d'une action limitée *in vivo* des LNC miR-155 a été faite, notamment une diminution de l'internalisation cellulaire et un besoin d'optimisation de cette internalisation du fait d'une densité cellulaire limitée au sein du NP lors de la DD. L'analyse de la littérature a permis d'identifier le short Link-N comme peptide d'intérêt. Celui-ci présent au sein de la MEC du DIV possède des propriétés anaboliques et des propriétés d'interactions avec les cellules du NP, comme évoqué précédemment dans le manuscrit. La décoration des LNC avec ce peptide est ainsi envisagée afin d'évaluer son apport

quant aux propriétés d'internalisation au sein des cellules du NP, mais également d'évaluer l'effet biologique cumulé du short Link-N et du miR-155. Ces travaux ont là aussi fait l'objet d'une collaboration pluridisciplinaire entre le laboratoire MINT, bénéficiant déjà d'une expertise en fonctionnalisation des LNC, et le laboratoire RMeS. Les résultats obtenus, non publiés, sont présentés dans le paragraphe III de cette partie.

II. Nanocapsules lipidiques pour l'administration intracellulaire d'acides nucléiques thérapeutiques : un premier pas vers la médecine régénérative du DIV ?

1. Résumé

Problématique : Le rôle des miARN a été largement décrit dans le processus de DD et permet d'envisager leur utilisation comme agent thérapeutique. Parmi les miARN d'intérêt, le miR-155 représente un candidat intéressant du fait de ses rôles pléiotrophiques. La demi-vie courte des miARN et la nécessité d'internalisation cellulaire pour garantir un effet thérapeutique conduisent à envisager leur vectorisation *via* des systèmes nanoparticulaires, tels que les nanocapsules lipidiques (LNC). Dans cette étude, des LNC chargées en miR-155 ont été formulées et caractérisées. *In vitro*, l'internalisation au sein de différents types cellulaires, la biocompatibilité du système, la bioactivité du miR-155 ont été évaluées. *In vivo*, la sécurité et la faisabilité d'injection des LNC miR-155 ont ensuite été étudiées *in vivo* sur un modèle animal ovin.

Matériels et méthodes : Les LNC ont été formulées par un procédé d'inversion de phase. Brièvement, afin d'obtenir des LNC chargés en miARN, l'eau de trempe a été remplacée par des lipoplexes contenant le miARN d'intérêt (miR-155). Après purification, les LNC chargées en miARN ont été caractérisées (taille, indice de polydispersité PDI, potentiel zêta) par diffusion dynamique de la lumière (DLS), électromobilité et par analyse du suivi individuel des nanoparticules. Ensuite, la libération dans le temps du miRNA a été étudiée par dialyse et sa protection potentielle par les LNC a été déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose. Puis, la cyto-compatibilité vis à vis de deux types cellulaires (cellules stromales mésenchymateuses

humaines (hASC) et cellules du NP de brebis (oNP) a été évaluée par mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) et par un test de viabilité cellulaire MTT. L'internalisation des LNC miR-155 a ensuite été évaluée qualitativement par imagerie confocale et quantitativement par cytométrie en flux. Enfin, une étude de sécurité et de faisabilité de l'injection a été réalisée. Un suivi sur 3 mois de brebis ayant bénéficié d'une injection intradiscale de LNC miR-155 a été effectué. Le suivi longitudinal a été réalisé par IRM et une analyse histologique a ensuite été effectuée.

Résultats : La formulation reproductible de LNC chargées en miR-155 a été obtenue. Leur caractérisation montre : un diamètre moyen de 75 nm, un PDI de 0,06 et un potentiel zêta neutre. L'efficacité d'encapsulation et la charge en miARN ont été estimées à $75,6 \pm 1,2$ % et 590 µg/g de LNC, respectivement. Le profil de libération a montré que les LNC permettaient une libération prolongée du miR-155. La protection des miARN par les LNC contre la dégradation enzymatique a été confirmée. L'internalisation cellulaire des miR-155 LNC dans les hASC et les oNP a pu être identifiée après seulement 12 h et la bioactivité intacte du miR-155 a été confirmée. Lors de l'expérimentation *in vivo*, la sécurité et la faisabilité de l'injection de LNC miR-155 ont pu être démontrées. Ainsi, 3 mois post-injection, aucun effet délétère n'est observé à l'IRM et lors de l'analyse histologique.

Conclusions : Les LNC ont montré des propriétés très prometteuses pour formuler les miARN et pour les protéger significativement de la dégradation enzymatique tout en conservant leur bioactivité. De plus, la sécurité de l'injection intradiscale a été démontrée *in vivo* sur 3 mois. Grâce à ces résultats, les LNC semblent être une stratégie adéquate pour encapsuler et délivrer les miARN pour une utilisation future en médecine régénérative du DIV. Des expériences supplémentaires seront réalisées dans le cadre d'une étude à grande échelle chez l'animal (étude préclinique sur un large groupe de moutons et essai clinique sur des patients canins) afin de compléter l'étude *in vivo* déjà effectuée et de déterminer l'efficacité biologique du miR-155 pour contrer la DD. Ces résultats permettront d'envisager l'ultime étape : l'essai clinique chez l'homme.

2. Article

Lipid nanocapsules for intracellular delivery of therapeutic nucleic acids: a first step towards IVD regenerative medicine?

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	VSI: SFNano 2021 meeting
Section/Category:	Pharmaceutical Nanotechnology
Keywords:	Intervertebral disc degeneration; lipid nanocapsules; miRNA delivery
Corresponding Author:	Elise Lepeltier MINT, UNIV Angers, INSERM, CNRS, Université Bretagne Loire Angers, FRANCE
First Author:	Brian Le Moal
Order of Authors:	Brian Le Moal Elise Lepeltier Dominique Rouleau Catherine Le Visage Jean-Pierre Benoit Catherine Passirani Jérôme Guicheux Marion Fusellier Johann Clouet
Abstract:	Approximately 40% of cases of lower back pain are caused by disc degeneration disease (DDD). Recently, the regulatory potential of RNA interference (RNAi) to inhibit gene expression by neutralizing a targeted mRNA was described. It is well established that microRNA (miRNA) dysregulation is a key player in various diseases, and its impact on DDD has recently been highlighted. RNAi (miRNA in particular) is increasingly being considered as a novel therapeutic tool. However, free miRNA is degraded rapidly in vivo, and its protection is thus a prerequisite. Nanoparticular platforms, such as lipid nanocapsules (LNC), could be specifically adapted for miRNA delivery, allowing the transfer and release of miRNA in the cell cytoplasm. The objective of the current study was to formulate and characterize miRNA-loaded LNC to establish their in vitro potential (cell internalization, bioactivity) as well as to determine the safety and feasibility of in situ intervertebral disc (IVD) injection of miRNA LNC in a healthy sheep model. Using a miRNA library, miR-155 was clearly identified as being involved in the DDD process and was selected for further assessment. miR-155-loaded LNC (miR-155 LNC) were successfully formulated using a phase inversion process, with the addition of lipoplexes in the cooling step. Following purification, miR-155 LNC were fully characterized, and the optimized formulation had an average diameter of 75 nm, a polydispersity index below 0.1, and a positive zeta potential. By fluorescence spectroscopy, an encapsulation efficiency (EE) of 75.6% and a drug loading (DL) of 0.6% were obtained, corresponding to a sufficient amount of miRNA per mL of LNC to potentially have a biological effect. The sustained release of miR-155 from LNC was demonstrated compared with free miR-155: only 22% was released after 2 h and 58% after 24 h. miR-155 protection against endonuclease degradation by LNC was confirmed by gel electrophoresis, a sine qua non condition for it to be administered in vivo. Cell viability assays were performed on human adipose stromal cells (hASCs) and ovine Nucleus pulposus cells (oNP), and a cytotoxicity of less than 30% was obtained at the considered concentrations. Additionally, miR-155 LNC cell internalization was demonstrated by flow cytometry and confocal imaging. Moreover, downregulation of total ERK1/2 in hASCs and oNP cells, after miR-155 LNC treatment, was demonstrated by Western blot and quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR), thus confirming maintenance of its bioactivity after formulation and

	internalization. Finally, the feasibility and safety of miR-155 LNC in situ injection (compared to control groups: blank LNC and sham condition) was demonstrated in healthy sheep by imaging (MRI and T2wsi measurement) and histology (Boos' scoring) analysis. T2wsi was measured, and no significant difference was observed three months after the injection between the different conditions. No histological impact was observed, with no significant difference in Boos' scoring between the different conditions. All these results suggest LNC may be a potent strategy for the encapsulation and delivery of miRNA (particularly miR-155) and can be considered as a first step towards IVD regenerative medicine.
Suggested Reviewers:	Chantal Pichon Chantal.Pichon@cnrs.fr Prof. Pichon is worldwide recognized for her expertise in gene delivery.
	Esther Potier esther.potier@cnrs.fr Dr. Potier is a specialist of the intervertebral disc and its repair by notably cell therapy and biotechnologies.
	Simona Mura simona.mura@u-psud.fr Dr. Mura is a pharmacist, specialist in nanomedicines and more particularly in biological evaluation of these nanomedicines.
	Béatrice Heurtault heurtault@bioorga.u-strasbg.fr Dr. Heurtault is a specialist of lipid nanocapsules.

Angers, the 7th of February, 2022

To the Editor-in-Chief of
International Journal of Pharmaceutics

Dear Prof. Siepmann,

Please find enclosed the manuscript entitled “**Lipid nanocapsules for the intracellular delivery of therapeutic nucleic acids: a first step towards IVD regenerative medicine?**” by Le Moal B. *et al.* for consideration by the *International Journal of Pharmaceutics*.

In this paper, miRNA loaded lipid nanocapsules (miR-155 LNC) have been successfully formulated through a classical phase inversion process. The miRNA of interest in this study is the miR-155, known to influence the inflammatory response, apoptosis and extracellular matrix regeneration in intervertebral disc degeneration. The miR-155 LNC were fully characterized in terms of physicochemical characteristics. The cytocompatibility and the cellular uptake into *Nucleus Pulposus* cells and human adipose stromal cells were investigated. Moreover, the bioactivity of miR-155 after formulation was confirmed in both cell types. Finally, the safety and feasibility of an *in situ* intervertebral disc (IVD) injection of miRNA LNC, in a sheep model, has been demonstrated.

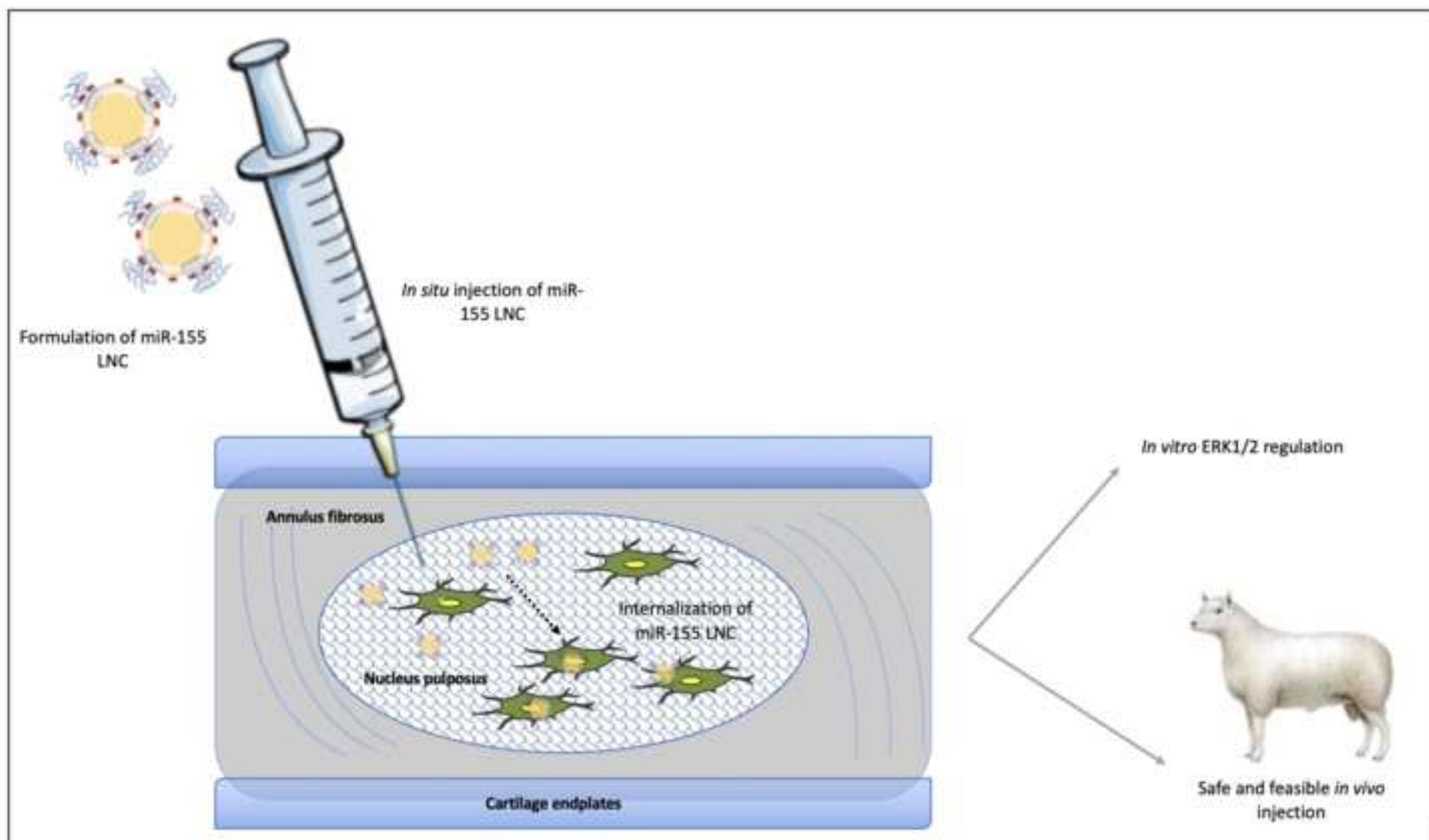
The paper should be of interest to readers in the area of nanosystems for miRNA delivery, in the context of disc degeneration disease, offering new options for regenerative medicine.

This manuscript, or its content in some other form, has not been published previously by any of the authors and/or is not under consideration for publication in another journal. In addition, all authors have seen and approved the submission of the manuscript to the *International Journal of Pharmaceutics* and they have no personal financial or non-financial conflicts of interest.

Thank you for your consideration of this manuscript.

Sincerely,

Dr. Elise Lepeltier
elise.lepeltier@univ-angers.fr
MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021
Angers, France



Lipid nanocapsules for intracellular delivery of therapeutic nucleic acids: a first step towards IVD regenerative medicine?

Brian Le Moal^{1,2}, Élise Lepeltier^{3*}, Dominique Rouleau^{1,2,4}, Catherine Le Visage^{1,2}, Jean-Pierre Benoit³, Catherine Passirani³, Jérôme Guicheux^{1,2,5}, Marion Fusellier^{1,2,4}, Johann Clouet^{1,6,7}

1 Inserm, UMRS1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton, Université de Nantes, ONIRIS, Nantes, F-44042, France

2 Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France

3 MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Angers, France

4 Department of Diagnostic Imaging, CRIP, ONIRIS, College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes, F-44307, France

5 CHU Nantes, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France

6 Université de Nantes, UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Nantes, F-44035, France

7 CHU Nantes, Pharmacie Centrale, PHU 11, Nantes, F-44093, France

*Corresponding author:

Dr. Elise Lepeltier

elise.lepeltier@univ-angers.fr

MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021

Angers, France

ABSTRACT

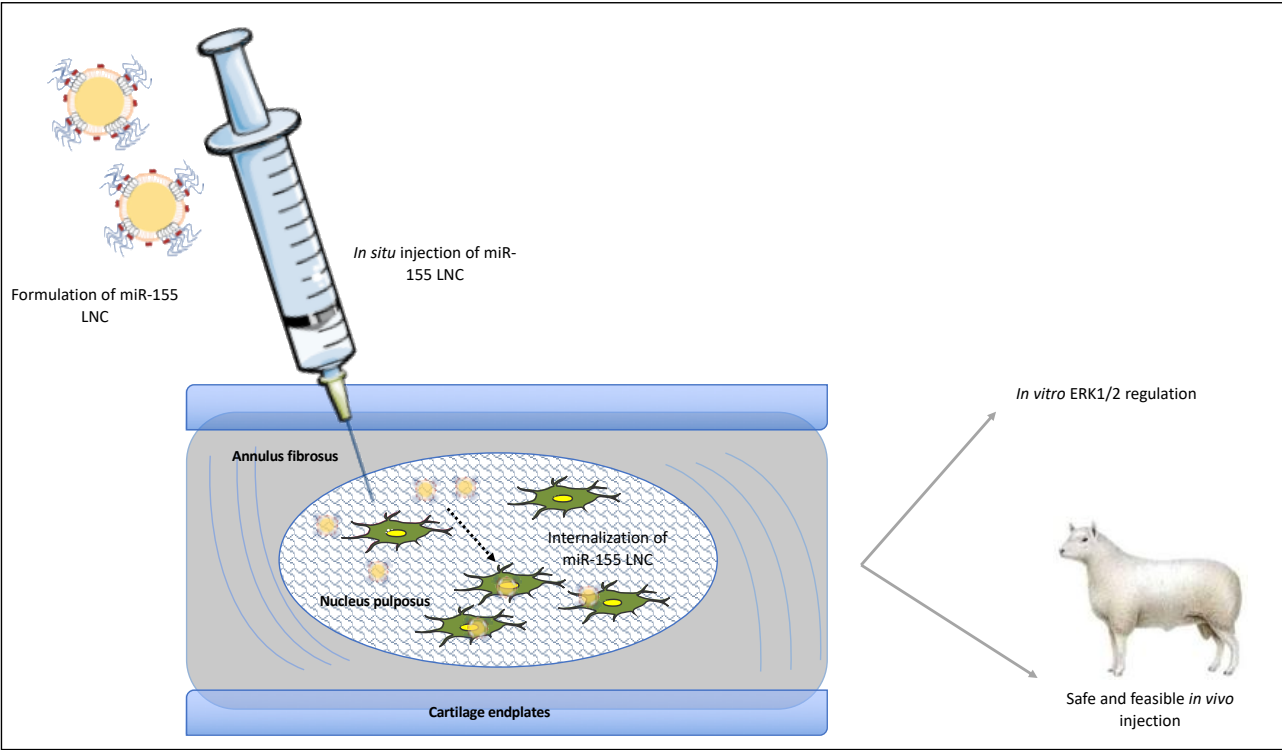
Approximately 40% of cases of lower back pain are caused by disc degeneration disease (DDD). Recently, the regulatory potential of RNA interference (RNAi) to inhibit gene expression by neutralizing a targeted mRNA was described. It is well established that microRNA (miRNA) dysregulation is a key player in various diseases, and its impact on DDD has recently been highlighted. RNAi (miRNA in particular) is increasingly being considered as a novel therapeutic tool. However, free miRNA is degraded rapidly *in vivo*, and its protection is thus a prerequisite. Nanoparticulate platforms, such as lipid nanocapsules (LNC), could be specifically adapted for miRNA delivery, allowing the transfer and release of miRNA in the cell cytoplasm. The objective of the current study was to formulate and characterize miRNA-loaded LNC to establish their *in vitro* potential (cell internalization, bioactivity) as well as to determine the safety and feasibility of *in situ* intervertebral disc (IVD) injection of miRNA LNC in a healthy sheep model. Using a miRNA library, miR-155 was clearly identified as being involved in the DDD process and was selected for further assessment. miR-155-loaded LNC (miR-155 LNC) were successfully formulated using a phase inversion process, with the addition of lipoplexes in the cooling step. Following purification, miR-155 LNC were fully characterized, and the optimized formulation had an average diameter of 75 nm, a polydispersity index below 0.1, and a positive zeta potential. By fluorescence spectroscopy, an encapsulation efficiency (EE) of 75.6% and a drug loading (DL) of 0.6% were obtained, corresponding to a sufficient amount of miRNA per mL of LNC to potentially have a biological effect. The sustained release of miR-155 from LNC was demonstrated compared with free miR-155: only 22% was released after 2 h and 58% after 24 h. miR-155 protection against endonuclease degradation by LNC was confirmed by gel electrophoresis, *a sine qua non* condition for it to be administered

in vivo. Cell viability assays were performed on human adipose stromal cells (hASCs) and ovine *Nucleus pulposus* cells (oNP), and a cytotoxicity of less than 30% was obtained at the considered concentrations. Additionally, miR-155 LNC cell internalization was demonstrated by flow cytometry and confocal imaging. Moreover, downregulation of total ERK1/2 in hASCs and oNP cells, after miR-155 LNC treatment, was demonstrated by Western blot and quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR), thus confirming maintenance of its bioactivity after formulation and internalization. Finally, the feasibility and safety of miR-155 LNC *in situ* injection (compared to control groups: blank LNC and sham condition) was demonstrated in healthy sheep by imaging (MRI and T2wsi measurement) and histology (Boos' scoring) analysis. T2wsi was measured, and no significant difference was observed three months after the injection between the different conditions. No histological impact was observed, with no significant difference in Boos' scoring between the different conditions. All these results suggest LNC may be a potent strategy for the encapsulation and delivery of miRNA (particularly miR-155) and can be considered as a first step towards IVD regenerative medicine.

KEYWORDS

Intervertebral disc degeneration, lipid nanocapsules, miRNA delivery

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Low back pain (LBP), affecting over 80% of adults during their lifetime and resulting in considerable disability and socioeconomic burdens, has been associated with intervertebral disc (IVD) degeneration [1,2]. The IVD, composed of the inner highly hydrated *Nucleus pulposus* (NP), the surrounding *Annulus fibrosus* (AF), and the cartilaginous endplates, is a structure involved in spine flexibility and trunk cinematics. Unfortunately, very early after skeletal maturity, the IVD undergoes a progressive natural aging process, potentially accelerated and amplified by the occurrence of various traumatic, environmental, and genetic factors, corresponding to Disc Degenerative Disease (DDD). DDD is characterized by an increase in catabolic (matrix metalloproteinases (MMP)) and inflammatory factors that drive accelerated extracellular matrix (ECM) degradation, dehydration, and fibrosis, ultimately leading to structural and biomechanical failure [3]. No curative treatment to halt, slow down, or reverse DDD is currently available. Current therapies only address the symptoms (pain relief medication, and surgery). In the past decade, our understanding of DDD has identified new strategies that can not only address the painful symptoms but also the degenerative cascade [4]. Among these novel contemplated therapeutic strategies, cell therapy based on the transplantation of exogenous mesenchymal stromal cells (MSC) has received particular attention and has suggested promising but still inconsistent clinical benefits [5]. In light of the limitations of MSC-based therapies, the development of alternative therapeutics could represent a genuine technological leap forward.

In this context, the recent identification of the role of microRNA (miR) in IVD degeneration allows considering miRs as new targets but also as new potential therapeutic agents [6]. Since the discovery of the first miR [7], the field of miR biology has expanded considerably. Insights into the roles of miRs in development and diseases (cancer [8], cardiovascular diseases [9], and inflammatory [10] and autoimmune diseases [11]) have made miRNAs attractive tools and targets for novel therapeutic approaches [12,13]. Of the various miRs expressed in IVD cells and dysregulated in DDD, miR-155, 141, 146a, and 377 have recently been investigated. Their dysregulation in DDD has been proposed as a potential biomarker for early diagnosis of DDD [14,15]. miR-155 in particular has been demonstrated to be a pivotal player in DDD, as a result of its regulatory role in IVD cell apoptosis, ECM synthesis, and inflammation [16–21]. These data make miR-155 one of the most promising candidates as a therapeutic tool to treat DDD.

Despite the huge progress in the fundamental understanding of the role of miRs in the pathogenesis of various diseases, the major challenge to translate their use from the bench to the bedside consists of *in situ* vectorization of these miR to allow their delivery into the target cells where they are expected to exert their therapeutic effects [22]. Direct injection of miRs could be an easy-to-use method, but the effect would typically be short-lived due to the degradation of oligonucleotides by local endonucleases. Improvement of *in vivo* miR delivery has thus been required, and several developments have demonstrated their efficacy [12]. Among these, nanoparticulate platforms are considered to be the most likely candidates because they can be a protective carrier for *in situ* vectorization, cell uptake, and intracytoplasmic release of miRs. Notably, lipid nanocapsules (LNC) have been shown to be biocompatible, to have the capacity to protect and release genetic material within the cell, and to have well-controlled physicochemical parameters [23–28]. While the therapeutic efficacy of nanoparticles to systemically deliver miRNAs has been clearly demonstrated in several applications, notably in the treatment of cancer [29,30], data regarding the feasibility of the intradiscal injection (NP transannular injection) of nanoparticles are still missing and remain a prerequisite to support the potential therapeutic applicability of miR in DDD.

In this context, our study aimed to demonstrate the feasibility of miRNA encapsulation in LNC and to establish the feasibility and the safety of the injection in healthy sheep [31]. To identify miR-155 as a therapeutic tool and target in the IVD degenerative process, as well as to determine the LNC encapsulation feasibility, miR-155 was used as a model miR in our study.

LNC loaded with miR-155 (miR-155 LNC) were formulated and fully characterized (size, polydispersity index (PDI), zeta potential, efficacy of miRNA encapsulation, miRNA release, and protection against endonucleases). Cell internalization of LNC was then demonstrated by confocal imaging and flow cytometry. Two cell types were used to demonstrate cell internalization in a human cell model (hASCs: human adipose stromal cells) and in IVD cells of interest (oNP cells: ovine *Nucleus pulposus* cells). Before undertaking *in vivo* experiments, the metabolic activity and cytotoxicity of LNC on hASCs and oNP cells were evaluated using MTT and LDH assays. Then, the bioactivity of the miRNA was assessed by Western blot and quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) to study the downregulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) after miR-155 treatment of hASCs and oNP cells. Finally, the feasibility and safety of miR-155 LNC intradiscal injection (control conditions: blank LNC and sham condition) was determined in sheep [31] by imaging (MRI) and histological analyses.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Polyoxyl-15-hydroxystearate (Kolliphor[®] HS15) was purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany). Hydrogenated phosphatidylcholine from soybeans (Lipoid S75-3[®]) was provided by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany), and caprylic/capric triglycerides (Labrafac Lipophile WL1349) were supplied by Gattefosse (Saint-Priest, France). DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane) and DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) were purchased from Avanti[®] Polar Lipids Inc. (Alabaster, Alabama, USA). A Qubit miRNA[®] Assay Kit, Alexa Fluor[®] 488 (Alexa-488), Hoechst 3342, Prolong[®], NuPAGE[®] 3-8% Tris-Acetate gels, and DID were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). The miRNA (miR-155, anti-mi-155, miRNA Control) sense sequences, as well as Alexa Fluor[®] 488 (Alexa-488) green dye covalently coupled to the miRNA, were provided by Eurogentec (Liège, Belgium). T75 flasks, DMSO, Tris-EDTA, PBS, BET, DNA loading buffer, chloroform, hyaluronidase H4272 enzyme, trypsin T9935, collagenase C2674, Tris-HCl, potassium chloride, EDTA, EGTA, dithiothreitol, β -glycerophosphate, Na₃VO₄, PMSF, NAF, penicillin, streptomycin, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), and anti-mouse secondary antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Anti-ERK1/2 and anti-rabbit secondary antibodies were provided by Cell Signaling (Danvers, MA, USA). NaCl was purchased from ProLabo (Sion, Switzerland). Water was obtained from a Milli-Q[®] system, Millipore (Darmstadt, Germany). Sephadex[®] PD10 columns were purchased from Amersham Biosciences Europe (Orsay, France). Dialysis membrane (Spectra/por[®] float-a-Lyzer[®]) was purchased from SpectrumLab (Ravensburg, Germany). Ibidi[®] μ -slide 8-wells were purchased from Ibidi[®] GmbH (Martinsried, Germany). A NucleoSpin RNAII kit was purchased from Macherey-Nagel (Hoerd, France). Affinity Script was provided by Agilent Genomics (Santa Clara, CA, USA).

LNC formulation and characterization

Lipoplex formulation

To obtain lipoplexes, 52.4 mg cationic lipid DOTAP were dissolved in 2 mL of chloroform and mixed with 57.3 mg zwitterionic lipid DOPE diluted in 2 mL of chloroform, to obtain a final concentration of cationic lipids of 30 mM (1:1 molar ratio of DOTAP/DOPE). After evaporation of the chloroform using a rotary evaporator (Buchi[®] Rotavapor Evaporator[®] R-100, Thermo Fisher Scientific), 3 mL of Milli-Q[®] water was added and left for 1 hour to rehydrate the lipid film. Lipoplexes were then obtained by mixing 750 μ g of

miRNA and 378.8 μ L of liposomes (from the 3 mL formulation), with a final molar ratio of 0.2. Different miRNA sequences were used:

miR-155 sense sequence 5'-GGGCAGUGUUUCAGGCUUATT-3' and non-coding sequence 5'-UUAGCCUGAAACACUGCCCTT-3'

miRNA Ctrl: confidential sequence provided by Eurogentec (Belgium), known to correspond to untargeted human genome

Anti-miR-155 (AntagomiR) sense sequence 5'-UGUUA AUGCUAAUAUGUAGGAG-3', and non-coding sequence 5'-CUCCUACAUAUUAGCAUUAACAT-3'

Blank LNC and miR-155/miRNA ctrl/AntagomiR LNC formulations

The blank LNC were formulated, according to patent US20100233275A1, by mixing 20.5% w/w Labrafac[®] WL 1349 triglycerides, the lipid core, with 16.9% w/w Kolliphor[®] HS 15, a hydrophilic surfactant, to allow the phase inversion, with 1.5% w/w Lipoid S75-3[®], a hydrophobic surfactant used to provide rigidity for the shell, 1.8% w/w NaCl, and 59.8% w/w Milli-Q[®] water under magnetic stirring. Three temperature cycles were performed, between 58 °C and 90 °C, leading to the oil in water (o/w) emulsion to water in oil (w/o) emulsion transition, with a phase inversion zone (PIZ) obtained at 78 °C. At this PIZ temperature, rapid cooling and dilution with 3 mL of cold Milli-Q[®] water resulted in the formation of LNC. To obtain miRNA-loaded LNC (according to patents FR 4185991, 24 Sept 2014 [32]) the Lipoid[®] was removed from the previous formulation, and 3 mL of lipoplexes were added at the PIZ temperature during the final temperature cycle. After formulation, miRNA-loaded LNC were purified using a size-exclusion chromatography Sephadex[®] PD10 column. For 0.5 mL of formulation, a Milli-Q[®] water elution volume of 20 mL was added. Forty-six fractions were obtained and characterized.

Physicochemical characterization

Size, the polydispersity index (PDI), and the zeta potential of the different fractions were measured by dynamic light scattering and electrophoretic mobility, respectively (Nano series ZS[®], Malvern Instruments SA, Worcestershire, United Kingdom), after dilution by a factor of 200 in Milli-Q[®] water (n = 6).

Encapsulation efficiency and drug loading

The amount of miR-155 obtained in the different fractions after purification using the Sephadex column[®] was quantified by fluorescence spectroscopy (Fluoromax[®], HARIBA, Tokyo, Japan) using a Qubit miRNA[®] Assay Kit with the following parameters: excitation wavelength of 545 nm and emission wavelength of 595 nm. To quantify the miRNA inside the LNC, lysis was performed by a 10-fold dilution in DMSO (n = 3).

The encapsulation efficiency (EE) and the drug loading (DL) were calculated according to the following formulas:

$$EE = \frac{(\text{mass of miRNA measured in 1 mL of LNC}) * 100}{\text{initial miRNA mass for 1 mL of LNC}}$$

$$DL(\% \frac{w}{w}) = \frac{\text{mass of miRNA measured in 1 mL of LNC} * 100}{\text{mass of all the excipients in 1 mL of LNC} + \text{mass of loaded miRNA}}$$

miRNA integrity and protection

The integrity of the miRNA after LNC formulation was assessed by 4% agarose gel electrophoresis, with the gel containing 1 $\times$ BET. Different conditions were tested: miR-155 LNC without or with DMSO 1/10 v/v dilution to break the LNC, and miRNA alone at the same concentration (10 ng/mL). These samples were loaded on the gel after being mixed with loading buffer. Migration was allowed to run for 20 min at 125 V in

1×Tris-EDTA buffer (n = 3). To check the potential protection of the miRNA by LNC, 0.5 mL human serum (pooled serum, EFS, France) was incubated with 0.5 mL of formulation at 37 °C for 4 h. The same incubation was performed using Milli-Q® water, as a control. Agarose gel electrophoresis of these samples was then performed, as previously described (n = 3).

***In vitro* miRNA release**

The release of miR-155 from LNC in PBS was investigated. Briefly, 0.5 mL of formulation (blank LNC and miRNA as controls, and miR-155 LNC) was added to a 100 kDa membrane dialysis bag and then immersed in a beaker containing 35 mL 1×PBS and stirred, at 37 °C. Three batches of 1 mL were then collected at different time points: 30 min, 1, 2, 4, 8, 24, and 48 h. The different samples obtained were then quantified using the Qubit miRNA assay® (n = 4).

Formulations for the *in vivo* experiments

Regarding *in vivo* experiment specificity, all formulations were validated according to the European Pharmacopeia recommendations (www.edqm.eu). Apyrogenicity, mycoplasma, and bacterial contamination were investigated following protocols adapted from the Nanotechnology Characterization Laboratory (<https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>).

Cell experiments

Cell isolation and culture

Human ASCs (hASCs) were obtained from consenting patients undergoing liposuction at the Clinique Breteche (Nantes, France, agreement Agency of Biomedicine PFS08-018). The cells were isolated from the lipoaspirate as previously described [33] and then cultured at 37 °C in a 5% CO₂ incubator with penicillin, streptomycin, and Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 1 g/L of L-glucose (DMEM). NP cells were isolated after harvesting of IVDs from sheep (oNP) in collaboration with the National Veterinary School of Nantes (ONIRIS). Briefly, the IVD explants were cut, under sterile conditions, to separate the AF from the NP. The small pieces obtained were rinsed three times in 2% penicillin/streptomycin (P/S) in PBS for 2 minutes. To separate cells from the extracellular matrix, 15–20 mL 0.05% hyaluronidase H4272 in PBS were added and incubated at 37 °C for 15 minutes. After two rinses with PBS, 15–20 mL 0.2% trypsin T9935 in PBS were added and incubated at 37 °C for 30 minutes. After two more rinses with PBS, 15–20 mL collagenase C2674 in complete medium were added and the mixtures were incubated at 37 °C overnight. The recovered suspension was filtered through a 70-µm-pore filter and then centrifuged for 5 minutes at 259 x g. The cells were counted and seeded in T75 flasks at a density of 5.10³ cells/cm².

hASCs and oNP cells (from P0 to P3) were grown at 37 °C and 5% CO₂ in T75 flasks at a starting density of 5.10³ cells/cm² in DMEM supplemented with 10% bovine serum albumin (BSA) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) mixture.

Cell internalization (flow cytometry and confocal imaging)

To study the cell internalization, LNC were loaded with a red fluorescent DID dye in the LNC core and an Alexa Fluor® 488 (Alexa-488) green dye was covalently coupled to the miRNA. During the formulation process, 0.1% w/w DID (0.2 mg) diluted in chloroform was added to the lipid phase.

hASC and oNP cell internalization were first characterized by flow cytometry after incubation with the different formulations (2, 4, 6, and 24 h): (i) LNC labeled with DID (blank LNC); (ii) LNC labeled with DID and loaded with miRNA control (miRNA ctrl LNC); (iii) LNC labeled with DID and loaded with miR-155 labeled with Alexa-488 (miR-155 LNC), and (iv) miR-155 labeled with Alexa-488 (miR-155 alone). The adherent hASCs or oNP cells were trypsinized, resuspended in PBS, and then analyzed using a BD LSRII

fluorescence-activated cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA). For each sample, 10 000 events were acquired and analyzed using BD FACSDiva® software. The results are expressed on histogram plots as the number of counted cells according to the intensity of the fluorescence in the Alexa-488 and the DID channels (488 and 630 nm, respectively).

For confocal imaging, the hASCs and oNP cells were seeded at 8000 cells/well (0.3 mL) on Ibidi® µ-slide 8-wells. After 24 h, the fluorescent miR-155 LNC were added (79 µg of LNC excipients in 100 µL DMEM) at a concentration corresponding to the optimal concentration of miRNA for transfection (120 ng miRNA/100 µL cell medium)[12,34]. After incubation for 8 h, the cells were washed with PBS and then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (100 µL/well) at 4 °C for 20 min. The PFA was then rinsed using PBS, and nuclear staining was performed by adding 100 µL of 3 µM Hoechst (4',6-diamidino-2-phenylindole) for 10 min in the dark, and then rinsed. All images were obtained using a Leica TCS SP8 AOBS laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with an oil objective lens, HC PL APO CS2 40× / NA 1.10, and controllable hybrid detectors (GaAsP). The images were acquired in the 1024 × 1024 pixels format, a bit depth of 8, and a scan speed of 400 Hz. For the Hoechst, Alexa-488, and DID dyes, excitation was performed using a 405-nm wavelength diode laser (50 mW), a 488-nm wavelength argon-ion laser (40 mW), and a HeNe laser at 633 nm (10 mW), respectively. The detection bandwidth of the emitted light was set between 407 and 480 nm for Hoechst, 488 and 563 nm for Alexa-488, and 635 and 750 nm for DID. Optic sections of the z-series were collected with a width of 1 µm using a “Super Z Galvo Type H internship” and were displayed as maximum z-projections using LAS X software.

Metabolic activity and cytotoxicity (MTT and LDH assays)

The metabolic activity of the hASCs and oNP cells treated by the various LNC formulations was assessed using an MTT assay (M5655, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). This assay allows determination of the cell number/cell viability as a function of mitochondrial activity in living cells. The key component is (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), abbreviated as MTT. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, resulting in purple formazan crystals that are insoluble in aqueous solutions. The absorbance of the converted dye is measured at a wavelength of 562 nm. Briefly, the hASCs were seeded in 96-well plates (5000 cells/well) and incubated for 24 h. The medium was then replaced with different concentrations of blank LNC and miR-155 LNC in cell medium (from 508 to 1997 µg/mL LNC) and incubated at 37 °C for 24 h (50 µL of supernatant were removed from each well and used for the LDH test). The absorbance of the samples was recorded at 562 nm using a microplate reader (VIKTOR®, PerkinElmer, Melville, New York, USA). Cytotoxicity was measured by LDH assay (Pierce kit reference 88953, Thermo Fisher Scientific, Saint-Aubin, France). Lactate dehydrogenase (LDH) is a cytosolic enzyme released into the cell culture medium when the plasma membrane is damaged. LDH released in the previously removed 50 µL of supernatant was quantified by a coupled enzymatic reaction in which LDH catalyzes the conversion of lactate to pyruvate via NAD⁺ reduction to NADH. Oxidation of NADH by diaphorase leads to the reduction of a tetrazolium salt (INT) to a red formazan product that can be measured spectrophotometrically at 490 nm.

In the two assays, the absorbance of cells incubated with DMEM only was considered to represent 100% cell viability (Abs_{ve}), while the cells treated with 5% Triton X-100 were considered to represent 0% cell viability (Abs_{dc}). Metabolic activity and cytotoxicity were calculated using the following equations:

$$\text{Metabolic activity (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}592\text{nm}} - \text{Abs}_{\text{ve}592\text{nm}})}{(\text{Abs}_{\text{dc}592\text{nm}} - \text{Abs}_{\text{ve}592\text{nm}})} * 100$$

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{sample490nm}} - \text{Abs}_{\text{ve490nm}})}{(\text{Abs}_{\text{ctr490nm}} - \text{Abs}_{\text{ve490nm}})} * 100$$

miR-155 bioactivity

To identify miRNA bioactivity, gene expression of total extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) was assessed using RT-qPCR. Variation of ERK1/2 gene expression was recently identified in NP cells and allowed confirmation of the bioactivity of miR-155 released from LNC [20]. Total RNA was isolated from cells using a NucleoSpin RNAII kit according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed using Affinity Script (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA). RT-qPCR was performed with a Bio-Rad CFX96 analyzer using a miR-X miRNA RT-qPCR SYBR Kit® (Takara Bio Inc, USA) for miR-155 and SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) for ERK1/2. The primer efficiency was determined using a standard curve with a 1:4 v/v dilution, and the specificity of amplification was checked using a melting curve analysis. The expression of target genes was normalized to B2M (beta-2-microglobulin) expression levels, and relative gene expression levels were calculated as previously described [35]. The sequences of the primers used in this study were (forward and reverse):

oNP cells:

ERK1/2: 5'-TGTCAACAAAGTCCGAGTCGCC-3' (forward) and 5'-TGTCTCTCGTGTCTGAAGCGCAG-3' (reverse)

B2M: 5'-GGGCTGCTGTCGCTGTCTGG-3' and 5'-TGGCTTTCCATCTCCTGGCGG-3' (reverse)

hASCs:

ERK1/2: 5'-TGGCAAGCACTACCTGGATCAG-3' (forward) and 5'-GCAGAGACTGTAGGTAGTTTCGG-3' (reverse)

B2M: 5'-CCTGGAGGCTATCCAGCGTA-3' (forward) and 5'-GGATGACGTGAGTAAACCTGAATCT-3' (reverse)

miR-155 bioactivity by Western blot

Cells were lysed for 30 min in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM potassium chloride, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 20 mM β-glycerophosphate, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, and 1 mM NaF). After centrifugation at 12 000x g for 10 min at 4 °C, the protein extracts (supernatants) were boiled in Laemmli loading buffer prior to SDS-PAGE. Electrophoresis was performed using NuPAGE® 3–8% Tris-acetate gels. Proteins were transferred to a PVDF membrane and blocking was performed with 5% non-fat dry milk/TBST (10 mM Tris, 154 mM NaCl, and 0.15% Tween-20) at room temperature for 1 h. Blots were probed with primary antibodies in 5% non-fat dry milk/TBST at 4 °C overnight, followed by secondary antibodies at room temperature for 1 h. Anti-ERK1/2 was used at a 1:2000 v/v dilution. Monoclonal anti-β-tubulin clone AC-74 was used at a 1:2000 v/v dilution as a loading control. Anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were used at 1:2000 and 1:80 000 dilutions, respectively. Signal detection was performed using ECL Western blotting detection reagent with a ChemiDoc Imaging System® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Safety and feasibility of in vivo studies

Ethical aspects and animals

All animal handling and surgical procedures were conducted according to the European Community Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (DE 86/609/CEE). The Pays de la Loire ethics

committee approved the animal study protocol (approval CEEA-PDL APAFIS 26562). Five healthy female sheep (1 to 2 years old; weight, 70 to 90 kg; GAEC HEAS farm, Ligné, France) were used for the study. All animals were followed up for 3 months by daily clinical observation, MRI examination at month (M)0-M1-M3, and histological analysis at M3.

Surgical procedure

Sheep anesthesia was induced by intravenous injection of 2–5 mg/kg of ketamine, 0.2 mg/kg of diazepam, and 1–3 mg/kg of propofol and maintained by inhalation of 1–3% isoflurane. Analgesia was obtained by intravenous injection of 0.5 mg/kg of morphine, then continuous rate infusion of 50–100 µg/kg/min of lidocaine and 0.6–1.2 µg/kg/min of ketamine. The sheep were bedded ventrally [19].

Group organization and formulation safety

Three lumbar intervertebral discs (IVD, n = 25) were randomly assigned to one of the three conditions: *in situ* injection (180 µL) of blank LNC (n = 5), miR-155 LNC (n = 9), or sham condition (control; n = 14). Injection into the NP was performed percutaneously by a transannular approach under fluoroscopic guidance using a 22 G needle, as in the conventional posterolateral procedure [36].

MRI procedure and image analysis

MRI imaging was performed pre- and post-operatively, as well as pre-euthanasia. MRI of the entire lumbar spine was performed using a 1.5 T MRI scanner (Magnetom Essenza®, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) with a standard spine coil to obtain T2-weighted images (TE: 86 ms, TR: 3000 ms; slice thickness: 3 mm) and T1-weighted images (TE: 12 ms, TR: 322 ms; slice thickness: 3 mm). The image data were analyzed with Osirix software 3.9 (Osirix Foundation, Geneva, Switzerland). Each IVD was assigned a degenerative score on T2-weighted mid-sagittal images using the Pfirrmann grading [20]. On the mid-sagittal T2-weighted images, an oval region-of-interest (ROI) was drawn around the NP and another on the spinal cord just above the IVD. The T2-weighted signal (T2_{ws}) was obtained by weighting the NP T2 signal by the spinal cord signal.

Histological analysis

At 3 months after injection, all lumbar IVDs were collected and processed for histological analysis, with fixation in 4% PFA for 5 days, followed by decalcification (Shandon TBD-2® Decalcifier, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) for 3 weeks and a post-fixation step in 4% PFA for 24 h. All IVDs were frozen and then cryosectioned (CryoStar NX70®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at -30 °C in the sagittal orientation into 5 µm sections. Following standard protocols, the sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), Masson's trichrome (MT), and Alcian blue (AB). All of the stained sections were observed using a slide scanner (NanoZoomer®, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and all of the images were analyzed with NDP.view2® software (Hamamatsu Photonics). The histological sections were analyzed using a Boos' scoring [21] specifically designed to characterize the histomorphology of the IVD and to evaluate the degenerative changes in the extracellular matrix of the NP. Briefly, this modified Boos' scoring was based on the analysis of four criteria: decrease in cell density, granular changes, tear and cleft formation, and mucus degeneration. Some parameters were ranked from 0 to 4 (granular and mucus degeneration) and others were ranked from 0 to 5 (decrease in cell density, and tear and cleft formation) depending on the intensity of the parameters tested (0, lowest; 4 or 5, highest). Three independent investigators, who had expertise in reading histological slides, performed a blind evaluation of histological samples.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using open-source R software. For the miR-155 release study, the statistical significance was calculated using the Kruskal–Wallis test. P-values of 0.05 or less were considered to be significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). For the flow cytometry results, the test results were confirmed using the post hoc Bonferroni test. Pfirrmann grade, T2wsi, and Boos' scoring were assessed for statistically significant differences using the Tukey test, after an analysis of variance test. The significance level was set at 0.05. All results are presented as means $\pm$ SD.

RESULTS and DISCUSSION

Characterization of blank and loaded LNC

The blank LNC were formulated *via* an inversion phase process. Blank LNC with a diameter of 50.3 ± 2.5 nm, a PDI of 0.03 ± 0.01 , and a neutral zeta potential of $-1.5 \text{ mV} \pm 1.3 \text{ mV}$ were obtained.

The formulation of miR-155 LNC was performed as outlined in the Materials and Methods. The Lipoid® was removed from the previous formulation, and miR-155 lipoplexes were added at the PIZ temperature during the final temperature cycle of the phase inversion process. Purification by size-exclusion chromatography was performed, and 46 fractions were obtained (**Table 1**). The presence of miR-155 in each fraction was quantified by fluorescence spectroscopy. The miRNA was mainly found in fractions 6 to 13 (96 μg miRNA for 0.5 mL of formulated LNC). Fractions 1 to 6 corresponded to the liposome-free fraction and fractions 14 to 22 to the diluted LNC formulation. Fractions 23 to 46 corresponded to impurities or aggregates in water [37]. Therefore, only fractions 6 to 13 were used in the rest of the study. The encapsulation efficiency (EE) obtained was $75.6 \pm 1.6\%$ and the drug loading (DL) was $0.6 \pm 0.01\%$, corresponding to $590.5 \pm 2.5 \mu\text{g}$ miR-155 per gram of LNC. In comparison, gold–iron oxide nanoparticles loaded with miRNA were reported to have EE of approximately 84%, with a DL of 0.02% [38]. In another study, the formulation of nanocomposite microparticles to encapsulate miR-146a resulted in an EE of 81% and a DL of 0.4% [39]. Therefore, in our study, the LNC had an EE comparable with other nanoparticle systems, with an improved DL, in accordance with previous studies describing the encapsulation of DNA in LNC [40].

Table 1: Characterization of the different fractions obtained after purification using a size-exclusion column: diameter, zeta potential, polydispersity index (PDI), amount of miRNA per fraction, $n = 3$ replicates. ND: no reliable value was obtained.

Fractions	Diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	Amount of miRNA (ng/mL)
1 to 6	494.0 ±140.8	0.6 ±0.20	0.3 ±0.1	0
6 to 13	75.0 ±2.4	0.05 ±0.01	9.6 ±1.3	96196.7 ±1789.4
14 to 16	87.5 ±2.0	0.2 ±0.11	7.6 ±1.4	381.0 ±207.2
17 to 19	104.5 ±6.9	0.2 ±0.13	0.7 ±0.4	192.2 ±87.1
20 to 22	195.0 ±58.9	0.4 ±0.21	**	64.4 ±61.6
23 to 25	866.7 ±243.2	0.9 ±0.35	**	6.5 ±9.4
26 to 28	665.3 ±361.2	1	**	18.2 ±25.6
29 to 31	477.0 ±144.4	1	**	41.1 ±47.8
32 to 34	931.7 ±313.9	1	**	12.3 ±21.2
35 to 37	1052.7 ±240.2	1	**	0
38 to 40	941.7 ±149.6	1	**	0
41 to 43	1144.7 ±626.8	1	**	0
44 to 46	1208.3 ±330.0	1	**	0

miRNA release from LNC

The miR-155 release profile from LNC after 48 h was determined in PBS and compared with two controls: miR-155 alone and blank LNC (**Figure 1**). The miR-155 alone rapidly diffused through the dialysis membrane, with $70.4 \pm 2.1\%$ of the miRNA released after 2 h. Interestingly, sustained release was observed for the miR-155-loaded LNC, with only half of the miR-155 released after 24 h. The difference between the free miR-155 and the miR-155 LNC was significant after 4 h and 24 h ($p < 0.05$). This experiment confirmed that miRNA could be slowly released from the LNC when suspended in PBS ([41]). This result has to be considered a first step in the characterization of this nanocarrier, and it is known that this release profile can be modified under real-world conditions, after *in vivo* injection, particularly in the harsh IVD environment, where hypoxia, high pressure, low pH, and low access to nutrients have been identified [42].

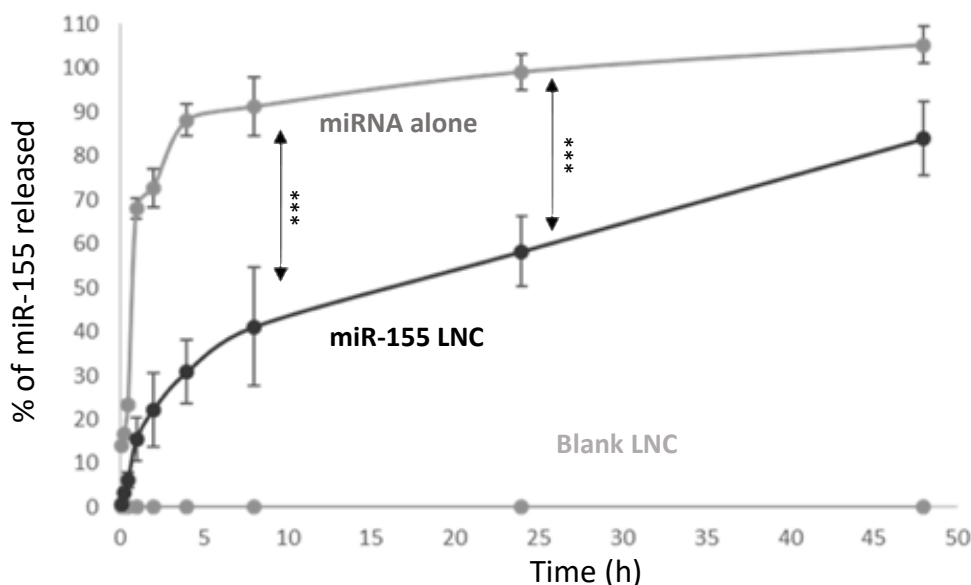


Figure 1: Percentage (%) of miR-155 released from LNC in PBS. miR-155 alone (orange), miR-155 LNC (red), and blank LNC (blue) were investigated. The data are plotted as means $\pm$ SD, in triplicate, from three independent experiments; *** $p \leq 0.01$; Kruskal–Wallis test.

miRNA integrity and protection by LNC

To study the integrity of the miRNA once formulated, gel electrophoresis was performed after incubation for 4 h in water and in human serum to study potential nuclease protection of the miR-155 by LNC. Different conditions were tested: miR-155 alone, blank LNC, and miR-155 LNC with or without lysis by DMSO (Figure 2). DMSO allowed the LNC to break down, leading to miRNA release [41].

For the free miR-155 condition, after 4 h incubation in water, a band was observed corresponding to the molecular weight of miR-155. In human serum, no miRNA was detected due to nuclease degradation. For the miR-155 LNC condition, after 4 h incubation in water, a miR-155 band was observed. This result confirms the data shown in Figure 1, with a miR-155 release from LNC of 30% after 4 h. No band was observed after incubation in serum, due to enzymatic degradation. Finally, after 4 h of incubation in water and post-treatment by DMSO, a more intense band was observed, corresponding to the total amount of miRNA released. In human serum, the same band was observed, demonstrating the potential of LNC to protect oligonucleotides from enzymatic degradation. This protection of miR-155 by LNC will be essential against DDD endonucleases [43]. These results are in accordance with previous studies that revealed these potent properties of LNC: drug protection and controlled drug release [32,40,41,44].

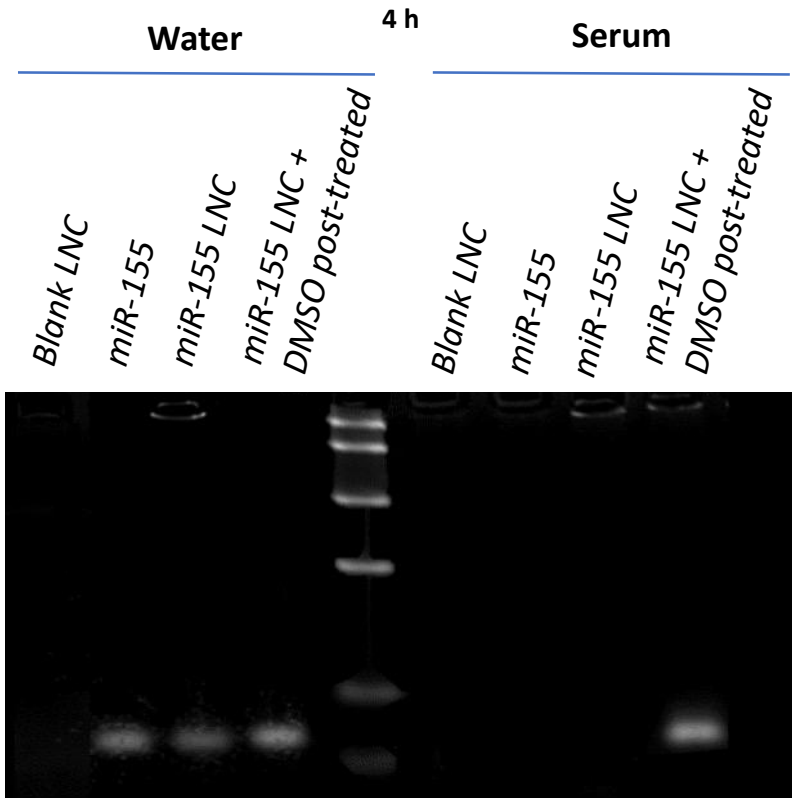


Figure 2: Evaluation of miR-155 integrity and protection by LNC, using gel electrophoresis. LNC, miR-155, and miR-155 LNC were incubated for 4 h in water or human serum. An additional condition (after incubation for 4 h) was assessed using DMSO to lyse the LNC. A miRNA band, with a molecular weight of 23 bp (15 kDa) was observed by gel electrophoresis. The molecular-weight ladder used was a low-range 1 kb ladder with bands for 1000, 500, 250, 150, 50, and 20 bp. n = 3 (a representative gel is shown).

Cell internalization studies

In order to determine the cell internalization of LNCs, two cell types were used successively: hASCs and oNP cells. hASCs represent a model suitable for verifying, as a first step, possible internalization with the aim of eventual human application. In parallel, oNP cells represent an appropriate model for considering pre-clinical studies in animals. Two methods were used to determine hASC and oNP cell internalization: flow cytometry and confocal imaging. Different conditions were tested after treatment of cells for 2, 4, 6, and 24 h with either: (i) LNC labeled with DID, a red dye (blank LNC); (ii) miR-155 labeled with a green dye Alexa-488 (miR-155 alone), (iii) LNC labeled with DID and loaded with miRNA control (miRNA ctrl LNC), and (iv) LNC labeled with DID and loaded with miR-155 and labeled with Alexa-488 (miR-155 LNC), with the same concentration of 998 μg LNC/mL for each condition (**Figure 3**).

As expected, no Alexa-488 fluorescence was observed for the blank LNC or miRNA ctrl LNC conditions, and no DID fluorescence was observed for the miRNA alone, in both cell types. A very low degree of internalization of the miR-155 alone was observed, even after 24 h, explained by the miRNA hydrophilicity, which is known to be involved in communication between cells [45]. However, a significant increase in fluorescence in the Alexa-488 and DID channels was observed over time for the miR-155 LNC condition in both cell types, from 202 ± 35 arbitrary units for cells alone to $155\,203 \pm 55\,604$ arbitrary units at 24 h in the DID channel for hASCs and 307 ± 30 arbitrary units to $125\,037 \pm 100\,004$ for oNP. Due to the total shift of fluorescence observed, it can be concluded that there was 100% cell internalization. In oNP cells, we observed a broader distribution of the fluorescence in the cells, indicating that some cells internalized less LNC than others. However, the control cells exhibited a total shift of fluorescence, thus confirming that all of the cells had internalized LNC. These results could be explained by ECM synthesized by NP cells in 2D culture before the addition of LNC, which may have impaired the interactions of LNC with oNP cells, thus resulting in limited internalization [46,47].

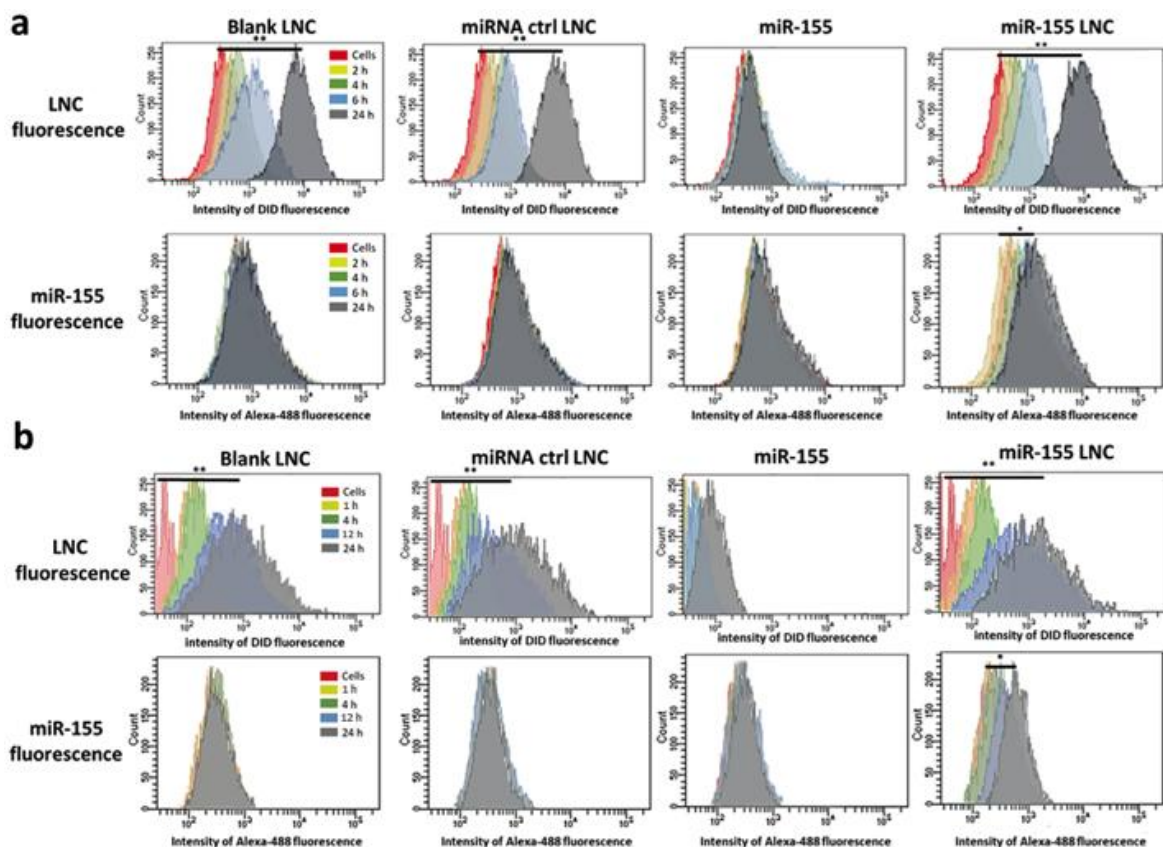


Figure 3: Flow cytometry analysis of LNC cell internalization in hASCs (a) and oNP cells (b) of blank LNC (LNC-DID), miR-155 (miRNA-Alexa-488), miRNA ctrl LNC (LNC-DID with unlabeled miRNA), and miR-155 LNC (miRNA-Alexa-488 loaded LNC-DID), analyzed at different time points (2 h/1 h in yellow, 4 h in green, 6 h/12 h in blue, 24 h in grey, and untreated cells in red), with a concentration of 998 μg of LNC/mL of formulation, according to the emission wavelengths used to excite DID (“LNC fluorescence”) or Alexa-488 (“miRNA fluorescence”). $n = 3$ replicates; median values were analyzed using the Kruskal–Wallis test and Bonferroni’s post hoc test * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

To confirm the FACS data, confocal imaging was performed under the same conditions: blank LNC, miR-155 alone, miRNA ctrl LNC, and miR-155 LNC (**Figure 4**). The red fluorescence observed was comparable between the blank LNC, the miR-155 LNC, and the miRNA ctrl LNC. The cell internalization of the LNC was not affected by the miR. No miR-155 green fluorescence was observed when the miR was not protected by the LNC. The green fluorescence from Alexa-488 covalently bound to miRNA was only observed in the miR-155 LNC condition, after 24 h. Interestingly, there was cytoplasmic localization of miR-155 after internalization in both cell types. The colocalization was confirmed by a Pearson correlation between red and green fluorescence in the three-dimensional z-stack imaging (**Figure S1, A**). The Pearson score obtained was 0.89 for hASCs and 0.79 for oNP, corresponding to a statistically strong colocalization of the green and red fluorescence for both cell types at 24 h. (**Figure S1, B**). Compared to other lipid nanoparticles for delivery of miRNA, we observed the same internalization speed, with internalization starting at 4h/6h and total internalization at 24 h [48,49]. These results are in accordance with a previous study that used lipid nanocapsules in cancer cells: LNC were fully internalized after 24 h of treatment [40,41]. These results demonstrated that LNC enable miRNA to be internalized in IVD cells of interest (NP cells) as well as in cells of human origin (hASCs), allowing the potential of our strategy of miR-155 vectorization using LNC to be assessed.

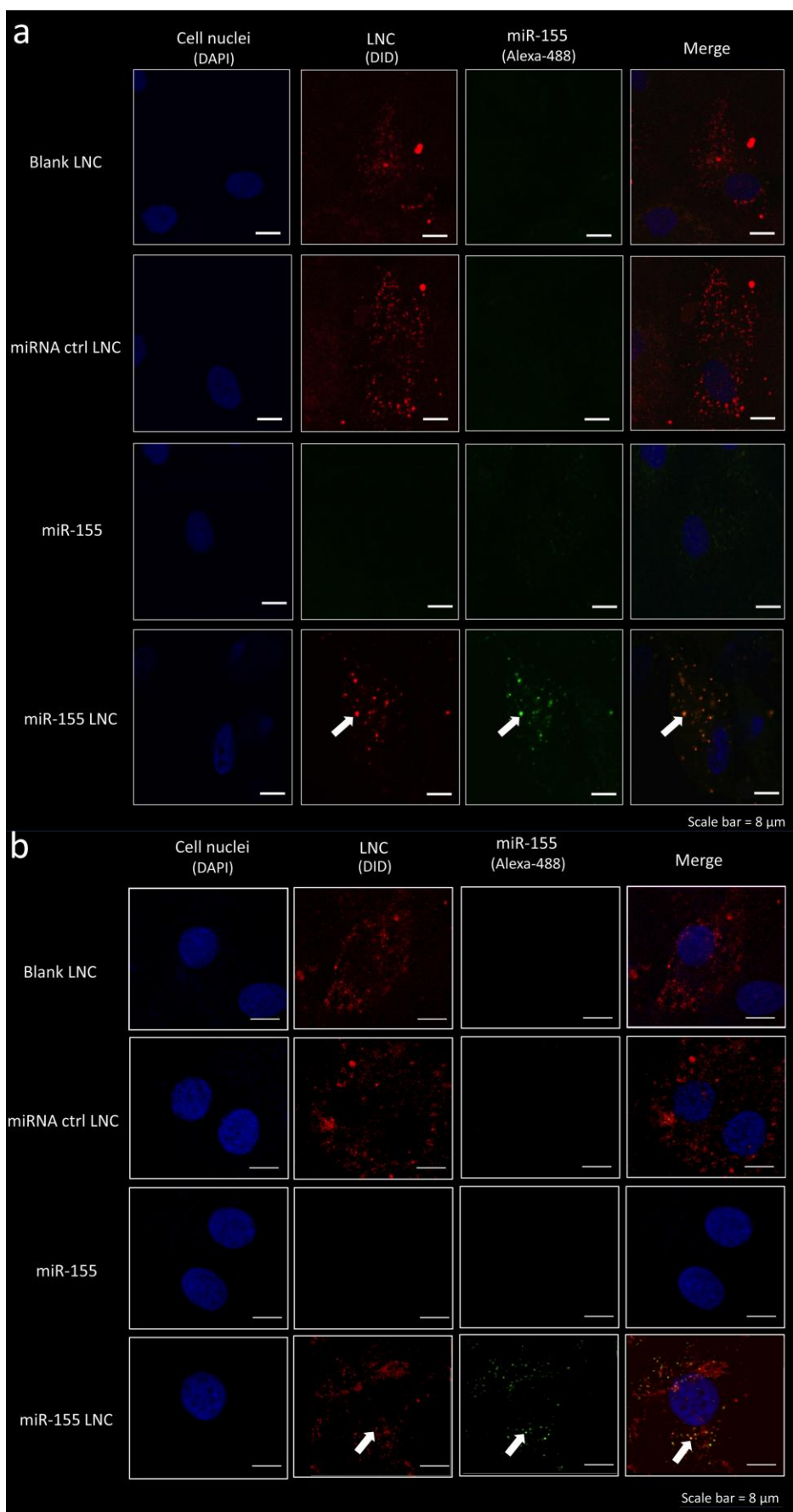


Figure 4: Confocal imaging to study cell uptake. Cell internalization in hASCs (a) and oNP (b) of miR-155, miRNA ctrl LNC, blank LNC, miR-155 LNC was assessed after incubation for 24 h with 998 μg LNC/mL. Nuclei, blue; LNC-DID, red; miRNA, green. Merged conditions, in orange, show a fusion of green (miRNA) and red (LNC) highlighted by a white arrow. Scale bar = 8 μm . n = 3 replicates (representative images shown).

Cell viability

After incubation of miR-155-loaded LNC for 24 h, the metabolic activity and the cytocompatibility were studied using MTT and LDH assays, respectively, in oNP cells and hASCs (**Figure 5**). There was a dose-dependent effect on the metabolic activity in both cell lines. In the case of hASCs, the metabolic activity decreased from $84 \pm 3\%$ to $60 \pm 7\%$ after treatment with 508 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1997 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in LNC, respectively. In the case of oNP cells, the metabolic activity decreased from $98 \pm 9\%$ to $46 \pm 4\%$ after treatment with 508 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1337 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in LNC, respectively. The metabolic activity was even more affected in oNP cells, reaching $46 \pm 4\%$ after treatment with 1997 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in LNC. No significant difference was confirmed by statistical analysis (Kruskal–Wallis test $p > 0.05$, $n = 3$) between blank LNC and miR-155 LNC for both cell models. In parallel to the metabolic activity, no cytotoxicity was confirmed using the LDH assay. In both cell lines, from 508 to 1997 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LNC, the *in vitro* cut-off defined in NF-ISO-10993-5 of 70% viability was established, and blank LNC and miR-155 LNC can be considered to be safe for medical purposes [50]. These results thus confirmed that the LNC were not cytotoxic for the studied cells, especially when the LNC concentration was below 998 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These data are in accordance with previous reports, where siRNA-loaded LNC were considered to be non-cytotoxic for non-tumor cells, and recently published cytocompatibility results on similar LNC [41,51]. These LNC possess less LDH activity compared with recently developed liposomes encapsulating a 0.2 molar ratio of miRNA [52]. These results show the cytocompatibility of the miRNA LNC and they can hence be used for the development of industrialized products for miRNA delivery. Therefore, compared with liposomes formulated by a process involving organic solvents and known to be unstable in biological fluids, LNC are more promising from an industrial perspective because they are prepared using a solvent-free, soft-energy procedure, and the excipients used are free of genetically modified organism and approved by the US Food and Drug Administration (FDA) [53]. Furthermore, the industrial scale-up of LNC was previously investigated and an easy scalability of production was noted [54]. These features indicate that miRNA LNC have ample potential as candidates for industrial production and commercialization [55].

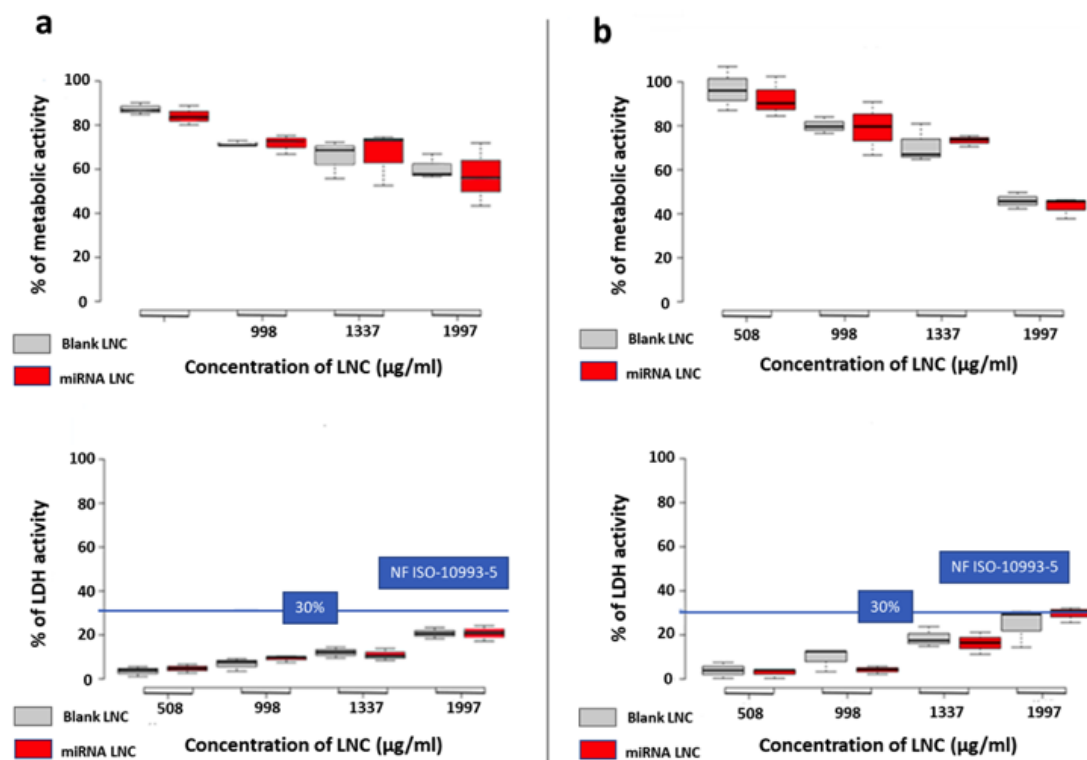


Figure 5: Cytocompatibility experiments. Metabolic activity (MTT assay) and cytotoxicity (LDH test) on hASCs (a) and oNP cells (b) after treatment for 24 h with different concentrations of blank LNC and miR-155-loaded LNC (from 508 to 1997 µg/mL in LNC). The data are plotted as means $\pm$ SD; no statistical difference was observed between blank LNC (gray) and miR-155 LNC (red) by the Kruskal–Wallis test. n = 3 replicates

miR-155 bioactivity

To confirm the bioactivity of miR-155-loaded LNC in hASCs and oNP cells (**Figure 6**), ERK1/2 transcript expression and ERK1/2 protein synthesis were investigated using RT-qPCR and Western blot, respectively. Experiments were performed after 24 h of treatment with miR-155 alone, blank LNC, miR-155 LNC, antagomiR LNC (miR-155-specific targeting), and miRNA ctrl LNC with the previously used concentration of LNC (998 µg/mL). ERK1/2 is an important protein of the MAPK pathways and is known to be involved in DDD. More specifically, in DDD, ERK1/2 is known to be upregulated, leading to cell death [56]. The results were expressed as transcript expression ($2\Delta\Delta C_t$) relative to the cell control (**Figure 6**). In both cell types, miR-155, blank LNC, and miRNA ctrl LNC conditions did not significantly modify ERK1/2 expression. Moreover, as expected, miR-155 LNC induced drastic downregulation of ERK1/2 in both cell models. Taken together, these results demonstrated that the miRNA alone was not sufficiently internalized to have an effect on ERK1/2 protein and gene expression, but when encapsulated in LNC, miR-155 downregulated ERK1/2, as previously described [57]. The results thus proved the efficacy of LNC for delivering miRNA while maintaining its bioactivity in hASCs and oNP cells.

To complete this study and to elucidate the impact of miR-155 LNC on the ERK1/2 protein level in hASCs and oNP cells, a Western blot analysis of ERK1/2 total protein synthesis after 24 h of treatment was performed (**Figure 6**). Indeed, ERK1/2 is known to be a specific target of miR-155 in IDD, leading to a reduction of total ERK1/2 protein [57]. When the cells were treated with miR-155 LNC, the protein expression of ERK1/2 was downregulated compared with its expression in the cells alone or treated by blank

LNC, miRNA LNC control, or miRNA alone. Blank LNC and the miRNA LNC control had no impact on ERK1/2 protein expression, as expected. miRNA treatment resulted in the same profile as cells alone, demonstrating that miRNA alone did not influence the protein expression of ERK1/2, due to its weak internalization. Taken together, these results demonstrated that LNC delivered miR-155 to oNP cells and hASCs while maintaining its biological activity. Here, we demonstrated the biological activity on ERK1/2 as previously published [57]. However, miR-155 is known to target additional genes and proteins in IDD. In IDD, miR-155 is known to target MMP16 and MMP13, which are involved in degradation of the extracellular matrix of the IVD [17], caspase 3, which is involved in Fas-mediated apoptosis leading to cell death of NP cells [18], and C/EBP β , which leads to reduction of inflammation by downregulation of TNF-alpha and IL-1 β [19]. Our results show that the bioactivity of miR-155 is maintained after miR-155 LNC internalization.

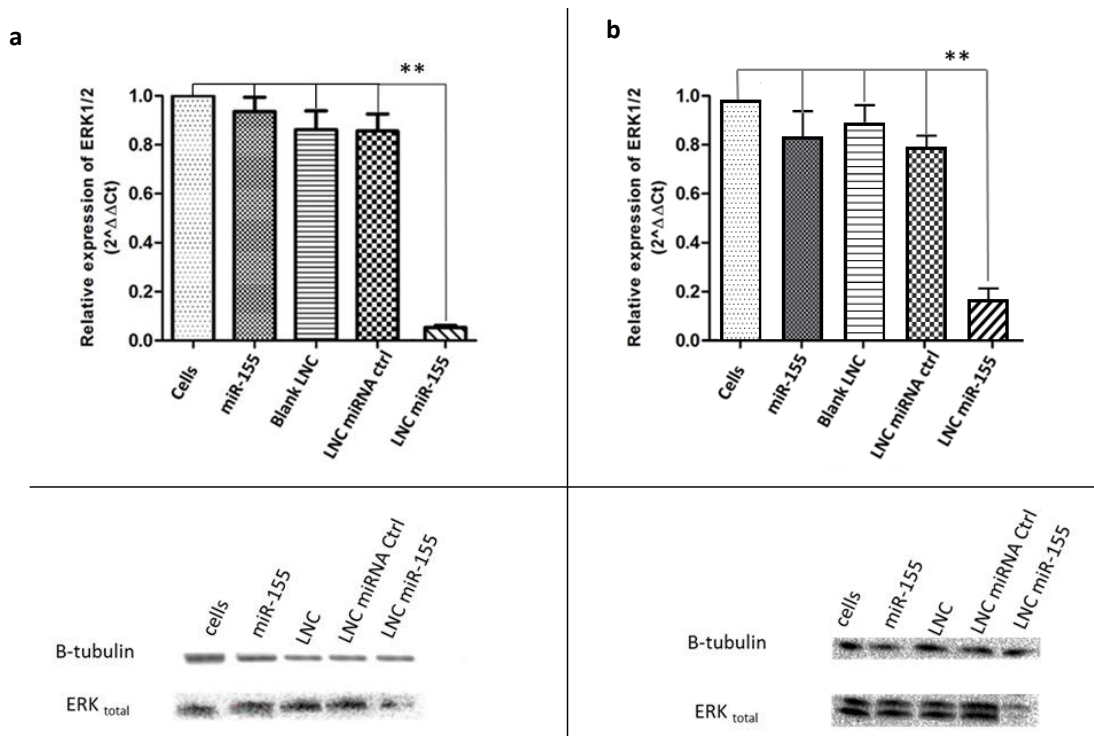


Figure 6: Bioactivity of miR-155. (a) RT-qPCR (top) and Western blot (bottom) results in hASCs (a) and oNP cells (b) obtained after 24 h of treatment with miR-155, miRNA ctrl LNC, blank LNC, antagomiR LNC (LNC with antisense miR-155), or miR-155 LNC (998 μ g/mL in LNC). The results are presented as means $\pm$ SD relative to the cell control. Statistical analysis was performed by comparison of $2\Delta\Delta C_t$; ** $p < 0.01$, using the Kruskal–Wallis test; representative results are shown.

In vivo safety and feasibility of miR-155 LNC injection

MRI and T2-weighted signal intensity (T2wsi)

In order to evaluate the safety and feasibility of miR-155 LNC injection in sheep IVD, MRI and T2wsi measurements were performed each month for three months after injection, with M0 corresponding to the MRI signal before surgery. No visual difference on MRI was observed during the time of the study or between the different conditions (blank LNC and miR-155 LNC) compared to the control group (**Figure 7a**). T2wsi was then measured to determine the hydration of the IVD (**Figure 7b**). Between M0 and M3, average

differences of $1.22 \pm 6.8\%$ for the control group, $0.77 \pm 8.9\%$ for blank LNC, and $0.48 \pm 3.5\%$ for miR-155 LNC were obtained, indicating no significant difference according to the considered month or the studied group. These results indicate there was no significant change in the IVD hydration three months after LNC injection: the hydration being usually correlated with the state of the IVD. In our case, unchanged hydration indicates no negative impact of the LNC injection [35] and confirms the safety and the feasibility of the procedure [36].

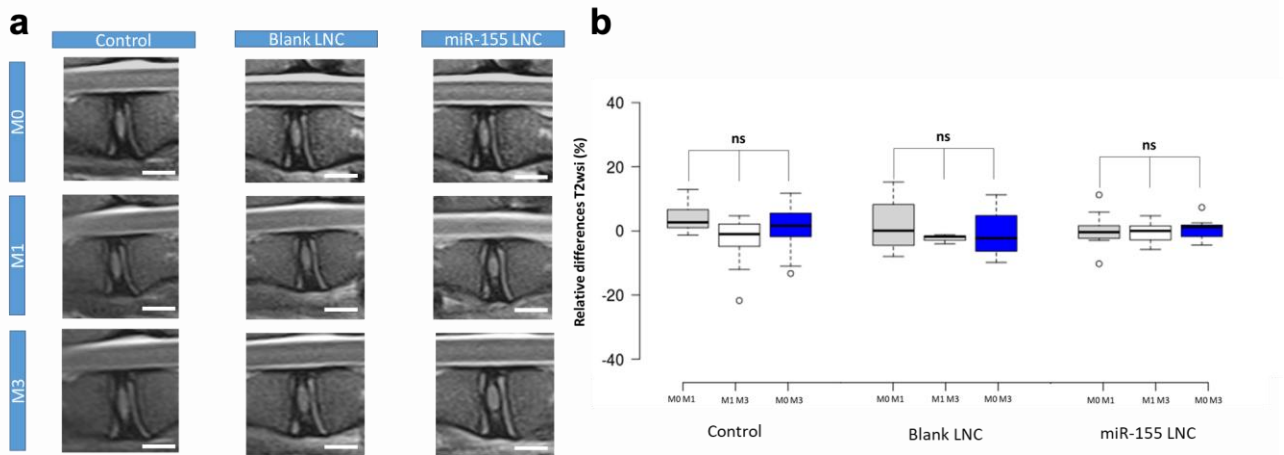


Figure 7: MRI images and analysis of lumbar spines in T2wsi. MRI scans with T2wsi signal analysis were performed once a month for 3 months (M0 corresponding to MRI before injection). A total of 25 sheep IVDs were analyzed: 14 for the control, 5 for blank LNC treatment, and 9 for miR-155 LNC. (a) Each month, a magnetic resonance imaging (MRI) scan of the spine was performed. Representative MRI scans are shown. Bar: 3 cm. (b) Representative graph of the relative difference in T2wsi signal, as a percentage, after treatment. At each time point, there was no significant difference between the treated IVDs and the control. Statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis test using R software ($p < 0.05$).

Histological staining and Boos' scoring

To complete the MRI and T2wsi measurements, sheep-treated IVDs were collected and cryosectioned, then stained with hematoxylin-eosin (HE), Alcian blue (AB), and Masson's trichrome (MT). HE staining highlights the cellularization of IVDs and the NP/AF collagen content. AB staining shows the good lamella organization of AF and the standard proteoglycan content in AF and NP. Finally, MT staining demonstrates the healthy aspects of endplates. For each condition, hydrated NP were observed, the IVDs maintaining a regular and intact AF organization and lamella alignment. Moreover, proper cellularization was observed for each condition. Finally, to further determine the impact of LNC injection in the IVD, Boos' scoring was performed on the 25 IVDs harvested from sheep. Indexed Boos' scoring was evaluated without the endplate score to focus the scoring on NP and AF aspects, for a maximum score of 23. Boos' scoring was determined by three independent readers well versed in the reading of histological samples. The Boos' scoring obtained was 2.3 for the control group, 4.3 for blank LNC, and 4.1 for miR-155 LNC. There was no significant difference between each group, indicating no significant change between the control and injected groups. This three-month follow-up study of sheep IVDs demonstrated the safety and feasibility of administering miR-155 LNC in IVD.

These *in vivo* results are particularly important before considering the implementation of veterinary (canine patients) or human clinical trials. The choice of the injection surgical route is a topic of active discussion by

the scientific community, especially the choice between trans-annular and trans-pedicular surgical routes [36,58,59]. No degeneration process of the control IVDs was observed, thus confirming no negative impact from using the trans-annular surgical route in our study. Coupled with the positive *in vitro* cytotoxicity results, the *in vivo* results support the use of miR-155 LNC in future investigations. In the future, *in vivo* investigation with evaluation of the ERK1/2 protein level and other miR-155 targets by immunohistochemistry of sheep IVDs will have to be performed. The early internalization in NP cells will be also investigated with an *ex vivo* model of IVD culture already available in our laboratory [60]. *In situ* fluoroscopy will be used to assess this cell internalization.

Moreover, the *in vivo* efficacy of miR-155 or other candidates will be an important issue to define the best target. Indeed, in DDD, numerous miRNAs are known to be upregulated or downregulated, and the next step of miRNA therapeutics approach is to combine miRNAs to impact different metabolic pathways in IVD cells [61]. miR-155 has multiple targets impacting apoptosis, inflammation, and ECM degradation in DDD and it is one of the most represented miRNA downregulated in DDD [17–19,57,61]. miR-146, which is highly downregulated in DDD, could be also a promising candidate. Combination of miR-155 and miR-146 could be particularly suitable to obtain a synergistic effect. Indeed, miR-146 targets different genes and proteins than miR-155 that are involved in proliferation, the ECM, and inflammation [62–64].

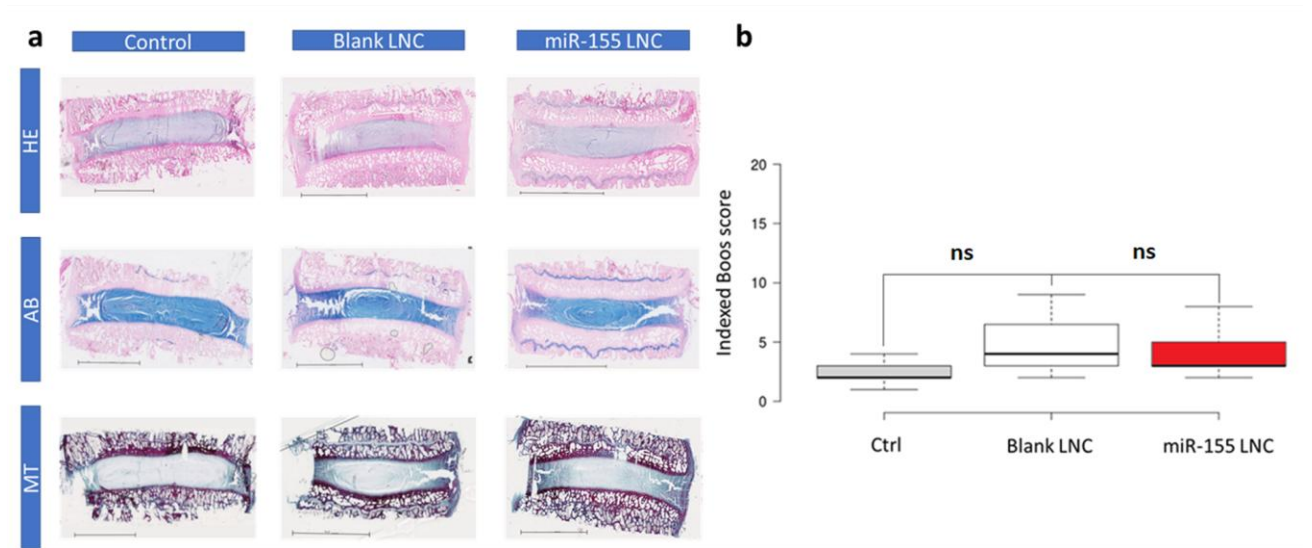


Figure 8: Histological staining and Boos' scoring of sheep IVDs, 3 months after injection. (a) Representative sections of endplates 3 months after the injection of blank LNC and miR-155 LNC (70,3 mg/mL). A total of 25 IVDs were collected 3 months after injection with miR-155 LNC or control conditions. Hematoxylin-eosin (HE), Alcian blue (AB), and Masson's trichrome (MT) staining were performed according to the Materials and Method section. No sign of degeneration was observed compared to the control for both blank and miR-155 LNC conditions. (Scale bar = 10 mm), (b) Indexed Boos' scores on NP and AF were determined by three readers on the histological staining. Blank LNC and miR-155 LNC injections had no significant impact on the Boos' scoring. Statistical analysis was performed using R software with the Kruskal-Wallis test and Bonferroni post hoc test ($p < 0.05$).

CONCLUSION

In this study, miR-155 LNC were formulated and fully characterized. Characteristics of the LNC system confirmed its potential to vectorize miRNA, with a promising encapsulation efficiency of 75.6%, a drug loading of 0.6%, and sustained release of miRNA over 48 h. Moreover, miRNA protection by LNC from nuclease degradation was demonstrated. The miR-155-LNC internalization was also very satisfactory,

showing a high level of cell internalization, allowing almost 100% transfection, with cytoplasmic localization in both ovine and human cell types. Furthermore, miRNA encapsulation in LNC did not modify its biological activity. The efficacy of LNC in delivering miRNA was demonstrated while maintaining its bioactivity in both oNP and hASCs. Additional experiments will need to be performed to determine the *in vitro* efficacy of miR-155, or other miR candidates, on cell apoptosis, cell proliferation, extracellular matrix synthesis, and inflammatory processes. Finally, the safety and feasibility of NP injection were confirmed in sheep IVDs. Taken together, these results highlight the high potential of LNC to deliver miRNA in sheep NP cells, allowing future preclinical efficacy assays, as well as in human cells (hASCs) to be considered, with the aim of future clinical transposition. Additional preclinical experiments in sheep and clinical trials in canine patients will be performed to complete the *in vivo* safety and to determine the *in vivo* efficacy of miR-155, or other miR candidates, to counteract IVD degeneration before their potential use in human clinical trials.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), ANR JCJC 2016 (STIMUDISC project ANR-16-CE18-0008), grant “Tremplin clinique vétérinaire” BIOREGATE (Région Pays de la Loire, DISCODOG project), Fondation d’entreprise Grand Ouest BPGO (grant Territoire Recherche 2020, award “Encouragement”). The authors gratefully acknowledge the technical assistance they received from the MINT and RMeS laboratories. The authors gratefully acknowledge Sophie Domingues for editing the paper.

REFERENCES

- [1] Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016., *Lancet* (London, England). 390 (2017) 1260–1344. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32130-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32130-X).
- [2] N.N. Knezevic, K.D. Candido, J.W.S. Vlaeyen, J. Van Zundert, S.P. Cohen, Low back pain, *Lancet*. 398 (2021) 78–92. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00733-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00733-9).
- [3] L. Frapin, J. Clouet, V. Delplace, M. Fusellier, J. Guicheux, C. Le Visage, Lessons learned from intervertebral disc pathophysiology to guide rational design of sequential delivery systems for therapeutic biological factors., *Advanced Drug Delivery Reviews*. 149–150 (2019) 49–71. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.08.007>.
- [4] J. Clouet, M. Fusellier, A. Camus, C. Le Visage, J. Guicheux, Intervertebral disc regeneration: From cell therapy to the development of novel bioinspired endogenous repair strategies, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 146 (2019) 306–324. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.017>.
- [5] G. Vadalà, L. Ambrosio, F. Russo, R. Papalia, V. Denaro, Stem Cells and Intervertebral Disc Regeneration Overview-What They Can and Can’t Do, *Int J Spine Surg*. 15 (2021) 40–53. <https://doi.org/10.14444/8054>.
- [6] C. Wang, W.-J. Wang, Y.-G. Yan, Y.-X. Xiang, J. Zhang, Z.-H. Tang, Z.-S. Jiang, MicroRNAs: New players in intervertebral disc degeneration., *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 450 (2015) 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.09.011>.
- [7] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*. 75 (1993) 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).
- [8] Y. Peng, C.M. Croce, The role of MicroRNAs in human cancer., *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 1 (2016) 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>.

- [9] S.S. Zhou, J.P. Jin, J.Q. Wang, Z.G. Zhang, J.H. Freedman, Y. Zheng, L. Cai, MiRNAs in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges re, *Acta Pharmacologica Sinica*. 39 (2018) 1073–1084. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>.
- [10] E. Sonkoly, A. Pivarcsi, MicroRNAs in inflammation, *International Reviews of Immunology*. 28 (2009) 535–561. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.26>.
- [11] J.Q. Chen, G. Papp, P. Szodoray, M. Zeher, The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases, *Autoimmunity Reviews*. 15 (2016) 1171–1180. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.003>.
- [12] R. Rupaimoole, F.J. Slack, MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases, *Nature Reviews Drug Discovery*. 16 (2017) 203–222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>.
- [13] D. Adams, A. Gonzalez-Duarte, W.D. O’Riordan, C.-C. Yang, M. Ueda, A. V. Kristen, I. Tournev, H.H. Schmidt, T. Coelho, J.L. Berk, K.-P. Lin, G. Vita, S. Attarian, V. Planté-Bordeneuve, M.M. Mezei, J.M. Campistol, J. Buades, T.H. Brannagan, B.J. Kim, J. Oh, Y. Parman, Y. Sekijima, P.N. Hawkins, S.D. Solomon, M. Polydefkis, P.J. Dyck, P.J. Gandhi, S. Goyal, J. Chen, A.L. Strahs, S. V. Nochur, M.T. Sweetser, P.P. Garg, A.K. Vaishnav, J.A. Gollob, O.B. Suhr, Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis, *New England Journal of Medicine*. 379 (2018) 11–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716153>.
- [14] M. Ji, H. Jiang, X. Zhang, P. Shi, C. Li, H. Wu, X. Wu, Y. Wang, C. Wang, J. Lu, Preclinical development of a microRNA-based therapy for intervertebral disc degeneration, *Nature Communications*. 9 (2018) 5051. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07360-1>.
- [15] X. Zhou, L. Chen, S. Grad, M. Alini, H. Pan, D. Yang, W. Zhen, Z. Li, S. Huang, S. Peng, The roles and perspectives of microRNAs as biomarkers for intervertebral disc degeneration, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 11 (2017) 3481–3487. <https://doi.org/10.1002/term.2261>.
- [16] C. Yang, Z. Shi, J. Hu, R. Wei, G. Yue, D. Zhou, miRNA-155 expression and role in pathogenesis in spinal tuberculosis-induced intervertebral disc destruction., *Experimental and Therapeutic Medicine*. 17 (2019) 3239–3246. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7313>.
- [17] W.L. Zhang, Y.F. Chen, H.Z. Meng, J.J. Du, G.N. Luan, H.Q. Wang, M.W. Yang, Z.J. Luo, Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration, *Journal of Orthopaedic Research*. (2017). <https://doi.org/10.1002/jor.23313>.
- [18] H.Q. Wang, X.D. Yu, Z.H. Liu, X. Cheng, D. Samartzis, L.T. Jia, S.X. Wu, J. Huang, J. Chen, Z.J. Luo, Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3, *Journal of Pathology*. (2011). <https://doi.org/10.1002/path.2931>.
- [19] J. Zhou, A. Liang, J. Hong, J. Sun, X. Lin, Y. Peng, X. Wang, S. Sun, D. Xiao, K. Xu, W. Ye, MicroRNA-155 suppresses the catabolic effect induced by TNF- α and IL-1 β by targeting C/EBP β in rat nucleus pulposus cells., *Connective Tissue Research*. 60 (2019) 165–177. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1483356>.
- [20] D. Ye, L. Dai, Y. Yao, S. Qin, H. Xie, W. Wang, W. Liang, MIR-155 Inhibits Nucleus Pulposus Cells’ Degeneration through Targeting ERK 1/2, *Disease Markers*. 2016 (2016) 6984270. <https://doi.org/10.1155/2016/6984270>.
- [21] S.N. Divi, D.Z. Markova, T. Fang, R. Guzek, M.F. Kurd, J.A. Rihn, A.S. Hilibrand, D.G. Anderson, A.R. Vaccaro, G.D. Schroeder, C.K. Kepler, Circulating miR-155-5p as a Novel Biomarker of Lumbar Degenerative Disc Disease., *Spine*. 45 (2020) E499–E507. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000003322>.

- [22] X. Chen, L.S. Mangala, C. Rodriguez-Aguayo, X. Kong, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood, RNA interference-based therapy and its delivery systems, *Cancer and Metastasis Reviews*. 37 (2018) 107–124. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9717-6>.
- [23] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers., *Pharmaceutical Research*. 19 (2002) 875–880. <https://doi.org/10.1023/a:1016121319668>.
- [24] P. Resnier, N. Galopin, Y. Sibiril, A. Clavreul, J. Cayon, A. Briganti, P. Legras, A. Vessières, T. Montier, G. Jaouen, J.-P. Benoit, C. Passirani, Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse., *Pharmacological Research*. 126 (2017) 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.031>.
- [25] S. David, T. Montier, N. Carmoy, P. Resnier, A. Clavreul, M. Mével, B. Pitard, J.-P. Benoit, C. Passirani, Treatment efficacy of DNA lipid nanocapsules and DNA multimodular systems after systemic administration in a human glioma model., *The Journal of Gene Medicine*. 14 (2012) 769–775. <https://doi.org/10.1002/jgm.2683>.
- [26] S. David, C. Passirani, N. Carmoy, M. Morille, M. Mevel, B. Chatin, J.-P. Benoit, T. Montier, B. Pitard, DNA nanocarriers for systemic administration: characterization and in vivo bioimaging in healthy mice., *Molecular Therapy. Nucleic Acids*. 2 (2013) e64. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.56>.
- [27] P. Resnier, P. LeQuinio, N. Lautram, E. André, C. Gaillard, G. Bastiat, J.-P. Benoit, C. Passirani, Efficient in vitro gene therapy with PEG siRNA lipid nanocapsules for passive targeting strategy in melanoma., *Biotechnology Journal*. 9 (2014) 1389–1401. <https://doi.org/10.1002/biot.201400162>.
- [28] S. David, N. Carmoy, P. Resnier, C. Denis, L. Misery, B. Pitard, J.P. Benoit, C. Passirani, T. Montier, In vivo imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model, *International Journal of Pharmaceutics*. 423 (2012) 108–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.031>.
- [29] C.P. O'Neill, R.M. Dwyer, Nanoparticle-Based Delivery of Tumor Suppressor microRNA for Cancer Therapy., *Cells*. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/cells9020521>.
- [30] A. Forterre, H. Komuro, S. Aminova, M. Harada, A Comprehensive Review of Cancer MicroRNA Therapeutic Delivery Strategies., *Cancers*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12071852>.
- [31] N. Bouhsina, C. Decante, J.B. Hardel, S. Madec, J. Abadie, A. Hamel, C. Le Visage, J. Lesoeur, J. Guicheux, J. Clouet, M. Fusellier, Correlation between magnetic resonance, X-ray imaging alterations and histological changes in an ovine model of age-related disc degeneration, *Eur Cell Mater*. 41 (2021) 166–178. <https://doi.org/10.22203/eCM.v042a13>.
- [32] P. Resnier, N. Galopin, Y. Sibiril, A. Clavreul, J. Cayon, A. Briganti, P. Legras, A. Vessières, T. Montier, G. Jaouen, J.-P. Benoit, C. Passirani, Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse., *Pharmacological Research*. 126 (2017) 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.031>.
- [33] C. Merceron, C. Vinatier, S. Portron, M. Masson, J. Amiaud, L. Guigand, Y. Chérel, P. Weiss, J. Guicheux, Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 298 (2010) C355–C364. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00398.2009>.
- [34] B.B. Shenoda, S. Ramanathan, S.K. Ajit, In Vitro Validation of miRNA-Mediated Gene Expression Linked to Drug Metabolism, *Curr Protoc Pharmacol*. 79 (2017) 9.26.1-9.26.15. <https://doi.org/10.1002/cpph.30>.
- [35] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method., *Methods (San Diego, Calif.)*. 25 (2001) 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

- [36] C. Decante, J. Clouet, A. Hamel, L. Le Fournier, O. Gauthier, D. Rouleau, J. Lesoeur, B. Halgand, C. Le Visage, J. Guicheux, M. Fusellier, Collateral effects of targeting the nucleus pulposus via a transpedicular or transannular surgical route: a combined X-ray, MRI, and histological long-term descriptive study in sheep, *Eur Spine J.* 30 (2021) 585–595. <https://doi.org/10.1007/s00586-020-06602-5>.
- [37] S. David, P. Resnier, A. Guillot, B. Pitard, J.P. Benoit, C. Passirani, SiRNA LNCs - A novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 81 (2012) 448–452. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.02.010>.
- [38] U.K. Sukumar, R.J.C. Bose, M. Malhotra, H.A. Babikir, R. Afjei, E. Robinson, Y. Zeng, E. Chang, F. Habte, R. Sinclair, S.S. Gambhir, T.F. Massoud, R. Paulmurugan, Intranasal delivery of targeted polyfunctional gold–iron oxide nanoparticles loaded with therapeutic microRNAs for combined theranostic multimodality imaging and presensitization of glioblastoma to temozolomide, *Biomaterials.* 218 (2019) 119342.
- [39] A. Mohamed, A.Y. Pekoz, K. Ross, G.A. Hutcheon, I.Y. Saleem, Pulmonary Delivery of Nanocomposite Microparticles (NCMPs) incorporating miR-146a for Treatment of COPD, *International Journal of Pharmaceutics.* (2019) 118524. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118524>.
- [40] S. David, N. Carmoy, P. Resnier, C. Denis, L. Misery, B. Pitard, J.-P. Benoit, C. Passirani, T. Montier, In vivo imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model, *International Journal of Pharmaceutics.* 423 (2012) 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.031>.
- [41] S. David, P. Resnier, A. Guillot, B. Pitard, J.P. Benoit, C. Passirani, SiRNA LNCs - A novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 81 (2012) 448–452. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.02.010>.
- [42] N. Henry, J. Clouet, J. Le Bideau, C. Le Visage, J. Guicheux, Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery systems, *Biotechnology Advances.* 36 (2018) 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.009>.
- [43] A.R. Reynolds, S.M. Moghimi, K. Hodivala-Dilke, Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature, *Trends in Molecular Medicine.* 9 (2003) 2–4. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)00004-7).
- [44] P. Resnier, T. Montier, V. Mathieu, J.-P. Benoit, C. Passirani, A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer, *Biomaterials.* 34 (2013) 6429–6443. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.04.060>.
- [45] R. Bayraktar, K. Van Roosbroeck, G.A. Calin, Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones, *Molecular Oncology.* (2017). <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12144>.
- [46] F. Mwale, P. Roughley, J. Antoniou, Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc, *Eur Cell Mater.* 8 (2004) 58–63; discussion 63–64. <https://doi.org/10.22203/ecm.v008a06>.
- [47] S.M. Naqvi, C.T. Buckley, Extracellular matrix production by nucleus pulposus and bone marrow stem cells in response to altered oxygen and glucose microenvironments, *J Anat.* 227 (2015) 757–766. <https://doi.org/10.1111/joa.12305>.
- [48] S.N. Tabatabaei, R.M. Derbali, C. Yang, R. Superstein, P. Hamel, J.L. Chain, P. Hardy, Co-delivery of miR-181a and melphalan by lipid nanoparticles for treatment of seeded retinoblastoma, *Journal of Controlled Release.* 298 (2019) 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.014>.

- [49] V. Juang, C.-H. Chang, C.-S. Wang, H.-E. Wang, Y.-L. Lo, pH-Responsive PEG-Shedding and Targeting Peptide-Modified Nanoparticles for Dual-Delivery of Irinotecan and microRNA to Enhance Tumor-Specific Therapy, *Small*. 15 (2019) e1903296. <https://doi.org/10.1002/sml.201903296>.
- [50] ISO 10993-5:2009(en), Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, (n.d.). <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en> (accessed October 17, 2021).
- [51] M. Szwed, M.L. Torgersen, R.V. Kumari, S.K. Yadava, S. Pust, T.G. Iversen, T. Skotland, J. Giri, K. Sandvig, Biological response and cytotoxicity induced by lipid nanocapsules, *J Nanobiotechnology*. 18 (2020) 5. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0567-y>.
- [52] S. Sun, H. Zou, L. Li, Q. Liu, N. Ding, L. Zeng, H. Li, S. Mao, CD123/CD33 dual-antibody modified liposomes effectively target acute myeloid leukemia cells and reduce antigen-negative escape, *International Journal of Pharmaceutics*. 568 (2019) 118518. <https://doi.org/10.1016/j.IJP.2019.118518>.
- [53] J. Hureauux, F. Lagarce, F. Gagnadoux, A. Clavreul, J.-P. Benoit, T. Urban, The adaptation of lipid nanocapsule formulations for blood administration in animals., *International Journal of Pharmaceutics*. 379 (2009) 266–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.033>.
- [54] J. Hureauux, F. Lagarce, F. Gagnadoux, M.C. Rousselet, V. Moal, T. Urban, J.P. Benoit, Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice, *Pharmaceutical Research*. 27 (2010) 421–430. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0024-y>.
- [55] O. Thomas, F. Lagarce, Lipid nanocapsules: A nanocarrier suitable for scale-up process, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 23 (2013) 555–559. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(13\)50084-0](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(13)50084-0).
- [56] E. Tsimonaki, C. Fedonidis, S.G. Pneumaticos, A.A. Tragas, I. Michalopoulos, D. Mangoura, PKC ϵ signalling activates ERK1/2, and regulates aggrecan, ADAMTS5, and miR377 gene expression in human nucleus pulposus cells, *PLoS ONE*. 8 (2013) e82045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082045>.
- [57] D. Ye, L. Dai, Y. Yao, S. Qin, H. Xie, W. Wang, W. Liang, MIR-155 Inhibits Nucleus Pulposus Cells' Degeneration through Targeting ERK 1/2, *Disease Markers*. 2016 (2016) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/6984270>.
- [58] L. Le Fournier, M. Fusellier, B. Halgand, J. Lesoeur, O. Gauthier, P. Menei, C. Montero-Menei, J. Guicheux, J. Clouet, The transpedicular surgical approach for the development of intervertebral disc targeting regenerative strategies in an ovine model, *Eur Spine J*. 26 (2017) 2072–2083. <https://doi.org/10.1007/s00586-017-5199-z>.
- [59] G. Vadalà, F. Russo, G. Pattappa, D. Schiuma, M. Peroglio, L.M. Benneker, S. Grad, M. Alini, V. Denaro, The transpedicular approach as an alternative route for intervertebral disc regeneration, *Spine (Phila Pa 1976)*. 38 (2013) E319–324. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318285bc4a>.
- [60] L. Frapin, J. Clouet, C. Chédeville, C. Moraru, E. Samarut, N. Henry, M. André, E. Bord, B. Halgand, J. Lesoeur, M. Fusellier, J. Guicheux, C. Le Visage, Controlled release of biological factors for endogenous progenitor cell migration and intervertebral disc extracellular matrix remodelling, *Biomaterials*. 253 (2020) 120107. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120107>.
- [61] J. Zhu, X. Zhang, W. Gao, H. Hu, X. Wang, D. Hao, lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in lumbar intervertebral disc degeneration., *Molecular Medicine Reports*. (2019). <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10569>.
- [62] R.-S. Yang, Y.-H. Wang, C. Ding, X.-H. Su, X.-B. Gong, MiR-146 regulates the repair and regeneration of intervertebral nucleus pulposus cells via Notch1 pathway., *European Review*

for Medical and Pharmacological Sciences. 23 (2019) 4591–4598.

https://doi.org/10.26355/eurev_201906_18036.

- [63] Y. Xi, T. Jiang, W. Wang, J. Yu, Y. Wang, X. Wu, Y. He, Long non-coding HCG18 promotes intervertebral disc degeneration by sponging miR-146a-5p and regulating TRAF6 expression, *Scientific Reports*. 7 (2017) 13234–13234. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13364-6>.
- [64] S.-X. Gu, X. Li, J.L. Hamilton, A. Chee, R. Kc, D. Chen, H.S. An, J.-S. Kim, C. Oh, Y.-Z. Ma, A.J. van Wijnen, H.-J. Im, MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc, *Gene*. 555 (2015) 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.024>.

3. Discussion

Ces travaux de développement d'un système nanoparticulaire pour la délivrance d'un miARN afin de régénérer le DIV montrent la complexité du développement de ce type de stratégie dans le cadre d'une pathologie discale. En effet, de par le caractère multifactoriel de la dégénérescence discale, le choix du miARN est crucial et doit permettre le ciblage des voies métaboliques impliquées dans cette dégénérescence. Les miARN possédant plusieurs cibles spécifiques, certaines voies métaboliques sont donc à considérer en premier. Ces miARN décrits dans la littérature sont notamment le miR-146, le miR-155 et le miR-34. En effet, ils présentent des effets sur la MEC, l'apoptose, la prolifération cellulaire et l'inflammation (Wang *et al.*, 2011b; Chen *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2016b; W. L. Zhang *et al.*, 2017b; Xi *et al.*, 2017; Y. Yu *et al.*, 2018; C. Yang *et al.*, 2019a; R.-S. Yang *et al.*, 2019b, 2019a; H. Zhu *et al.*, 2021). Le miR-155 est retrouvé dans de nombreuses espèces et a fait l'objet de nombreuses études quant à son rôle dans différentes pathologies (Faraoni *et al.*, 2009). Ainsi, son rôle dans le DIV et dans le processus de DD a été particulièrement décrit et l'utilisation du miR-155 semble pertinente comme potentiel agent thérapeutique.

Le choix du vecteur approprié pour formuler le miR-155 s'est porté naturellement sur les nanocapsules lipidiques (LNC). En effet, les nanocapsules lipidiques, vecteur historique du laboratoire MINT, avaient déjà démontré leur capacité à formuler un plasmide ou des siARN (David, Resnier, *et al.*, 2012b) *via* la formation de lipoplexes, et ont été ainsi choisies comme vecteur potentiel pour l'encapsulation du miR-155. La formulation a ainsi été possible en enlevant le Lipoïd de la liste des excipients de référence des LNC, les lipoplexes constitués de DOTAP et DOPE jouant le rôle de surfactant. L'efficacité d'encapsulation obtenue (EE) était de $75,6 \% \pm 1,6 \%$ et la charge en miARN de $0,6 \% \pm 0,01 \%$, correspondant à $590,5 \pm 2,5 \mu\text{g}$ de miR-155 par gramme de LNC. À titre de comparaison, des nanoparticules d'oxyde d'or et de fer ont été chargées en miARN avec une EE d'environ 84 % et une charge en miARN de 0,02 % (Sukumar *et al.*, 2019). Dans une autre étude, la formulation de nanocomposites pour encapsuler le miR-146a a été réalisée et une EE de 81 % et une charge en miARN de 0,4 % (Mohamed *et al.*, 2019) ont été obtenues. Dans notre étude, les LNC ont donc montré une EE comparable à d'autres systèmes de nanoparticules, avec une charge en miARN supérieure. Mais est-ce que les LNC protègent les miARN de la dégradation prématurée enzymatique ?

Pour répondre à cette question, la protection fut évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose, permettant de montrer l'intégrité potentielle du miARN après incubation dans un milieu riche en enzyme. Les résultats montrent une protection efficace du miARN par les LNC et sont en accord avec les études précédentes réalisées sur les LNC (David, Carmoy, *et al.*, 2012b ; David, Resnier, *et al.*, 2012b ; Resnier, Montier, *et al.*, 2013 ; Resnier *et al.*, 2017c). Cette propriété recherchée n'était pourtant pas triviale, car la localisation du miARN complexé au DOTAP se trouve vraisemblablement au niveau de la coque de la LNC, mais suffisamment bien caché pour être protégé par une attaque enzymatique : les chaînes de PEG de l'hydroxystéarate de PEG forment notamment un bouclier hydrophile stérique.

L'internalisation cellulaire a été démontrée sur deux types cellulaires ovin et humain montrant une internalisation totale après 24 h ainsi qu'une colocalisation du miARN avec les LNC. Comparativement à d'autres nanoparticules lipidiques pour la délivrance de matériel génétique, une vitesse similaire d'internalisation fut observée avec un début d'internalisation après 4 h à 6 h et une internalisation totale après 24 h sur les deux types cellulaires (Juang *et al.*, 2019 ; Tabatabaei *et al.*, 2019). Ces résultats étaient en accord avec une étude précédente réalisée sur des cellules cancéreuses où les LNC étaient entièrement internalisées après 24 h (David, Carmoy, *et al.*, 2012b ; David, Resnier, *et al.*, 2012b). Même si ces résultats sont prometteurs il faut néanmoins interpréter les résultats avec prudence au regard de la modification potentielle des propriétés d'internalisation du miARN une fois couplé à la sonde fluorescente. En effet, on passe d'une molécule hydrophile à une molécule amphiphile de par le couplage à la sonde fluorescente hydrophobe, ce qui peut modifier drastiquement la localisation du miARN dans la LNC et sa localisation cellulaire, une fois la LNC internalisée. Une extinction du signal de fluorescence peut également être observée, par « quenching » des sondes entre-elles et une possible fuite de la sonde fluorescente peut également être observée (Swiecicki *et al.*, 2016).

La cytocompatibilité des LNC chargées en miR-155 a ensuite été évaluée sur les cellules du NP de brebis (oNP) et des cellules stromales mésenchymateuses humaines (hASC). Conformément à la norme NF-ISO 10993 (NF-ISO 10993-5:2009, Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 5 : Essais de cytotoxicité *in vitro*) et le seuil de cytocompatibilité à 70 % de cellules vivantes après traitement par les concentrations définies a été considéré afin de conclure. Dans les 2 cas (oNP et hASC), ce seuil de 70 % a été respecté pour des

concentrations de 508 à 1997 µg/mL en excipients lipidiques. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes dans lesquelles les LNC chargées en siARN étaient considérées comme non-cytotoxiques pour des cellules saines de mélanome SK-Mel28. Ces résultats sont aussi en adéquation avec des tests de cytocompatibilité sur des LNC similaires récemment publiés (Szwed *et al.*, 2020). Comparée à une formulation liposomale récemment développée encapsulant un ratio molaire de 0,2 en miARN par rapport aux excipients du liposome, la cytotoxicité des LNC semble améliorée à la même concentration et aux mêmes temps de traitement (S. Sun *et al.*, 2019). Cette biocompatibilité représente un atout certain qui est en partie lié à l'absence de solvant lors de la formulation, dont des résidus potentiellement toxiques post-formulation seraient délétères. Couplé à l'absence d'excipients utilisés pour la formulation de LNC répondant au statut d'organisme génétiquement modifié, l'utilisation d'excipients approuvés par l'US Food and Drug Administration (FDA) (Hureaux *et al.*, 2009), l'absence de solvant, une formulation faiblement consommatrice d'énergie, une transposition à grande échelle de la formulation des LNC (scale-up) semble envisageable (Thomas et Lagarce, 2013). Ces éléments doivent être pondérés par le fait que la concentration de ces mêmes excipients sous la forme d'une nanoparticule peut avoir un comportement *in vitro* local différent et ce devait donc d'être étudié sur les cellules d'intérêt. L'utilisation de deux types cellulaires permet de lever certains doutes quant aux propriétés d'internalisation et d'anticiper sur d'éventuels obstacles *in vivo*. Ainsi :

- l'utilisation de cellules du NP répond à la question d'une possible internalisation au sein des cellules cibles du DIV ;
- l'utilisation de cellules du NP de brebis répond à la question de la faisabilité de futures expérimentations à grande échelle chez la brebis ;
- l'utilisation d'ASC humaines répond à la question d'une internalisation possible dans des cellules d'origine humaine et cela pour des objectifs à long terme d'essais cliniques chez l'homme.

Il restera néanmoins à démontrer que cette internalisation au sein de cellules du NP d'origine humaine sera possible, mais leur disponibilité est limitée pour réaliser ces expérimentations.

A noter que la séquence du sLink-N varie entre la brebis, le chien et l'homme et qu'il faudra en tenir compte afin de garantir un effet biologique de l'agent thérapeutique.

Pour valider l'intégrité du miR-155 et le maintien de son activité biologique, une étude *in vitro* a été menée afin d'évaluer l'impact des LNC miR-155 sur le niveau de protéine ERK1/2 dans les cellules hASC et oNP. ERK1/2 a été choisie car étant une cible spécifique du miR-155 dans l'IDD, conduisant à la réduction de la protéine ERK1/2 totale (Ye *et al.*, 2016). Une analyse par western blot de la synthèse protéique totale de ERK1/2 après 24 h de traitement a ainsi été réalisée. Les résultats confirment une diminution de la synthèse de ERK1/2 suite au traitement des cellules par les LNC miR-155, contrairement au miR-155 non vectorisé par les LNC qui ne montre pas de diminution du fait d'une absence d'internalisation. Ces résultats permettent d'affirmer que les LNC sont indispensables à la délivrance de miARN tout en conservant sa bioactivité (Ye *et al.*, 2016b). Cependant, le miR-155 est connu pour cibler plusieurs gènes et protéines dans la DD. Notamment, le miR-155 est connu pour cibler MMP16 et MMP13 impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire des DIV (W. L. Zhang *et al.*, 2017), la caspase 3 impliquée dans l'apoptose médiée par Fas conduisant à la mort cellulaire des cellules du NP (Wang *et al.*, 2011), ou encore la C/EBP-bêta conduisant à la réduction de l'inflammation par la dérégulation du TNF-alpha et de l'IL-1beta (Zhou, Liang, *et al.*, 2019a). De futures études seront à réaliser pour permettre l'identification de ces cibles dans un modèle *ex vivo* de DIV déjà développé au laboratoire. Il s'agira notamment d'une étude transcriptomique et protéomique afin de permettre l'identification des modifications cellulaires induites par les LNC miR-155. Ces techniques ont été récemment utilisées dans l'étude du disque intervertébral dégénéré, mais jamais dans l'optique d'évaluer un traitement *ex vivo* (Xu *et al.*, 2021).

Suite à ces résultats, des expérimentations *in vivo* ont été envisagées afin de démontrer leur faisabilité et la sécurité d'injection de LNC miR-155 au sein de DIV de brebis. Modèle développé par le laboratoire RMeS, en collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (Bouhsina *et al.*, 2021), 3 brebis ont été traitées et un suivi longitudinal de 3 mois a été réalisé. Ce suivi a consisté à des IRM et une analyse histologique finale suite au sacrifice des brebis. Aucun effet délétère, tant à l'IRM qu'en histologie, n'a été observé. Dans le futur, une étude *in vivo* avec évaluation du niveau de protéine ERK1/2 et des autres cibles du miR-155 par immunohistochimie sur des DIV de brebis sera envisagée. Couplés aux résultats prometteurs de cytocompatibilité obtenus *in vitro* sur deux types cellulaires, les premiers résultats *in vivo* sont rassurants et nous permettent d'ores et déjà d'envisager l'utilisation des

LNC miARN dans de futures études, en particulier dans le cadre d'une étude pré-clinique à grande échelle chez la brebis, mais aussi d'essais cliniques vétérinaire (essai clinique DISCODOG sur des patients canins) ou humains. La preuve de l'efficacité biologique *in vivo* du miR-155 sera importante à démontrer avec notamment une augmentation du signal en T2 à l'IRM mais également une amélioration du score histologique de Boos (uniquement pour les expérimentations à grande échelle chez la brebis). Bien que le miR-155 soit notre modèle pour l'ensemble de nos études réalisées, l'utilisation d'autres miARN devra être réfléchie. En effet, d'autres candidats peuvent également être envisagés au regard du panel de miARN impliqué dans le processus de DD. La combinaison de plusieurs miARN au sein des LNC pour avoir un impact sur différentes voies métaboliques dans les cellules du DIV et permettrait de répondre également au caractère multifactoriel du processus de DD. Parmi les miARN potentiellement envisagés, l'utilisation du miR-146, fortement régulé à la baisse dans la DD, pourrait être un candidat prometteur. La combinaison du miR-155 et du miR-146 pourrait permettre d'obtenir un effet synergique du fait des cibles différentes des 2 miR (Gu *et al.*, 2015b ; Xi *et al.*, 2017 ; R.-S. Yang *et al.*, 2019b). A noter que d'un point de vue galénique, le procédé de formulation des LNC sera théoriquement le même, avec l'ajout de deux types de lipoplexes lors de la zone d'inversion de phase. La modulation du ratio molaire entre miR-155 et miR-146 pourra être également intéressant à étudier.

Comme évoqué, une étude clinique vétérinaire est envisagée et fait déjà l'objet d'un financement accordé par le RFI BIOREGATE de la Région Pays de la Loire. Il s'agit de l'étude DISCODOG qui a pour objectif d'évaluer, sur des chiens chondrodystrophiques atteints de DD, l'effet des LNC miR-155. Il s'agit d'un essai randomisé (LNC miR-155 versus LNC blanches). Au moment de l'écriture du manuscrit, aucun chien n'a été inclus dans l'essai. L'ensemble du processus de gestion de cet essai est d'ores et déjà validé, tant pour les modalités d'inclusion et de prise en charge des chiens, que pour les modalités de formulation et de contrôle des LNC miR-155 « GMP » et l'ensemble de la gestion documentaire.

III. Fonctionnalisation de nanocapsules lipidiques par le peptide short Link-N et vectorisation du miR-155

1. Problématique

Comme décrit précédemment, la formulation de LNC miR-155 est aujourd'hui maîtrisée et les résultats soumis à publication dans *International Journal of Pharmaceutics* ont permis de (i) démontrer la biocompatibilité du système LNC miR-155 ; (ii) valider la protection du miR par les LNC ; (iii) démontrer l'internalisation et la bioactivité du miR-155 au sein des cellules du NP ; (iv) valider la sécurité et la faisabilité de l'injection de LNC miR-155 dans un modèle gros animal.

Afin de répondre aux éventuels obstacles liés à l'environnement discal considéré comme « hostile » (osmolarité importante, pH acide, hypoxie) et risquant de conduire à une action limitée *in vivo* des LNC miR-155, l'hypothèse d'une fonctionnalisation des LNC miR-155 a été envisagée. L'utilisation du short Link-N comme peptide d'intérêt, afin de décorer les LNC, a été proposée.

Préalablement, l'expertise du laboratoire MINT a permis de définir la stratégie de fonctionnalisation. En effet, la fonctionnalisation de surface des LNC a déjà été effectuée selon différentes méthodes comme *via* un greffage covalent, une post-insertion ou par simple adsorption physico-chimique. Par exemple, un anticorps (Béduneau *et al.*, 2007) avait été greffé covalamment *via* un lien thiol-maléimide, des polymères pH-sensibles avaient été post-insérés dans la coque des LNC (Pautu *et al.*, 2021) ou encore un peptide NFL (« NeuroFilament-derived peptide ») permettant une meilleure internalisation des LNC dans des cellules humaines de glioblastome avait été adsorbé à la surface des LNC (Karim *et al.*, 2018).

Dans notre étude, la molécule d'intérêt choisie a été le peptide sLink-N. Celui-ci est un peptide, présent naturellement dans la MEC du DIV et du cartilage articulaire, à la suite du clivage protéolytique de la protéine Link. Plusieurs études ont identifié cette protéine comme un facteur de croissance capable de stimuler la synthèse de la MEC dans ces tissus (AlGarni *et al.*, 2016; Noorwali *et al.*, 2018) . Ainsi, dans le DIV, il a été démontré une augmentation de la teneur en protéoglycanes (agrécan) dans un modèle de culture *ex vivo* de DIV dégénérés après injection de sLink-N a pu être démontrée après 4 semaines (AlGarni *et al.*, 2016). Une

augmentation de la quantité de collagène de type II a également été observée. Les mécanismes d'induction de cet effet anabolique ont également été investigués, démontrant la capacité du Link-N à se fixer au récepteur BMPRII des cellules du NP (Noorwali *et al.*, 2018). Dans ce contexte, le choix du sLink-N semble pertinent afin de proposer une fonctionnalisation des LNC pour accentuer le ciblage des cellules du NP et disposer d'un effet anabolique à terme, cumulatif de celui du miR-155.

L'objectif de cette étude a donc été d'étudier la fonctionnalisation des LNC par le peptide sLink-N, afin de permettre une meilleure internalisation dans les cellules du NP. Pour ce faire, Les LNC ont été formulées, décorées en surface par deux procédés d'adsorption physico-chimiques qui diffèrent par la temporalité de l'ajout du peptide lors du procédé de formulation des LNC, et caractérisées. Puis, l'internalisation ainsi que leur localisation cellulaire ont été étudiées par cytométrie en flux et par imagerie confocale. Enfin, pour confirmer les propriétés initiales des LNC démontrées précédemment, des tests de cytocompatibilité ont été effectués et la bioactivité des LNC fonctionnalisées a été démontrée *in vitro*.

Les résultats obtenus, non publiés, sont présentés ci-dessous.

2. Matériels et Méthodes

Matériels

Le polyoxyl-15-hydroxystéarate (Kolliphor® HS15) a été acheté auprès de BASF (Ludwigshafen, Allemagne). La phosphatidylcholine hydrogénée de soja (Lipoid S75-3®) a été fournie par Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne), et les triglycérides capryliques/capriques (Labrafac Lipophile WL1349) ont été fournis par Gattefosse (Saint-Priest, France). Le DOTAP (1,2-dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane) et le DOPE (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine) ont été achetés chez Avanti® polar lipids (Alabaster, Alabama, USA). Le Hoescht 3342, le Prolong®, le gel NuPAGE® 3-8% tris-acétate et le DID ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). La séquence codante du miARN (miR-155) 5'-GGGCAGUGUUUCAGGCUUUATT-3' et la séquence non codante 5'-UUAGCCUGAAACUGCCCTT-3', ainsi que la sonde fluorescente Alexa Fluor® 488 (Alexa-488) couplée de manière covalente au miRNA et le peptide sLink-N, Séquence ovin : DHHSNNYT, ont été fournis par Eurogentec (Liège, Belgique). Les consommables plastiques tels que les flasques T75, et les réactifs tels que le DMSO, le Tris-EDTA, le PBS, le chloroforme, la

hyaluronidase (ref H4272), la trypsine (ref T9935), la collagénase (C2674), le TrisHCl, le chlorure de potassium, l'EDTA, l'EGTA, le dithio-thréitol, le β -glycérophosphate, le Na₃VO₄, le PMSF, le NAF, la pénicilline, la streptomycine, le milieu Dulbecco's modi-fied Eagle's (DMEM) et les anticorps secondaires anti-souris ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Les anticorps secondaires anti-lapin ont été fournis par Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Le NaCl a été acheté auprès de Prolabo (Sion, Suisse). L'eau a été obtenue à partir d'un système Milli-Q®, Millipore (Darmstadt, Allemagne). Les membranes de dialyse Spectra/por® float-a-Lyzer® ont été achetées chez SprettrumLab (Ravensburg, Allemagne). Les puits Ibidi® μ -slide 8 ont été achetés auprès d'Ibidi® GmbH (Martinsried, Allemagne). Un kit NucleoSpin RNAII a été acheté auprès de Macherey-Nagel (Hoerd, France). Le logiciel d'acquisition a été fourni par Agilent Genomics (Santa Clara, CA, USA).

Formulation des lipoplexes

Pour obtenir des lipoplexes, 52,4 mg de lipides cationiques DOTAP ont été dissous dans 2 mL de chloroforme et mélangés avec 57,3 mg de lipides zwitterioniques DOPE dilués dans 2 mL de chloroforme, pour obtenir une concentration finale en lipides cationiques de 30 mM (rapport molaire 1:1 de DOTAP/DOPE). Après évaporation du chloroforme à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi® Rotavapor Evaporator® R-100, Thermo Fisher Scientific), 3 mL d'eau milliQ® ont été ajoutés et laissés pendant 1 heure pour réhydrater le film lipidique. Les lipoplexes ont ensuite été obtenus en mélangeant 750 μ g de miARN et 378,8 μ L de liposomes (provenant de la formulation de 3 mL), avec un rapport molaire final de 0,2.

Différentes séquences de miARN ont été utilisées :

miR-155 : séquence sens 5'-GGGCAGUGUUUCAGGCUUUATT-3' et séquence non codante 5'- UUAGCCUGAAACACUGCCCTT-3'.

miARN Ctrl : séquence confidentielle fournie par Eurogentec (Belgique), connue du génome humain non altéré

Anti-miR-155 (AntagomiR) séquence sens 5'- UGUUAAUGCUAAUGUAGGAG-3', et séquence non codante 5'- CUCCUACAUAUUAGCAUUAACAT-3'.

Formulations et fonctionnalisation par le sLink-N des LNC blanches et LNC miR-155/miARN ctrl/AntagomiR

Les LNC blanches ont été formulées conformément au brevet US20030152635A1 (2000), en mélangeant 20,5 % m/m de triglycérides Labrafac® WL 1349, le cœur lipidique, avec 16,9 % m/m de Kolliphor® HS 15, un tensioactif hydrophile permettant l'inversion de phase, avec 1,5 % m/m de Lipoid S75-3®, un tensioactif hydrophobe utilisé pour donner de la rigidité à l'enveloppe, avec 1,8 % m/m de NaCl et 59,8 % m/m d'eau MilliQ®, sous agitation magnétique. Trois cycles en température ont été réalisés, entre 58°C et 90°C, conduisant à la transition d'une émulsion huile dans eau (o/w) à une émulsion eau dans huile (w/o), avec une zone d'inversion de phase (PIZ) obtenue à 78°C. À cette température PIZ, un refroidissement rapide et une dilution avec 3 mL d'eau froide Milli-Q® permettent de briser la microémulsion formée d'un réseau de micelles cylindriques et ainsi d'obtenir les LNC.

Pour obtenir des LNC chargées en miARN (selon les brevets FR 4185991, 24 sept 2014), le Lipoid® a été retiré de la formulation précédente et 3 mL de lipoplexes ont été ajoutés lors de la zone d'inversion de phase, lors du dernier cycle en température. Après formulation, les LNC chargées en miARN ont été purifiées à l'aide d'une colonne de chromatographie d'exclusion stérique Sephadex® PD10.

La surface des LNC a ensuite été fonctionnalisée par adsorption, après ajout de trois différentes concentrations en peptides sLink-N (100 peptides/LNC = 1,8 nmol/mL ; 500 peptides/LNC = 9,1 nmol/mL et 1000 peptides/LNC = 18,2 nmol/mL). Deux procédés ont été étudiés : (i) le sLink-N a été ajouté à l'eau de trempe directement lors de la zone d'inversion de phase du procédé de formulation (appelé QW « Quenching Water ») ; (ii) le peptide a été ajouté post-formulation (appelé Ads) et laissé sous agitation pendant 24 h à température ambiante. Une étape de dialyse pendant 24 h est ensuite effectuée pour séparer le peptide libre du peptide adsorbé.

Caractérisations physico-chimiques

Le diamètre, l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta des différentes fractions ont été mesurés respectivement par diffusion dynamique de la lumière et par mobilité électrophorétique (Nanoseries ZS®, Malvern Instruments SA, Worcestershire, Royaume-Uni), après dilution par un facteur 200 dans de l'eau Milli-Q® (n = 3).

Etude de stabilité de la fonctionnalisation : cinétique de libération *in vitro* du sLink-N

La cinétique de libération du sLink-N des LNC a été étudiée dans du PBS. Brièvement, 0,5 mL de formulation (LNC blanches, miARN seul et sLink-N seul comme contrôles et LNC miR-155 sLink-N aux trois différentes concentrations) ont été ajoutés dans un boudin de dialyse avec une porosité de 100 kDa, puis immergé dans un bécher contenant 35 mL de 1×PBS, sous agitation, à 37°C. Des triplicats de 1 mL ont ensuite été prélevés à différents temps : 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 4 jours, 5 jours, 6 jours et 7 jours. Les différents échantillons obtenus ont ensuite été quantifiés par UPLC (n = 3).

Quantification par UPLC et caractérisation de la fonctionnalisation

La concentration en peptide sLink-N a été quantifiée par une méthode UPLC recommandée par le fournisseur. Brièvement, les échantillons en triplicats obtenus dans l'étude de libération précédente contenant potentiellement le sLink-N libéré ont été recueillis et le dosage du peptide a été effectué *via* un système UPLC de chez Waters. Une colonne analytique C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Waters, France) a été utilisée à température ambiante. Les phases mobiles utilisées étaient le TFA à 0,1 % dans l'eau et le TFA à 0,1 % dans l'acétonitrile (gradient : 99:01 → 70:30 en 8 min). Le débit était de 0,5 mL/min, le volume d'injection était de 10 µL et le sLink-N a été quantifié par un détecteur UV à une longueur d'onde de détection de 220 nm. L'analyse des données a été réalisée par le logiciel Empower 3 (Waters). Le temps de rétention du peptide sLink-N était de 5 min. Des courbes d'étalonnages ont été effectuées avec des concentrations croissantes en sLink-N comprises entre 1 µg/mL et 100 µg/mL de solutions de sLink-N dilué dans l'eau. La solution de peptide seul et les LNC seules étaient les témoins positif et négatif.

Isolement et culture des cellules du NP

Les cellules du NP ont été isolées après prélèvement de DIV sur des moutons (oNP), en collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS). Brièvement, les explants de DIV ont été coupés, dans des conditions stériles, pour séparer l'AF du NP. Les petits morceaux obtenus ont été rincés trois fois un mélange d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (P/S) à 2 % dans du PBS pendant 2 minutes. Pour séparer les cellules de la MEC, 15 à 20 mL de hyaluronidase (ref H4272) à 0,05 % dans du PBS ont été ajoutés et incubés à 37°C pendant 15 minutes. Après deux rinçages avec du PBS, 15 à 20 mL de trypsine

(ref T9935) à 0,2 % ont été ajoutés et incubés à 37°C pendant 30 minutes. Après deux autres rinçages avec du PBS, 15-20 mL de collagénase (ref C2674) dans un milieu complet ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 37°C pendant une nuit. La suspension récupérée a été filtrée à une porosité de 70 µm, puis centrifugée pendant 5 minutes à 259 G. Les cellules ont été comptées etensemencées dans des flasques T75 à une densité de 5.10^3 cellules/cm².

Les cellules oNP (de P0 à P3) ont été cultivées dans des flasques T75 à une densité de 5.10^3 cellules/cm² dans du DMEM complété par 10 % d'albumine de sérum bovin (BSA) et 1 % de mélange d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (P/S), à 37°C et 5 % de CO₂.

Internalisation cellulaire : cytométrie en flux et imagerie confocale

Pour étudier l'internalisation cellulaire des LNC fonctionnalisées, celles-ci ont été chargées avec une sonde fluorescente lipophile rouge, le DID. Une sonde verte, l'Alexa Fluor® 488 (Alexa-488), a été couplée de manière covalente au miARN. Au cours du processus de formulation, 0,1 % m/m de DID (soit 0,2 mg) dilué dans du chloroforme a été ajouté au mélange d'excipients lipidiques, au début du procédé de formulation.

L'internalisation dans les cellules oNP a d'abord été caractérisée par cytométrie en flux, après incubation avec les différentes formulations à différents temps (1 h, 2 h, 4 h, 12 h et 24 h) pour les conditions suivantes : (i) LNC marquées avec le DID (LNC blanche) ; (ii) LNC marquées avec le DID et chargées avec un miARN contrôle (LNC ctrl miARN) ; (iii) LNC marquées avec le DID et chargées avec le miR-155 marqué avec l'Alexa-488 (LNC miR-155) ; (iv) miR-155 marqué avec l'Alexa-488 (miR-155 seul) ; (v) LNC fonctionnalisées avec le sLink-N ; (vi) LNC chargées avec le miR-155 et fonctionnalisées avec le sLink-N. Les cellules oNP adhérentes ont été trypsinées, remises en suspension dans du PBS, puis analysées à l'aide d'un cytomètre en flux par fluorescence BD LSR II (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA). Pour chaque échantillon, 10000 événements ont été acquis et analysés à l'aide du logiciel BD FACSDiva®. Les résultats ont été exprimés à l'aide d'histogrammes exprimant le nombre de cellules comptées en fonction de l'intensité de fluorescence émise mesurée à 517 nm et à 665 nm, correspondant à l'émission de l'Alexa-488 et du DID respectivement.

Pour l'imagerie confocale, les cellules oNP ont étéensemencées à 8000 cellules/puits (0,3 mL) sur des puits Ibidi® µ-slide 8. Après 24 h, les différentes formulations précédemment citées ont été ajoutées (79 µg d'excipients LNC dans 100 µL de DMEM), à une concentration

correspondant à la concentration optimale en miARN pour la transfection (120 ng de miRNA/100 μ L de milieu cellulaire) (Rupaimoole et Slack, 2017 ; Shenoda, Ramanathan et Ajit, 2017). Après différents temps d'incubation (1 h, 2 h, 4 h, 12 h et 24 h), les cellules ont été rincées avec du PBS, puis fixées par du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % (100 μ L/puits) à 4°C pendant 20 min. Le PFA a ensuite été rincé à l'aide de PBS, et la coloration nucléaire a été réalisée en ajoutant 100 μ L de 3 μ M de Hoechst (4',6-diamidino-2-phénylindole) pendant 10 min dans l'obscurité, puis rincées. Toutes les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP8 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un objectif à huile, HC PL APO CS2 40 $\times$ / NA 1.10 et de détecteurs hybrides contrôlables (GaAsP). Les images ont été acquises au format 1024 $\times$ 1024 pixels, avec une profondeur de 8 bits et une vitesse de balayage de 400 Hz. Pour les colorants Hoescht, Alexa-488 et DID, l'excitation a été réalisée à l'aide d'un laser à diode de 405 nm de longueur d'onde (50 mW), d'un laser à ions argon de 488 nm de longueur d'onde (40 mW) et d'un laser HeNe à 633 nm (10 mW), respectivement. La largeur de la bande de détection de l'intensité de fluorescence émise était réglée entre 407 et 480 nm pour le Hoescht, 488 et 563 nm pour l'Alexa-488 et 635 et 750 nm pour le DID. Les coupes optiques ont été collectées avec une largeur de 1 μ m à l'aide d'un "stage Super Z Galvo Type H" et ont été affichées sous forme de projections Z maximales à l'aide du logiciel LAS X. Le score de Pearson a ensuite été calculé avec le logiciel image J.

Activité métabolique et cytotoxicité (tests MTT et LDH)

L'activité métabolique des cellules oNP traitées par les différentes formulations de LNC a été évaluée à l'aide d'un test MTT (référence M5655, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Ce test permet de déterminer le nombre de cellules vivantes *via* l'activité mitochondriale. Le composant clé est le bromure de (3-[4,5- diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium) ou MTT. Ainsi, les déshydrogénases mitochondriales des cellules viables clivent l'anneau de tétrazolium, donnant des cristaux de formazan violet qui sont insolubles en solution aqueuse. L'absorbance du colorant converti est mesurée à une longueur d'onde de 562 nm. Afin de réaliser ce test MTT, les cellules oNP ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (5000 cellules/puit) et incubées pendant 24 h. Le milieu a ensuite été remplacé par différentes concentrations en LNC dans le milieu cellulaire (de 508 à 1997 μ g/mL en LNC) et incubées à 37°C pendant 24 h (50 μ L de surnageant ont été prélevés dans chaque puits et utilisés pour le

test LDH). L'absorbance des échantillons a été mesurée à 562 nm en utilisant un lecteur de microplaques (VIKTOR®, PerkinElmer, Melville, New York, USA).

Pour compléter ce test, le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH), a été effectué (kit Pierce référence 88953, ThermoFisher, Saint-Aubin, France). La LDH est une enzyme cytosolique libérée dans le milieu de culture cellulaire lorsque la membrane plasmique est endommagée, ce qui ajoute une donnée supplémentaire au test MTT. La LDH libérée dans les 50 µL de surnageant précédemment prélevés est quantifiée par une réaction enzymatique couplée dans laquelle la LDH catalyse la conversion du lactate en pyruvate *via* la réduction du NAD⁺ en NADH. L'oxydation du NADH par l'enzyme entraîne la réduction d'un sel de tétrazolium en un produit de formazan rouge dont l'absorbance peut être mesurée par spectrophotométrie à 490 nm.

Dans les deux tests, l'absorbance des cellules incubées avec du DMEM uniquement a été considérée comme représentant 100 % de viabilité cellulaire (Abs_{ve}), tandis que les cellules traitées avec 5 % de Triton X-100 ont été considérées comme représentant 0 % de viabilité cellulaire (Abs_{dc}). L'activité métabolique et la cytotoxicité ont été calculées à l'aide des équations suivantes.

$$\text{Activité métabolique (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Sample}592\text{nm}} - \text{Abs}_{\text{ve}592\text{nm}})}{(\text{Abs}_{\text{dc}592\text{nm}} - \text{Abs}_{\text{ve}592\text{nm}})} * 100$$

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Sample}490\text{nm}} - \text{Abs}_{\text{ve}490\text{nm}})}{(\text{Abs}_{\text{dc}490\text{nm}} - \text{Abs}_{\text{ve}490\text{nm}})} * 100$$

Bioactivité du miR-155 par RT-qPCR

Pour vérifier la bioactivité du miARN, l'expression génétique totale des kinases régulées par ERK1/2 a été quantifiée par RT-qPCR. L'ARN total a été isolé des cellules à l'aide du kit NucleoSpin RNAII, conformément aux instructions du fabricant. L'ARN a été transcrit de manière inverse en utilisant Affinity Script (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA). La RT-qPCR a été réalisée sur un analyseur Bio-Rad CFX96 en utilisant le miR-X miRNA RT-qPCR SYBR Kit® (Takarabio Inc, USA) pour le miR-155 et le SYBR®Select Master Mix (Applied Biosystems, Thermofisher) pour ERK1/2. L'efficacité des amorces a été déterminée à l'aide d'une courbe standard avec une dilution de 1:4 v/v, et la spécificité de l'amplification a été vérifiée par une

analyse de la courbe de fusion. L'expression des gènes cibles a été normalisée par rapport au niveau d'expression de la B2M (bêta-2-microglobuline) et les niveaux d'expression relative des gènes ont été calculés. Les séquences des amorces utilisées dans cette étude sont les suivantes (sens direct et sens inverse) :

ERK1/2 : 5'-TGTCACAAAGTCCGAGTCGCC-3' (sens direct) et 5'-TGTTCTCGTGTCTGAAGCGCAG-3'.

B2M : 5'-GGGCTGCTGTCGCTGTCTGG-3' et 5'-TGGCTTTCCATCTCCTGGCGG-3' (inverse)

Bioactivité du miR-155 par Western blot

Les cellules ont été lysées pendant 30 minutes dans un tampon de lyse glacé (20 mM TrisHCl, pH 7,5, 100 mM chlorure de potassium, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothréitol, 20 mM β -glycérophosphate, 2 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF et 1 mM NaF). Après centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 4°C, les extraits protéiques (surnageant) ont été chauffés dans du tampon de chargement Laemmli avant le SDS-PAGE. L'électrophorèse a été réalisée en utilisant le gel NuPAGE® 3-8 % tris-acétate. Les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF et un blocage a été effectué avec du lait sec non gras/TBST à 5 % (10 mM Tris, 154 mM NaCl et 0,15 % Tween-20) à température ambiante pendant 1 h. Les bandes ont été sondées avec des anticorps primaires dans du lait sec non gras/TBST à 5 % à 4 °C pendant une nuit, puis avec des anticorps secondaires à température ambiante pendant 1 h. L'anticorps anti-ERK1/2 a été utilisé à une dilution v/v de 1:2000. L'anticorps monoclonal anti- β -tubuline AC-74 a été utilisé à une dilution de 1:2000 v/v comme contrôle de charge. Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris ont été utilisés à des dilutions de 1:2000 et 1:80000, respectivement. La détection du signal a été réalisée à l'aide du réactif de détection ECL pour western blot avec le ChemiDoc Imaging System® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel open-source R.

Pour la cinétique de libération du peptide, la significativité statistique a été calculée à l'aide du test de Kruskal-Wallis. Les valeurs de P de 0,05 ou moins ont été considérées comme significatives (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Pour les résultats de cytométrie en flux, la significativité a été analysée à l'aide du test *post hoc* de Bonferroni.

3. Résultats

Caractérisation des LNC blanches, chargées en miARN avant fonctionnalisation

Les LNC blanches ont été formulées par un procédé d'inversion de phase, selon le brevet US20030152635A1 de 2000. Les LNC blanches obtenues possèdent un diamètre de $50,3 \pm 2,5$ nm, un PDI de $0,03 \pm 0,01$ et un potentiel zêta neutre de $-1,5 \text{ mV} \pm 1,3 \text{ mV}$, conforme à la littérature (Heurtault B., 2002). La formulation de miR-155 LNC a été réalisée conformément au brevet FR 4185991 de 2014. Le Lipoid® a ainsi été retiré de la formulation précédente et les lipoplexes du miR-155 ont été ajoutés lors de la zone d'inversion de phase, pendant le dernier cycle en température du processus. Les formulations obtenues possèdent un diamètre de $75,1 \text{ nm} \pm 5,2 \text{ nm}$ un PDI de $0,05 \pm 0,03$ et un potentiel zêta légèrement positif $10,2 \pm 4,5 \text{ mV}$.

Adsorption du peptide sLink-N à la surface des LNC

Deux méthodes d'adsorption ont été étudiées comme indiqué dans le M&M et 3 concentrations ont été testées. Les résultats de quantification du peptide sont résumés sur la **Figure 13**.

De façon intéressante, la fonctionnalisation par les deux méthodes montre une certaine efficacité. En effet, dans les deux cas, la quantité de peptides à la surface des LNC (correspondant à la différence en peptides avec la fraction libre dans le filtrat) reste significative après 24 h de dialyse, en comparaison avec la condition « peptide seul » montrant une libération de 100 % après seulement 1 h de dialyse.

Aucune différence significative n'est observée entre la fonctionnalisation des LNC blanches ou des LNC chargées en miR-155 (**Figure 13a**). De plus, entre les 2 méthodes, celle où le peptide est ajouté à l'eau de trempe (QW) montre une efficacité supérieure, avec une quantité finale de peptides en surface des LNC significativement plus importante pour la concentration initiale de 500 peptides/LNC (**Figure 13c**). Ainsi, la présence des lipoplexes de miARN insérés dans la coque des LNC ne perturbe pas l'adsorption du peptide.

Enfin, aucune différence significative de quantité finale de peptides en surface des LNC n'est observée pour les deux concentrations initiales de 500 peptides/LNC ou 1000 peptides/LNC.

Cette donnée indique une possible saturation des LNC à partir de 500 peptides/LNC. L'analyse du rendement de la fonctionnalisation montre en parallèle, que la concentration initiale de 500 peptides/LNC semble la plus adaptée avec un rendement de décoration de 71 % +/- 4 %, comparé à 34 % +/- 5 % pour la concentration de 1000 peptides/LNC, et une quantité finale de peptides de 339 +/- 21 /LNC comparée à 346 +/- 24 /LNC pour la concentration de 1000 peptides/LNC (**Figure 13b, d**).

Dans ce contexte, pour la suite des expérimentations, la concentration initiale de 500 peptides/LNC avec ajout direct dans l'eau de trempe (QW) sera la méthode choisie pour décorer les LNC par le peptide sLink-N.

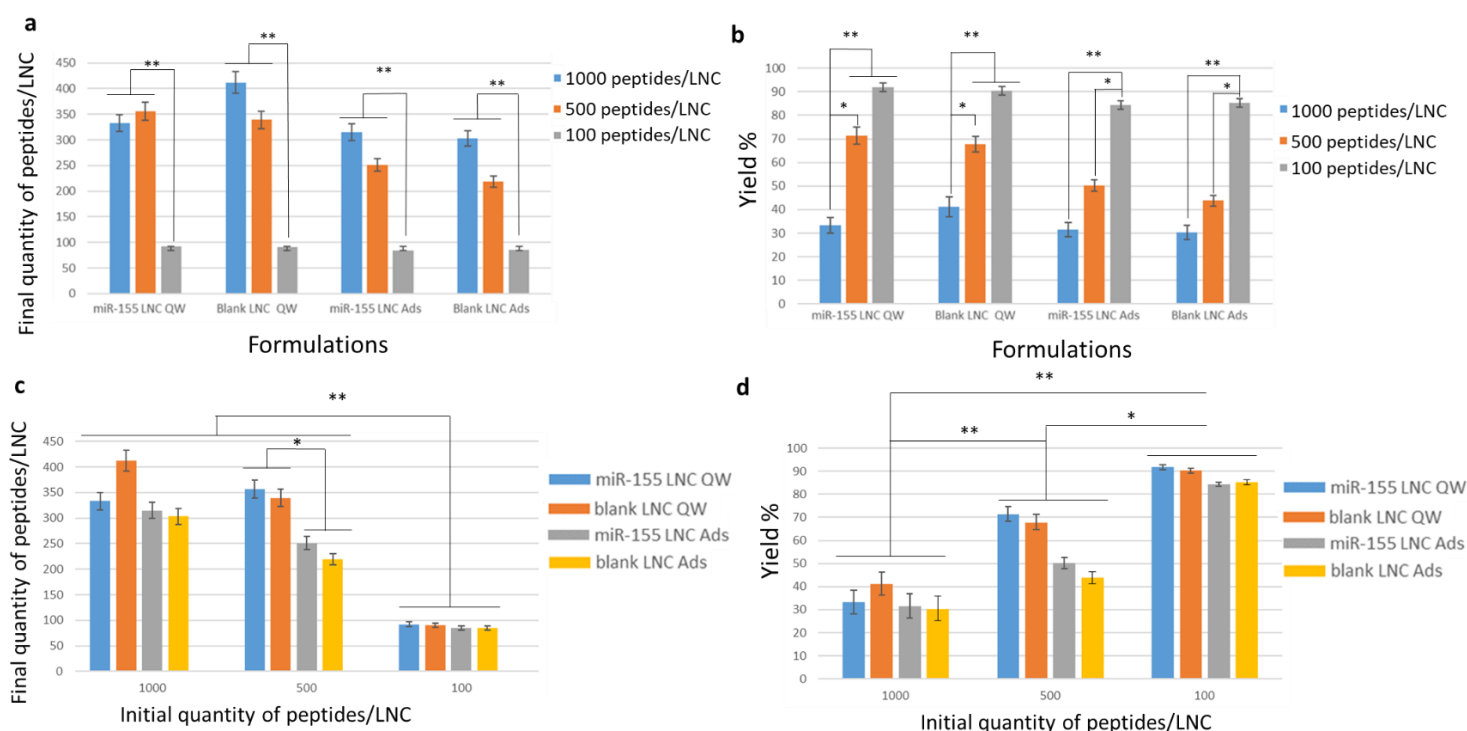


Figure 13 : Étude de la quantité de peptide finale en fonction de la concentration initiale ajoutée.

(a) Quantité finale de peptide après 24 h de dialyse en fonction du procédé de décoration : soit par ajout direct dans l'eau de trempe (QW) soit par ajout post-formulation (Ads). (b) Rendement de la fonctionnalisation par le peptide sLink-N en fonction du procédé de décoration. (c) Quantité finale de peptide après formulation en fonction de la quantité initiale de peptide ajoutée. (d) Rendement de la fonctionnalisation en fonction de la quantité initiale de peptide ajoutée. Statistiques réalisées sous R, Kruskal-Wallis * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

La stabilité de la décoration des LNC a été étudiée sur une période de 7 jours (**Figure 14**). Au cours des premières heures de dialyse, la quantité de peptides libérés, d'environ 30%, correspond aux peptides non-adsorbés. La condition contrôle avec le peptide seul est libéré à 100 % dans le PBS après seulement quelques heures. Les formulations réalisées après ajout

du peptide directement dans l'eau de trempe (QW) montrent une libération ralentie du peptide, comparée aux LNC fonctionnalisées post-formulation. Ainsi, après 48 h pour les LNC miR-155, 37,2 +/- 5,7 % de peptides sont libérés pour la condition QW contre 51,4 +/- 5,4% pour la condition Ads. Après 72 h, le pourcentage de peptides libérés s'approche des 80 % pour l'ensemble des formulations. Ces résultats démontrent une stabilité de la décoration d'une durée de 2 jours avec un meilleur taux de greffage pour les formulations réalisées par ajout du peptide dans l'eau de trempe (QW).

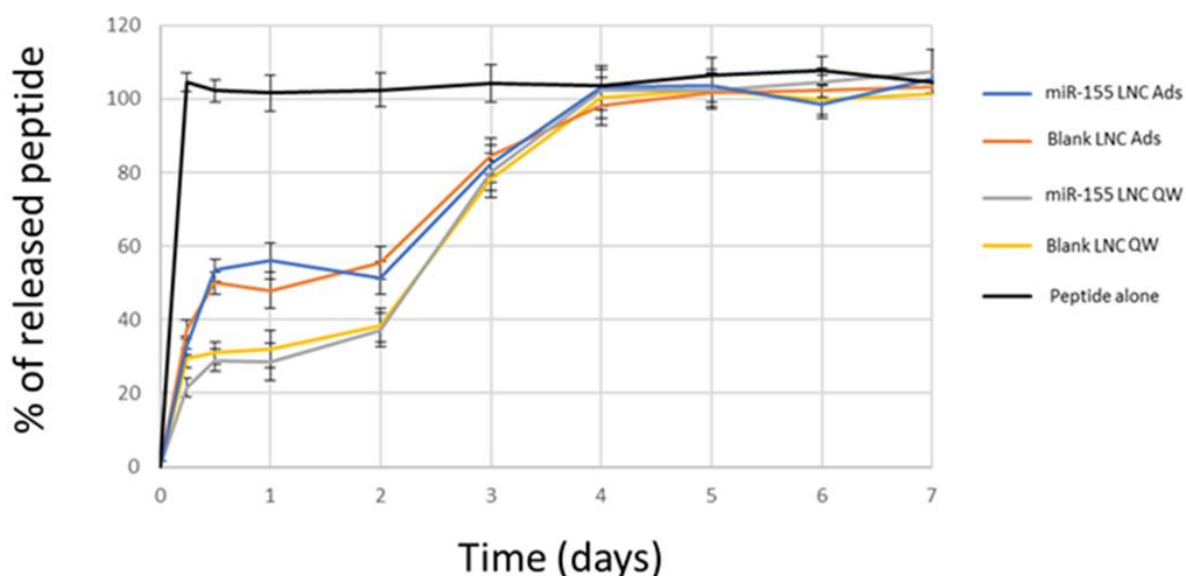


Figure 14 : Cinétique de libération du peptide sLink-N pendant 7 jours.

Étude du pourcentage de peptide sLink-N libéré pendant 7 jours pour chaque formulation : LNC blanches (Blank LNC) LNC miR-155 (miR-155 LNC) avec ajout du peptide dans l'eau de trempe (QW) et avec ajout du peptide post-formulation et agitation pendant 24h (Ads). Le contrôle est le peptide seul à la même concentration.

Caractérisation des LNC fonctionnalisées

Les LNC blanches fonctionnalisées avec le peptide sLink-N possèdent un diamètre de $50,5 \pm 3,4$ nm, un PDI de $0,02 \pm 0,02$ et un potentiel zêta neutre de $-1,7 \text{ mV} \pm 1,2 \text{ mV}$. Les LNC miR-155 présentent un diamètre de $74,1 \pm 6,1$ nm un PDI de $0,06 \pm 0,03$ et un potentiel zêta de $+10,9 \pm 4,5 \text{ mV}$. Ces derniers résultats sont conformes à ceux obtenus avec des LNC miR-155 non fonctionnalisés. Ainsi, la décoration de la surface des LNC avec le peptide ne change ni la taille des nanoparticules, ni leur charge en surface.

Activité métabolique et viabilité cellulaire

Après incubation pendant 24 h des différentes formulations, l'activité métabolique et la cytotoxicité de cellules oNP ont été étudiées *via* les tests MTT et LDH (**Figure 15a, b**). Comme précédemment observé avec les formulations non-décorées (Cf résultats article soumis IJP), un effet dose après traitement par les fLNC miR-155 est observé avec une activité métabolique de 91 % $\pm$ 7 % pour une concentration de 508 $\mu\text{g/mL}$ et de 41 % $\pm$ 3 % pour une concentration de 1337 $\mu\text{g/mL}$ en LNC. Parallèlement, aucune cytotoxicité n'a été observée pour l'ensemble des concentrations testées sur les cellules oNP. Le seuil maximum de 30 % de cytotoxicité défini dans la norme NF-ISO-10993-5 n'est jamais atteint après traitement par les fLNC miR-155. De plus, aucune différence significative d'activité métabolique ou de cytotoxicité n'a été observée (test de Kruskal-Wallis $p > 0,05$, $n = 3$) après décoration des LNC, confirmant l'absence de propriétés cytotoxiques du peptide sur les cellules étudiées.

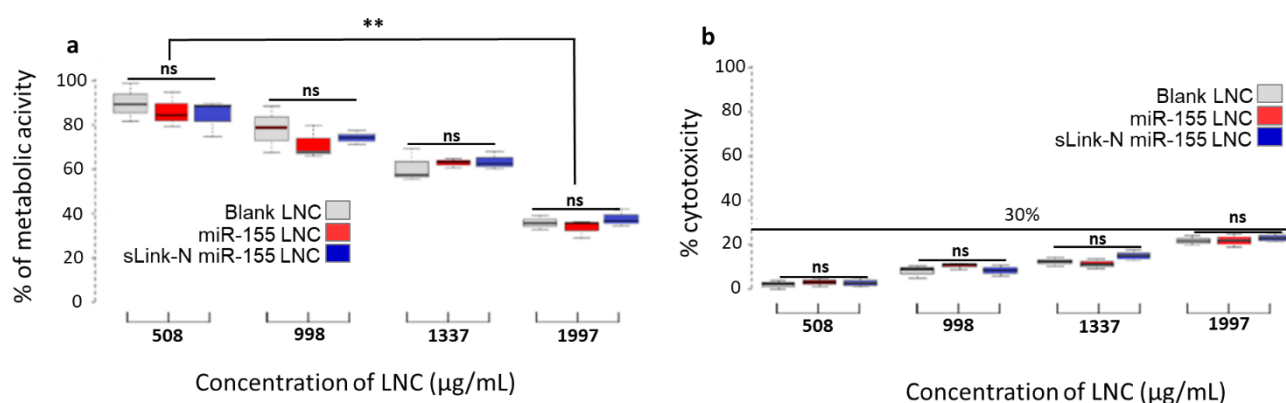


Figure 15 : Étude de l'activité métabolique et de la cytotoxicité des LNC.

Activité métabolique (test MTT, a) et cytotoxicité (test LDH, b) sur les cellules oNP après traitement pendant 24 h avec différentes concentrations de LNC blanches et de LNC chargées en miR-155 avec ou sans sLink-N (de 508 à 1997 $\mu\text{g/mL}$ dans le LNC). Les données sont représentées sous forme de moyennes $\pm$ SD ; aucune différence statistique n'a été observée entre les LNC blanches (en gris) et les LNC chargées en miR-155 décorées par le sLink-N (en bleu) ou non (en rouge). Test Kruskal-Wallis, $n = 3$ répétitions.

Étude de l'internalisation et influence potentielle du peptide sLink-N

Afin d'étudier l'internalisation des LNC au sein des cellules oNP, deux méthodes ont été utilisées : la cytométrie de flux pour une approche quantitative (**Figure 15**) et l'imagerie confocale pour une approche qualitative (**Figure 16**).

Comme attendu, aucune fluorescence dans le vert (Alexa-488) n'a été observée pour les conditions LNC blanches ou LNC ctrl miARN, et aucune fluorescence dans le rouge (DID) n'a été observée pour le miR-155 seul. De façon intéressante, aucune différence de profil

d'internalisation des LNC n'est observée entre les LNC blanches et les LNC chargées en miARN couplées ou non à une sonde fluorescente Alexa-488, indiquant que la sonde greffée sur le miR-155 ne modifie pas ses propriétés d'internalisation cellulaire une fois encapsulé dans les LNC. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus précédemment et soumis à publication dans le International Journal of Pharmaceutics.

Une augmentation significative de la fluorescence sur les canaux Alexa-488 et DID est observée au cours du temps après décoration des LNC miR-155. Néanmoins, aucune différence significative n'est observée avec ou sans peptide ce qui permet d'écarter l'hypothèse attendue que le peptide potentialise l'internalisation dans les cellules oNP, tout en ne modifiant pas la cinétique d'internalisation. Il est à souligner cependant que l'adsorption du peptide ne diminue pas l'internalisation cellulaire initiale des LNC qui était considérée comme déjà satisfaisante.

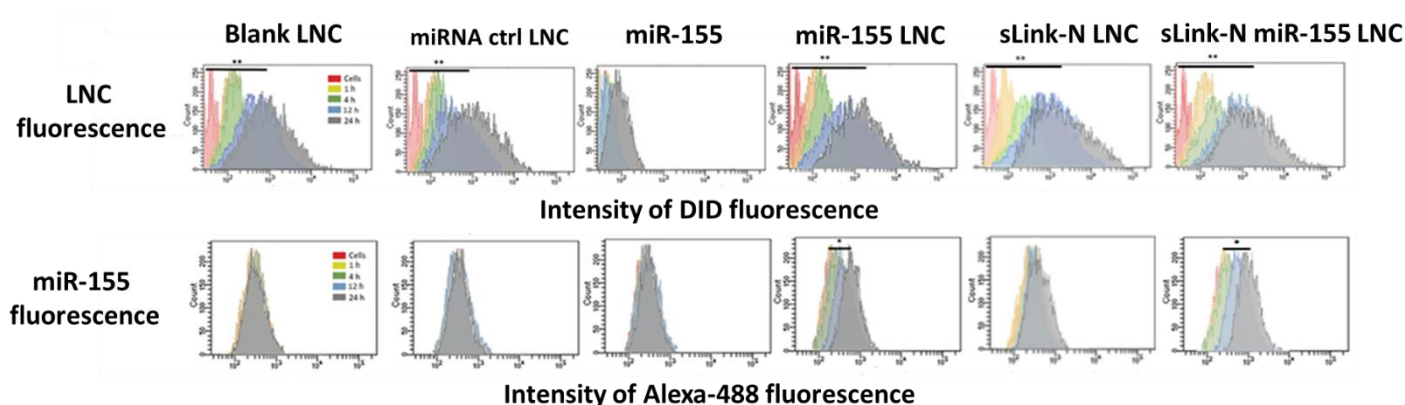


Figure 16 : Etude de l'internalisation des LNC en fonctions du temps en cytométrie en flux

Analyse par cytométrie en flux de l'internalisation des LNC fonctionnalisées ou non dans des cellules oNP après 1 h (jaune), 4 h (vert), 12 h (bleu) et 24 h (gris) de traitement par : LNC blanches (LNC-DID « blank LNC »), LNC miARN contrôle (« miRNA ctrl LNC » : LNC-DID avec miARN non marqué), miR-155 (miARN-Alexa-488), LNC miR-155 (« miR-155 LNC » : LNC-DID chargées en miARN-Alexa-488), sLink-N LNC (LNC-DID fonctionnalisées avec le sLink-N), sLink-N miR-155 LNC (LNC-DID chargées en miARN-Alexa-488 fonctionnalisées avec le sLink-N). Les cellules non traitées sont en rouge. Une concentration de 998 µg d'excipients/mL est utilisée dans chacune des conditions. n = 3 répétitions ; les valeurs médianes ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis et du test post hoc de Bonferroni *p<=0,05, **p<=0,01.

Pour confirmer les données générées par FACS, une analyse par microscopie confocale a été réalisée dans les mêmes conditions, après 24 h de traitement (**Figure 17**). La fluorescence rouge observée caractérisant le DID présent au cœur des LNC était comparable pour les LNC blanches, les LNC miR-155, les LNC miARN ctrl et les LNC miR-155 décorées par le peptide sLink-N, démontrant que l'internalisation cellulaire des LNC n'était pas affectée par la

fonctionnalisation en surface du peptide. Aucune fluorescence verte de l'Alexa-488 greffée au miR-155 n'a été observée lorsque le miARN n'était pas formulé au sein des LNC, confirmant à nouveau la nécessité d'une stratégie de vectorisation afin que le miARN hydrophile puisse pénétrer la barrière cellulaire quelle qu'elle soit. Comme précédemment déterminé, une localisation cytoplasmique des LNC est observée et l'ajout du peptide sLink-N ne montre pas d'influence sur cette localisation. Le score de Pearson obtenu est de 0,79 pour les LNC miR-155 et de 0,75 pour les LNC miR-155 sLink-N, ce qui correspond à une colocalisation statistiquement forte des fluorescences vertes et rouges pour les deux formulations à 24 h, montrant une colocalisation du miARN et des LNC à 24 h.

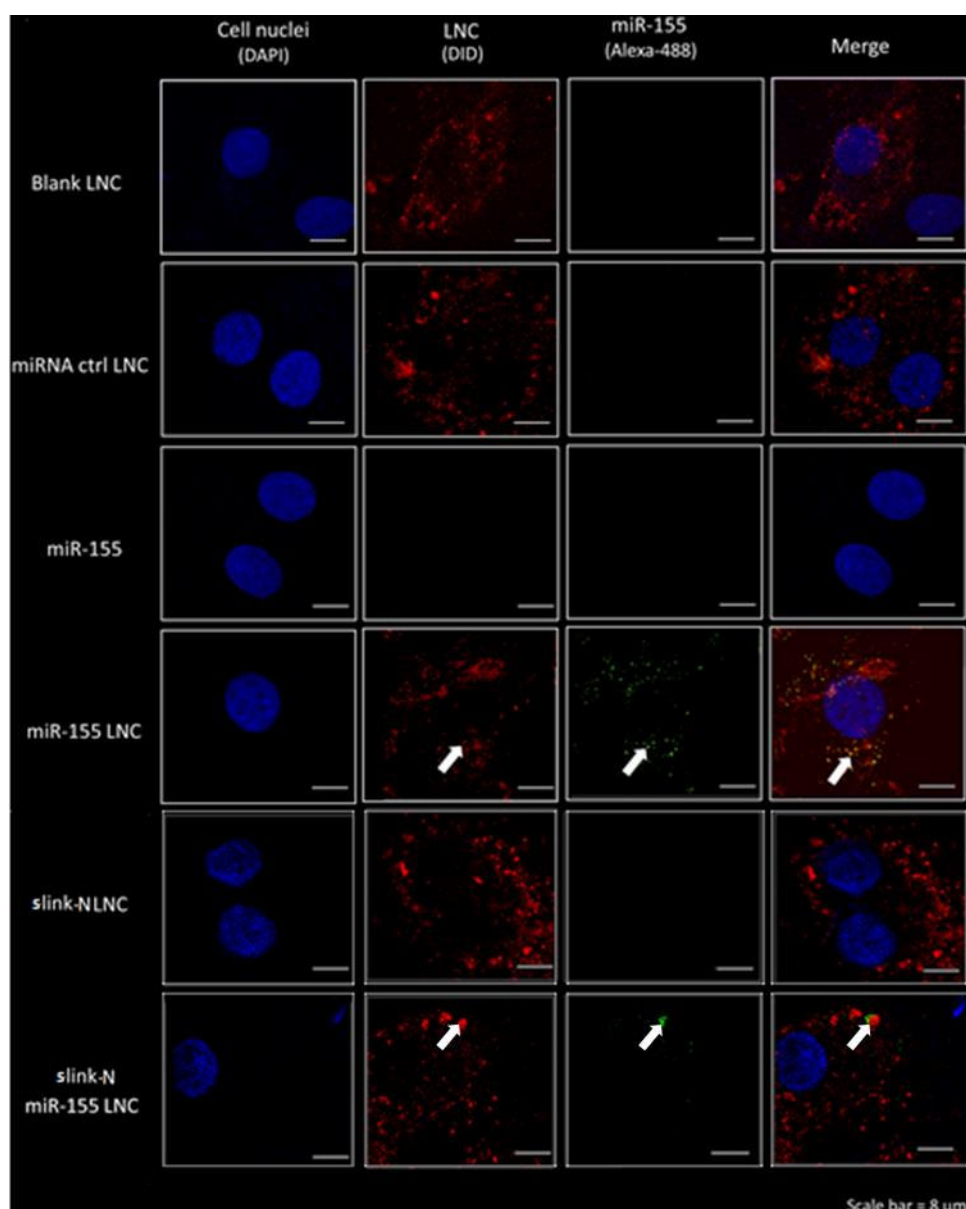


Figure 17 : Etude de l'internalisation à 24h par imagerie confocale.

Images obtenues par microscopie confocale représentatives de l'internalisation cellulaire dans les cellules oNP de différentes formulations : LNC blanches (« blank LNC »), LNC miARN contrôle ("miRNA ctrl LNC"), miR-155, miR-155 LNC, sLink-N LNC, sLink-N miR-155 LNC, après 24 h d'incubation à 998 µg d'excipients/mL. Noyau en bleu ; LNC-DID en rouge ; miARN en vert. La colonne « merge » correspond aux conditions de fluorescences en DID et en Alexa-488 superposées : la couleur orange, correspond à une colocalisation du miRNA et de la LNC mise en évidence par les flèches blanches. Barre d'échelle = 8 µm. n = 3.

Activité biologique du miR-155

Pour confirmer la bioactivité du miR-155 dans les cellules oNP après décoration de la surface des LNC (**Figure 18**), l'expression du gène ERK1/2 et la synthèse de la protéine ERK1/2 ont été étudiées par RT-qPCR et western blot. Nous observons, dans les conditions miR-155, LNC blanches et LNC miARN ctrl une expression de ERK1/2 similaire à celle du contrôle cellulaire. De plus, les LNC miR-155 décorées par le sLink-N induisent une baisse drastique de ERK1/2 aussi bien au niveau de l'expression génique (**Figure 18a**) qu'au niveau de l'expression protéique (**Figure 18b**), comparable à la formulation non-décorée, prouvant que la fonctionnalisation avec le sLink-N permet de conserver la bioactivité du miR-155.

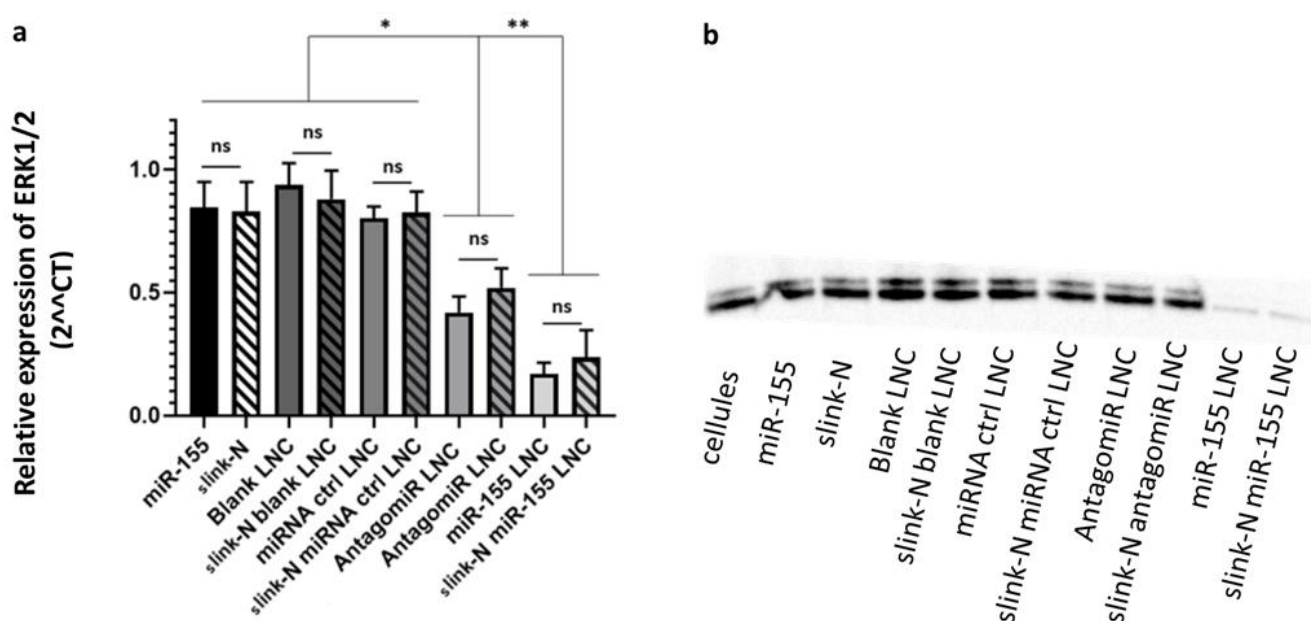


Figure 18 : Bioactivité du miR-155.

(a) Résultats de RT-qPCR (a) et de western blot (b), dans des cellules oNP, obtenus après 24 h de traitement avec miR-155, LNC miARN contrôle, LNC blanches, miR-155 LNC, chacune des formulations étant ou non décorée avec le peptide sLink-N (998 µg/mL dans LNC). Les résultats présentés sont des moyennes +/- SD par rapport au contrôle cellulaire. L'analyse statistique a été réalisée par comparaison des 2^{ΔΔCt} ; ** p < 0,01, en utilisant le test de Kruskal-Wallis.

4. Discussion et conclusion

L'objectif de cette étude était de fonctionnaliser la surface des LNC par le peptide sLink-N, ceci afin d'améliorer l'internalisation des LNC dans les cellules du NP de brebis, et de permettre de disposer d'un effet anabolique cumulatif sur la MEC du fait de l'action du sLink-N et du miR-155.

Les LNC sont des nanovecteurs prometteurs pour le transport de matériel génétique et ont été utilisés dans de nombreuses études et notamment très récemment dans le développement des vaccins contre la Covid-19 (David, Resnier, *et al.*, 2012b, 2012b; Thomas and Lagarce, 2013; Pfizer, 2020). Cependant, l'utilisation de nanoparticules lipidiques pour la délivrance de matériel génétique dans le DIV n'a jamais été, à notre connaissance, réalisée. Aussi, avoir à disposition une plateforme nanoparticulaire chargée en miARN et décorée ou non en surface selon le besoin, s'avère être une approche idéale pour atteindre l'objectif thérapeutique fixé, qui est ici de lutter contre le processus de dégénérescence discale (DD). Les propriétés du sLink-N ont été bien établies dans la littérature. Ces propriétés sont médiées par les interactions avec les cellules du NP *via* le récepteur BMPRII (Hodgkinson *et al.*, 2020). Ainsi, des effets bénéfiques dans le traitement contre la DD ont été démontrés, après fixation au récepteur BMPRII, avec l'activation de différentes voies anaboliques et conduisant à une augmentation des quantités de protéoglycanes (agrécan) et de collagène de type II, les deux composants majoritaires de la MEC du DIV (AlGarni *et al.*, 2016). L'hypothèse énoncée consistait ainsi à fonctionnaliser les LNC afin de permettre une meilleure internalisation cellulaire et un effet anabolique cumulatif avec le miR-155.

Dans cette étude, la capacité du peptide sLink-N à agir comme un ligand permettant une meilleure efficacité d'internalisation pour les cellules du NP a été évaluée. La méthode de fonctionnalisation testée en premier fut l'adsorption au regard des contraintes des autres méthodes communément utilisées comme le couplage covalent (multiplicité des étapes, utilisation de solvants et de réactifs qu'il est nécessaire d'éliminer pour envisager une application *in vivo*, risque de blocage des sites d'interaction du peptide avec son récepteur (Karim *et al.*, 2018). Dans ce contexte, l'adsorption fut étudiée selon deux approches différentes : soit le peptide fut ajouté dans l'eau de trempe en même temps que les lipoplexes, soit le peptide fut ajouté post-formulation et agitation pendant 24 h. La concentration optimale de 500

peptides/LNC a pu être déterminée et les résultats montrent une efficacité de décoration supérieure avec la méthode consistant à l'ajout directement dans l'eau de trempe. Ces données sont en accord avec la littérature (Barbari *et al.*, 2017) et peuvent être expliquées par le fait que l'ajout du peptide au moment de la zone d'inversion de phase, c'est-à-dire lorsque la microémulsion composée d'un réseau de micelles cylindriques est brisée et forme les nanocapsules, permet vraisemblablement une interaction plus en profondeur du peptide hydrophile dans le bouclier des chaînes d'hydroxystéarate de PEG, constituant la coque des LNC. Ces résultats coïncident également avec les résultats de Karim *et al.* qui montraient une adsorption possible du peptide NFL à la surface des LNC allant de 250 à 1250 peptides/LNC (Karim *et al.*, 2018). Néanmoins, dans cette étude, seule l'adsorption post-formulation avait été étudiée.

Le nombre de peptides fonctionnalisés sur nos LNC miR-155 est également en accord avec la littérature et permettait d'envisager avec sérénité les expérimentations futures d'internalisation. En effet, V. Torchilin, un des pionniers dans la fonctionnalisation de surface des liposomes, avait déterminé qu'environ 500 peptides TAT, un peptide pénétrant, à la surface d'un liposome était largement suffisant afin d'obtenir une amélioration de l'internalisation cellulaire de ces liposomes décorés (Torchilin *et al.*, 2001). De plus, l'ajout d'un nombre de peptides trop important peut entraîner un encombrement stérique provoquant l'effet inverse de celui désiré et empêchant la nanoparticule d'entrer dans les cellules cibles.

Les résultats obtenus ont permis de montrer une absence d'influence significative de la décoration sur les caractéristiques de taille, de potentiel zêta, d'efficacité d'encapsulation et de charge en miR des LNC. Cette absence d'influence peut être expliquée en partie par la faible taille du peptide (8 acides aminés). L'absence d'influence sur la charge des LNC décorées, malgré une charge globale de +1 pour le peptide seul, peut s'expliquer par la localisation du peptide à la surface de la LNC. La charge est ainsi probablement écrantée par les chaînes d'hydroxystéarate de PEG.

De façon peu satisfaisante, la stabilité de la fonctionnalisation des LNC a ensuite été déterminée et montre une stabilité limitée à 2 jours dans des conditions *in vitro*. Cette durée nous a néanmoins permis de réaliser l'ensemble des expérimentations (d'une durée de 24 h) sur les cellules oNP de cytocompatibilité, d'internalisation ou encore de bioactivité du miARN. Néanmoins, cette faible durée de stabilité risque de poser des difficultés quant à une utilisation pour de futures expérimentations pré-cliniques et cliniques, obligeant à des formulations

répétées au cours du temps afin de disposer des lots de traitement. Cette difficulté n'est pas retrouvée avec la formulation des LNC miR-155 non fonctionnalisées, qui disposent d'une stabilité de plus de 30 jours entre +2 et +8°C (données non montrées). Afin de lever cet obstacle, un changement de méthode de décoration pourrait être envisagé, notamment par des approches de greffage covalent. En effet, contrairement à une décoration par adsorption, conséquence d'interactions faibles avec les LNC, le greffage covalent permettrait d'assurer la stabilité de la décoration. Ainsi, un couplage covalent simple, sans solvant, pourrait être envisagé. Dans cette optique, la chimie « click » pourrait être envisagée. Ce concept de chimie « click », introduit par le prix Nobel de chimie K. Barry Sharpless en 2001, est le produit de la réaction entre une fonction azoture et une fonction alcène ou alcyne. Elle a été utilisée dans de nombreuses études pour la fonctionnalisation de nanoparticules (Takayama, Kusamori and Nishikawa, 2019; Yáñez-Sedeño *et al.*, 2019). Sur le principe, si nous souhaitons l'appliquer à la décoration des LNC, un DSPE-PEG-N₃ pourrait être post-inséré dans la LNC, et une fonction alcyne ajoutée à la séquence peptidique. Une autre option serait d'utiliser la réaction thiol-maléimide, une addition de Michael, afin de générer un thiosuccinimide. Un DSPE-PEG-maléimide devra être post-inséré, et un acide aminé possédant un thiol ajouté à la séquence peptidique, comme la cystéine.

Une autre option peut également être envisagée, qui est maîtrisée au sein du laboratoire MINT. Il s'agit de la méthode de transacylation brevetée en 2010 par Benoit et Perrier (Perrier, Saulnier and Benoît, 2010). Cette transacylation consiste en une réaction entre la fonction amine N-terminale du peptide et la fonction ester de l'hydroxystéarate de PEG. Ce procédé de décoration semblerait adapté à la décoration des LNC par le peptide sLink-N.

De façon intéressante, les résultats de cytocompatibilité sur les cellules oNP ont montré que l'ajout du peptide sur les LNC n'avait pas d'influence notable : le profil d'internalisation avec les LNC fonctionnalisées ne changeait pas comparées aux LNC non modifiées. Une hypothèse serait que la fonctionnalisation ne soit pas stable dans le milieu de culture et le peptide serait libéré de la LNC à 100 % en moins de 24 h, empêchant sa potentielle action. Une étude de libération dans le milieu de culture, en remplacement du PBS, devra donc être réalisée. Néanmoins, la quantification, par exemple par HPLC, d'un peptide spécifique dans un mélange complexe protéique comme un milieu de culture est très difficile. Un prétraitement de l'échantillon pour précipiter les protéines du milieu et éliminer une grande composante des pics qui

pourraient masquer celui du peptide pourrait être envisageable, avec une détection en UV, ou en masse. Une autre hypothèse serait que la quantité de peptides à la surface des nanoparticules serait trop importante et provoquerait un encombrement stérique qui ne permettrait pas au peptide de se fixer à son récepteur. Différentes concentrations initiales plus faibles comme 10 peptides/LNC, 50 peptides par LNC et 100 peptides/LNC pourront être étudiées et l'internalisation cellulaire pourra être quantifiée en FACS pour déterminer une potentielle amélioration de la quantité de LNC internalisées, à un instant t.

Certes, la fonctionnalisation n'améliore pas la quantité de LNC qui pénètre dans la cellule mais pour autant ne la réduit pas. Ces résultats sont confirmés par les résultats de bioactivité du miR-155 précédemment décrit qui ne montre pas de changement avec la fonctionnalisation. Il serait intéressant de vérifier la bioactivité du miR-155 sur ses autres cibles (précédemment décrites) dans le DIV soit par western blot soit par immunofluorescence sur culture cellulaire ou sur le modèle *ex vivo* précédemment décrit (Frapin *et al.*, 2020). De plus, une étude de la production d'agrécan et de collagène de type II sur le modèle *ex vivo* pourrait apporter des informations importantes sur le potentiel régénératif des LNC miR-155. Ce genre d'étude pourrait aussi permettre d'évaluer le potentiel effet synergique entre les LNC miR-155 et le peptide slink-N qui est décrit comme augmentant la synthèse de MEC au niveau du DIV (Al-Garni *et al.*, 2016). L'obtention de ces résultats pourraient permettre d'envisager une étude clinique vétérinaire pour les formulations avec le peptide slink-N.

Pour conclure, La fonctionnalisation des LNC miR-155 avec le peptide slink-N possède un important potentiel thérapeutique aux vues des effets de chacun pris séparément. Néanmoins, la stabilité de fonctionnalisation en vue d'une application clinique doit être améliorée. De plus, les LNC miR-155 possèdent un profil d'internalisation déjà intéressant en vue d'application clinique, une fonctionnalisation n'apportant pas d'effet thérapeutique supplémentaire n'aurait donc que peu d'intérêt. En effet, le DIV étant très peu vascularisé, la possibilité *via* une injection intradiscale de cibler des cellules non désirées est très faible. Néanmoins, le DIV étant très riche en protéines, lors de nos prochaines études *in vivo*, il faudra apporter une attention particulière à la formation d'une protéine corona (Park, 2020). En effet, la formation de celle-ci peut entraîner une modification de l'effet des nanoparticules par blocage de l'interaction des LNC avec la membrane cellulaire, la nature de cette corona pouvant être modifiée en fonction de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules. Pour autant, si les LNC miR-

155 démontrent un effet thérapeutique *in vivo* et que les résultats sur le potentiel synergique de la fonctionnalisation sont intéressants, la fonctionnalisation pourra donc être conservée.

PARTIE III :
DISCUSSION - PERSPECTIVES
CONCLUSION

I. Discussion - Perspectives

La LNC est un système nanoparticulaire particulièrement étudié depuis les années 2000 et la formulation de ces nano-objets est devenue optimale au cours du temps, avec un procédé de formulation simple, sans solvant et ne nécessitant que très peu d'énergie. Les paramètres physico-chimiques des LNC sont bien maîtrisés et permettent une reproductibilité parfaite des formulations. Depuis les années 2010, les LNC se sont révélées comme vecteur potentiel d'acides nucléiques et ont démontré des propriétés intéressantes notamment en termes de charge en matériel génétique et de protection enzymatique (David *et al.* 2012.) Cette possibilité d'encapsuler des acides nucléiques hydrophiles n'étant pourtant pas triviale, la LNC possédant un cœur lipophile. Mais la formulation de lipoplexes fut la clé de ce procédé (David, Resnier, *et al.*, 2012b). Depuis, les capacités d'encapsulation et de délivrance de siARN par des LNC ont pu être démontrées, mais notre étude représente la première qui permet de transposer l'intérêt des LNC pour vectoriser un miARN. Ainsi, la formulation et la caractérisation d'un tel système sont aujourd'hui bien maîtrisées. La cytocompatibilité, les propriétés d'internalisation au sein de cellules d'intérêt, ainsi que le maintien de l'activité biologique du miARN ont pu également être démontrées. Enfin, la sécurité et la faisabilité d'utilisation d'un tel système chez un modèle gros animal ont pu être démontrées. De prochaines étapes peuvent être envisagées, comme des études pré-cliniques à grande échelle. Ainsi, ces études pourront permettre de déterminer la dose optimale en miR-155. Une autre étape à envisager est la co-encapsulation de miR, associé au miR-155, au sein des LNC. En effet, la DD est une maladie multifactorielle impactant de nombreuses voies cellulaires lors du processus dégénératif (Henry *et al.*, 2018c). L'ajout de plusieurs miARN pourrait permettre de cibler ces voies métaboliques simultanément et d'induire un effet synergique et cumulatif pour contrecarrer ce processus de DD. Parmi les miARN identifiés, le miR-146 et le miR-34a, pour leurs activités complémentaires au miR-155 (Chen *et al.*, 2015; R.-S. Yang *et al.*, 2019b; H. Zhu *et al.*, 2021), pourraient être intéressants.

Dans la conception des LNC, il est classiquement discuté « le dilemme de la PEGylation ». En effet, la PEGylation d'une nanoparticule permet l'ajout d'un bouclier hydrophile, réduisant ainsi l'opsonisation et l'élimination du vecteur de façon prématurée, et induit donc une demi-vie prolongée après injection systémique. Néanmoins, la PEGylation peut entraîner un

encombrement stérique, réduisant ainsi l'internalisation des nanoparticules par les cellules cibles. D'autre part, l'injection systémique répétée de formulations PEGylée induit une réponse immunitaire spécifique entraînant la production d'anticorps anti-PEG, et l'élimination rapide du vecteur PEGylé (Sanchez *et al.*, 2017). Dans le cas de notre approche de médecine régénératrice, ce « dilemme de la PEGylation » occupe une importance très limitée, du fait d'une injection *in situ* dans le DIV, et non systémique. De plus, le DIV présente une caractéristique de privilège immunitaire, qui s'accompagne d'une absence de réponse immunitaire (Roberts *et al.*, 2006). L'internalisation efficace des LNC sur deux types cellulaires du DIV, démontrée dans notre étude, permet d'envisager avec sérénité l'utilisation discorde de ces LNC chargées en miR-155. Enfin, autre argument en faveur d'une moindre importance de la pégylation dans le cas de notre stratégie, est l'utilisation lors de la formulation des LNC d'HS-PEG constitué d'un nombre limité d'unités d'éthylène glycol (8 unités), permettant de limiter l'encombrement stérique hydrophile en surface responsable de la diminution de l'internalisation cellulaire décrite classiquement dans la littérature (Bao *et al.*, 2013; Juang *et al.*, 2019).

Pour améliorer la formulation et obtenir un vecteur spécifique des cellules d'intérêt, que sont les cellules du NP, la possibilité d'une fonctionnalisation en surface des LNC a été étudiée. Décoration non-covalente, par adsorption physico-chimique du peptide sLink-N sur les LNC, celle-ci a pu être réalisée avec succès. Néanmoins, l'amélioration des propriétés d'internalisation des fLC miR-155 sur des cellules de NP n'a pu être démontrée. Au regard de ces résultats négatifs, différentes options peuvent être proposées afin d'améliorer cette internalisation. La première option relève du choix éventuel d'un autre peptide d'intérêt (Breugst and Reissig, 2020). Tout d'abord le chondrocyte affinity peptide (CAP) pourrait être un bon candidat. Il possède une affinité spécifique pour les chondrocytes articulaires, et a démontré pouvoir augmenter l'internalisation de nanoparticules *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Pi *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018). Au regard de la proximité phénotypique des cellules du NP avec les chondrocytes articulaires, l'utilisation du CAP semble pertinente. Un autre peptide peut également être proposé. Il s'agit du Peptide Natriurétique de type C (CNP) qui présente des effets bénéfiques sur la réparation de la MEC et des effets anti-inflammatoires (Peake *et al.*, 2014). Si ces peptides ne permettent pas l'amélioration de l'internalisation cellulaire, alors l'utilisation de peptides pénétrants pourrait être proposée. En effet, l'utilisation d'un peptide tel que le Pepfect14 a déjà démontré son efficacité dans l'amélioration de la pénétration cellulaire de technologie

de délivrance de matériel génétique (Falato, Gaston and Langel, 2022, p. 14). La seconde option pour améliorer l'internalisation des fLNC miR-155 s'intéresse aux modalités technologiques de décoration, que sont les approches de chimie « click » ou de la transacylation, évoquées précédemment dans la partie II-paragraphe III.

L'ensemble des expérimentations *in vitro* souffre toujours d'un manque de transposition avec ce qu'il se passe réellement *in vivo*. Ainsi, l'utilisation de modèles *ex vivo* et *in vivo*, pour évaluer l'intérêt des approches thérapeutiques, reste indispensable. L'utilisation d'un modèle *ex vivo* de DIV est ainsi de plus en plus souvent envisagée. Récemment un modèle *ex vivo* de DIV ovine a été développé au sein du laboratoire RMeS, en collaboration avec L'AO Foundation de Davos, en Suisse (Li *et al.*, 2020). En effet, les modèles *ex vivo* permettent de limiter le recours à l'expérimentation animale, tout en étant plus complet qu'un simple modèle de monoculture cellulaire en 2D et permettant ainsi de tirer des conclusions rapides sur l'efficacité du traitement d'intérêt (Lotz 2004; Alini *et al.* 2008). L'utilisation de ces modèles *ex vivo* s'inscrit ainsi dans la stratégie des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) consistant à diminuer le nombre d'animaux utilisés à des fins de recherche expérimentale, et également à améliorer les conditions animales. Il s'agit, cependant, de modèles complémentaires et non d'une alternative totale aux modèles animaux. Les modèles *ex vivo* ne tiennent pas compte en effet des contraintes mécaniques du DIV retrouvées *in vivo*. L'utilisation du modèle *ex vivo* permettrait néanmoins d'évaluer l'internalisation des LNC et l'effet d'une potentielle décoration en surface des LNC et enfin d'étudier l'impact de l'injection intradiscale des LNC chargées en miRNA.

Bien qu'instructives, les expérimentations sur modèle *ex vivo* devront être suivies ensuite d'expérimentations *in vivo* sur des modèles de DD adaptés. Différents modèles sont disponibles avec des avantages et des inconvénients pour chacun (Fusellier *et al.*, 2020). Parmi ces modèles, la brebis a fait l'objet de nombreuses investigations ces dernières années au sein du laboratoire RMeS, en collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS) (Bouhsina *et al.*, 2021). Ainsi, ce modèle a d'ores et déjà été utilisé pour réaliser une étude de sécurité et de faisabilité de l'injection de LNC miR-155. Au-delà des modèles animaux pré-cliniques, les animaux de compagnie peuvent également être particulièrement touchés par la DD et les douleurs lombaires. C'est le cas des chiens qui constituent des patients potentiels pour la réalisation des futurs essais cliniques vétérinaires, à l'instar des études cliniques humaines. Dans ce contexte, un financement du RFI Bioregate – Région Pays de la Loire

« Tremplin clinique vétérinaire » appelé « DISCODOG » a été obtenu et les premières inclusions sont actuellement en cours. Cet essai clinique vétérinaire, randomisé, en aveugle, vise à démontrer la faisabilité, la sécurité et l'efficacité préliminaire des LNC chargées en miR-155 dans la prévention de la DD canine. Deux bras de traitements sont ainsi proposés : LNC blanches versus LNC miR-155. Préalablement aux premières inclusions, l'étude de sécurité et de faisabilité chez la brebis, déjà évoquée, a permis d'envisager avec sérénité le traitement des premiers chiens. Ce fut aussi pour moi, dans le cadre de ma thèse, l'occasion de développer l'ensemble du processus de préparation des lots de traitement en LNC blanches et LNC miR-155 selon des règles de bonnes pratiques de fabrication afin de disposer d'un traitement « GMP like ». La détermination et la rédaction de l'ensemble des protocoles de contrôle qualité (contrôle microbiologique, tests d'apirogénicité), et de formulation/caractérisation des LNC miR-155 ont ainsi été menées. Ce projet DISCODOG est co-porté par le Dr. Marion Fusellier, et le Pr. Johann Clouet (PU-PH) du laboratoire RMeS en collaboration avec le Dr. Élise Lepeltier du laboratoire MINT. Le projet DISCODOG devrait permettre d'ouvrir de nouvelles perspectives dans le traitement de la DD tant chez le chien que chez l'homme au regard des similitudes physiopathogéniques observées entre ces deux espèces (Decante *et al.*, 2021).

Ce projet s'inscrit donc dans un contexte plus large de développement de stratégies thérapeutiques pour une utilisation en clinique humaine. Afin d'envisager cette perspective, nous devons nous poser la question du transfert d'échelle de la production des LNC miARN. Cette démarche a déjà été réalisée au sein du laboratoire MINT en démontrant que le procédé de fabrication des LNC était transposable à un volume de l'ordre du litre, tout en conservant les paramètres physico-chimiques des LNC (Thomas and Lagarce, 2013). Cette même démarche devra être réalisée sur des formulations contenant du miARN afin de valider cette approche. Il est à noter que le volume injecté serait de l'ordre de 200 μ L par DIV chez l'humain. De plus, les LNC devront être formulées et contrôlées dans des conditions GMP adaptées à la clinique humaine. L'utilisation d'une salle blanche sera donc nécessaire et les tests mis en place pour le projet DISCODOG pourront être adaptés aux réglementations chez l'humain. Les composants utilisés dans la formulation sont déjà certifiés par la FDA pour une utilisation chez l'humain et nous permettent donc d'envisager cette perspective. Dans l'objectif de l'évolution de cette stratégie vers la clinique humaine, le stade de DD à traiter devra également être bien défini. En effet, notre stratégie s'inscrit dans un contexte où des cellules sont encore

présentes afin de garantir un effet du miR-155 délivré par les LNC. Un stade de DD peu avancé sera donc souhaité. Il s'agira ainsi de patients dont le stade de DD répond aux stades II et III de la classification de MODIC (Modic *et al.*, 1988). Un des points à prendre en compte sera la présence de signes cliniques associés. En effet, une image significative d'une DD ne se manifeste pas systématiquement par des symptômes douloureux chez les patients (Maher, Underwood and Buchbinder, 2017). Notre stratégie se base donc sur une approche « préventive », avant d'atteindre un état tardif de dégénérescence, dont l'issue sera une prise en charge chirurgicale (de type arthrodèse ou arthroplastie). L'utilisation d'une telle approche, en amont des approches chirurgicales, permettra néanmoins de retarder le recours à celles-ci et de limiter leurs effets indésirables (Shaw *et al.*, 2019). Ralentir le processus de dégénérescence, voire une régénérescence du tissu discal sont des objectifs clairement annoncés avec l'utilisation des LNC miR-155, tout en tenant compte de l'origine multifactorielle de la DD. Le futur de la médecine régénératrice pour lutter contre la DD sera donc peut être de combiner différentes stratégies afin d'agir sur différentes composantes (cellulaire, génique, anabolique, structural, ...).

II. Conclusion

En conclusion de ce travail, le développement d'une stratégie de réparation du DIV basée sur l'injection intradiscale de nanoparticules permettant la délivrance de miARN thérapeutiques, répond à un concept particulièrement innovant et prometteur. Cette approche permettrait par le biais de l'activation des cellules du NP de reconstruire la MEC.

Le développement de LNC miARN et plus spécifiquement des LNC miR-155 a été une étape primordiale pour confirmer la faisabilité de cette stratégie thérapeutique. Les LNC miR-155 ont été formulées et caractérisées avec succès et possèdent des caractéristiques appropriées pour permettre la délivrance du miARN au niveau intracellulaire. Les études *in vitro* ont confirmées la capacité des LNC à protéger et à libérer le miR-155, tout en permettant une internalisation totale sur deux modèles cellulaires (hASC et oNP) et en conservant la bioactivité du miR-155. La faisabilité et la sécurité de l'injection intradiscale de cette formation ont été démontrées dans un modèle ovin, après injection intradiscale de LNC et de LNC chargées en miR-155. En parallèle, nous avons pu démontrer que la fonctionnalisation en surface des LNC était possible par adsorption du peptide sLink-N, et bien que l'internalisation cellulaire ne fut pas améliorée, les mêmes propriétés biologiques furent démontrées avec ce peptide en surface, peptide qui devrait avoir un intérêt thérapeutique complémentaire au miARN et qui devra être démontré.

Les prochaines étapes consistent à confirmer la bioactivité du miR-155 au sein de DIV de brebis au sein de modèles *ex vivo* ou *in vivo*. Les résultats de l'étude clinique vétérinaire DISCO-DOG permettra également d'obtenir des informations indispensables avant d'envisager une transposition en clinique humaine : à noter que c'est la première fois que les LNC feront l'objet d'une phase clinique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acosta, F.L. *et al.* (2011) 'Porcine Intervertebral Disc Repair Using Allogeneic Juvenile Articular Chondrocytes or Mesenchymal Stem Cells', *Tissue Engineering Part A*, 17(23–24), pp. 3045–3055. doi:10.1089/ten.tea.2011.0229.

Adams, D. *et al.* (2018) 'Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis', *New England Journal of Medicine*, 379(1), pp. 11–21. doi:10.1056/NEJMoa1716153.

Adams, M.A. and Roughley, P.J. (2006) 'What is intervertebral disc degeneration, and what causes it?', *Spine*, 31(18), pp. 2151–2161. doi:10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c.

Ahmadzada, T., Reid, G. and McKenzie, D.R. (2018) 'Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer.', *Biophysical reviews*, 10(1), pp. 69–86. doi:10.1007/s12551-017-0392-1.

Airaksinen, O. *et al.* (2006) 'Chapter 4. European guidelines for the management of chronic nonspecific low back pain', *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*, 15 Suppl 2, pp. S192–300. doi:10.1007/s00586-006-1072-1.

Akinc, A. *et al.* (2019) 'The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs', *Nature Nanotechnology*, 14(12), pp. 1084–1087. doi:10.1038/s41565-019-0591-y.

AlGarni, N. *et al.* (2016) 'Short Link N Stimulates Intervertebral Disc Repair in a Novel Long-Term Organ Culture Model that Includes the Bony Vertebrae', *Tissue Engineering. Part A*, 22(21–22), pp. 1252–1257. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0115.

Anderson, P.A. and Rouleau, J.P. (2004) 'Intervertebral disc arthroplasty', *Spine*, 29(23), pp. 2779–2786. doi:10.1097/01.brs.0000146460.11591.8a.

AnGes, Inc. (2020) *A Phase 1b, Multicenter, Double-blind, Randomized, Placebo-controlled, Single Ascending-Dose, Clinical Study Evaluating the Safety, Tolerability and Exploratory Efficacy of a Targeted Single Injection of an Intradiscal Nuclear Factor- κ B Decoy Oligodeoxynucleotide (AMG0103) in Subjects With Chronic Discogenic Lumbar Back Pain*. Clinical trial registration study/NCT03263611. clinicaltrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03263611> (Accessed: 9 September 2021).

Araldi, E. *et al.* (2013) 'Therapeutic Potential of Modulating microRNAs in Atherosclerotic Vascular Disease.', *Current vascular pharmacology* [Preprint].

Bai, D.-Y. *et al.* (2019) 'Total disc replacement versus fusion for lumbar degenerative diseases - a meta-analysis of randomized controlled trials', *Medicine*, 98(29), p. e16460. doi:10.1097/MD.00000000000016460.

Bai, Z. *et al.* (2019) 'Non-viral nanocarriers for intracellular delivery of microRNA therapeutics', *Journal of Materials Chemistry B*, 7(8), pp. 1209–1225. doi:10.1039/c8tb02946f.

Bak, R.O., Hollensen, A.K. and Mikkelsen, J.G. (2013) 'Managing microRNAs with vector-encoded decoy-type inhibitors', *Molecular Therapy*. Nature Publishing Group, pp. 1478–1485. doi:10.1038/mt.2013.113.

Bandara, S.R. *et al.* (2020) 'The structural fate of lipid nanoparticles in the extracellular matrix', *Materials Horizons*, 7(1), pp. 125–134. doi:10.1039/C9MH00835G.

Bao, Y. *et al.* (2013) 'Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of siRNA/lipid nanoparticle complexes', *Pharmaceutical Research*, 30(2), pp. 342–351. doi:10.1007/s11095-012-0874-6.

BaoLin, G. and Ma, P.X. (2014) 'Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review', *Science China. Chemistry*, 57(4), pp. 490–500. doi:10.1007/s11426-014-5086-y.

Barbari, G.R. *et al.* (2017) 'A novel nanoemulsion-based method to produce ultrasmall, water-dispersible nanoparticles from chitosan, surface modified with cell-penetrating peptide for oral delivery of proteins and peptides', *International Journal of Nanomedicine*, 12, pp. 3471–3483. doi:10.2147/IJN.S116063.

Bates, K. and Kostarelos, K. (2013) 'Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: Past achievements, present challenges and future goals', *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 2023–2033. doi:10.1016/j.addr.2013.10.003.

Battié, M.C. *et al.* (2009) 'The Twin Spine Study: contributions to a changing view of disc degeneration', *The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society*, 9(1), pp. 47–59. doi:10.1016/j.spinee.2008.11.011.

Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K. and Calin, G.A. (2017) 'Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones', *Molecular Oncology* [Preprint]. doi:10.1002/1878-0261.12144.

Béduneau, A. *et al.* (2007) 'Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments', *Biomaterials*, 28(33), pp. 4978–4990. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.014.

Belavý, D.L. *et al.* (2016) 'Can Exercise Positively Influence the Intervertebral Disc?', *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 46(4), pp. 473–485. doi:10.1007/s40279-015-0444-2.

Belavý, D.L. *et al.* (2017) 'Running exercise strengthens the intervertebral disc', *Scientific Reports*, 7, p. 45975. doi:10.1038/srep45975.

Berenbaum, F. and Sellam, J. (2008) 'Obesity and osteoarthritis: what are the links?', *Joint Bone Spine*, 75(6), pp. 667–668. doi:10.1016/j.jbspin.2008.07.006.

Bernardo, B.C. *et al.* (2018) 'Generation of MicroRNA-34 sponges and tough decoys for the heart: Developments and challenges', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fphar.2018.01090.

Bez, M. *et al.* (2018) 'Molecular pain markers correlate with pH-sensitive MRI signal in a pig model of disc degeneration', *Scientific Reports*, 8(1), p. 17363. doi:10.1038/s41598-018-34582-6.

Bezci, S.E. and O'Connell, G.D. (2018) 'Osmotic Pressure Alters Time-dependent Recovery Behavior of the Intervertebral Disc', *Spine*, 43(6), pp. E334–E340. doi:10.1097/BRS.0000000000002354.

Bhattacharjee, M. *et al.* (2016) 'Role of chondroitin sulphate tethered silk scaffold in cartilaginous disc tissue regeneration', *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 11(2), p. 025014. doi:10.1088/1748-6041/11/2/025014.

Bhunia, B.K., Kaplan, D.L. and Mandal, B.B. (2018) 'Silk-based multilayered angle-ply annulus fibrosus construct to recapitulate form and function of the intervertebral disc', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(3), pp. 477–482. doi:10.1073/pnas.1715912115.

- Blanquer, S.B.G., Grijpma, D.W. and Poot, A.A. (2015) 'Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, pp. 172–187. doi:10.1016/J.ADDR.2014.10.024.
- Blanquer, S.B.G.B.G., Grijpma, D.W.W. and Poot, A.A.A. (2015) 'Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, pp. 172–187. doi:10.1016/J.ADDR.2014.10.024.
- Boon, R.A. and Vickers, K.C. (2013) 'Intercellular transport of MicroRNAs', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(2), pp. 186–192. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300139.
- Borel, F. and Mueller, C. (2019) 'Design of AAV vectors for delivery of RNAi', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 3–18. doi:10.1007/978-1-4939-9139-6_1.
- Borowik, A. *et al.* (2019) 'The Impact of Surface Functionalization on the Biophysical Properties of Silver Nanoparticles', *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(7), p. E973. doi:10.3390/nano9070973.
- Bouard, D., Alazard-Dany, N. and Cosset, F.L. (2009) 'Viral vectors: From virology to transgene expression', *British Journal of Pharmacology*, pp. 153–165. doi:10.1038/bjp.2008.349.
- Bouhsina, N. *et al.* (2021) 'Correlation between magnetic resonance, X-ray imaging alterations and histological changes in an ovine model of age-related disc degeneration', *European Cells & Materials*, 41, pp. 166–178. doi:10.22203/eCM.v042a13.
- Boussif, O. *et al.* (1995) 'A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), pp. 7297–7301. doi:10.1073/pnas.92.16.7297.
- Breugst, M. and Reissig, H.-U. (2020) 'The Huisgen Reaction: Milestones of the 1,3-Dipolar Cycloaddition', *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 59(30), pp. 12293–12307. doi:10.1002/anie.202003115.
- Brown, S. *et al.* (2018) 'Cell Clusters Are Indicative of Stem Cell Activity in the Degenerate Intervertebral Disc: Can Their Properties Be Manipulated to Improve Intrinsic Repair of the Disc?', *Stem Cells and Development*, 27(3), pp. 147–165. doi:10.1089/scd.2017.0213.
- Buckley, C.T. *et al.* (2018) 'Critical aspects and challenges for intervertebral disc repair and regeneration-Harnessing advances in tissue engineering', *JOR spine*, 1(3), p. e1029. doi:10.1002/jsp2.1029.
- Buckwalter, J.A., Maynard, J.A. and Cooper, R.R. (1978) 'Sheathing of collagen fibrils in human intervertebral discs', *Journal of anatomy*, 125(Pt 3), pp. 615–618.
- Bulbake, U. *et al.* (2017) 'Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review', *Pharmaceutics*, 9(2), p. E12. doi:10.3390/pharmaceutics9020012.
- Burrell, C.J., Howard, C.R. and Murphy, F.A. (2017) 'Retroviruses', in *Fenner and {White}'s {Medical} {Virology}*. Elsevier, pp. 317–344. doi:10.1016/B978-0-12-375156-0.00023-0.
- Buser, Z. *et al.* (2019) 'The future of disc surgery and regeneration', *International Orthopaedics*, 43(4), pp. 995–1002. doi:10.1007/s00264-018-4254-7.

- Cai, C. *et al.* (2017) 'PLGA-based dual targeted nanoparticles enhance miRNA transfection efficiency in hepatic carcinoma', *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/srep46250.
- Cai, P. *et al.* (2017) 'Role of miR-15a in intervertebral disc degeneration through targeting MAP3K9', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, pp. 568–574. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.128.
- Cai, Z. *et al.* (2020) 'Suppression of miR-203-3p inhibits lipopolysaccharide induced human intervertebral disc inflammation and degeneration through upregulating estrogen receptor α ', *Gene Therapy* [Preprint]. doi:10.1038/s41434-019-0118-z.
- Cao, Z. and Chen, L. (2017) 'Inhibition of miR-27a suppresses the inflammatory response via the p38/MAPK pathway in intervertebral disc cells', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(5), pp. 4572–4578. doi:10.3892/etm.2017.5053.
- Chai, X. *et al.* (2019) 'miR-486-5p Inhibits Inflammatory Response, Matrix Degradation, and Apoptosis of Nucleus Pulposus Cells Through Directly Targeting FOXO1 in Intervertebral Disc Degeneration', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 52(1), pp. 109–118. doi:10.33594/0000000008.
- Che, H. *et al.* (2020) 'p16 deficiency attenuates intervertebral disc degeneration by adjusting oxidative stress and nucleus pulposus cell cycle', *eLife*, 9, p. e52570. doi:10.7554/eLife.52570.
- Chelberg, M.K. *et al.* (1995) 'Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc', *Journal of Anatomy*, 186 (Pt 1), pp. 43–53.
- Chen, H. *et al.* (2015) 'MiR-34a promotes Fas-mediated cartilage endplate chondrocyte apoptosis by targeting Bcl-2', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 406(1–2), pp. 21–30. doi:10.1007/s11010-015-2420-4.
- Chen, J. *et al.* (2020) 'Effect of miR-202-5p-mediated ATG7 on autophagy and apoptosis of degenerative nucleus pulposus cells.', *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(2), pp. 517–525. doi:10.26355/eurrev_202001_20027.
- Chen, J.Q. *et al.* (2016) 'The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases', *Autoimmunity Reviews*, 15(12), pp. 1171–1180. doi:10.1016/j.autrev.2016.09.003.
- Chen, X. *et al.* (2018) 'RNA interference-based therapy and its delivery systems', *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), pp. 107–124. doi:10.1007/s10555-017-9717-6.
- Chen, Z. *et al.* (2019) 'Inflammation-dependent downregulation of miR-194-5p contributes to human intervertebral disc degeneration by targeting CUL4A and CUL4B', *Journal of Cellular Physiology*, p. jcp.28595. doi:10.1002/jcp.28595.
- Cheng, X. *et al.* (2018) 'Circular RNA VMA21 protects against intervertebral disc degeneration through targeting miR-200c and X linked inhibitor-of-apoptosis protein', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77(5), pp. 770–779. doi:10.1136/annrheumdis-2017-212056.
- Cherreddy, K.K., Payen, V.L. and Pr  at, V. (2018) 'PLGA polymer: From a classic drug carrier to a novel therapeutic activity contributor', *Journal of Controlled Release*, 289, pp. 10–13. doi:10.1016/J.JCONREL.2018.09.017.
- Christiani, T.R. *et al.* (2019) 'In vitro evaluation of 3D printed polycaprolactone scaffolds with angle-ply architecture for annulus fibrosus tissue engineering', *Regenerative Biomaterials*, 6(3), pp. 175–184. doi:10.1093/rb/rbz011.

Clouet, J. *et al.* (2009) 'Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes.', *Rheumatology (Oxford, England)*, 48(11), pp. 1447–1450. doi:10.1093/rheumatology/kep262.

Clouet, J. *et al.* (2018) 'Intervertebral disc regeneration: From cell therapy to the development of novel bioinspired endogenous repair strategies', *Advanced Drug Delivery Reviews* [Preprint]. doi:10.1016/J.ADDR.2018.04.017.

Clouet, J. *et al.* (2019) 'Intervertebral disc regeneration: From cell therapy to the development of novel bioinspired endogenous repair strategies', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, pp. 306–324. doi:10.1016/j.addr.2018.04.017.

CNAM (2017) 'Caisse nationale de l'Assurance Maladie (Cnam). Arrêt de travail - Lombalgie commune après avis de la HAS'.

Colombier, P. *et al.* (2016) 'TGF- β 1 and GDF5 Act Synergistically to Drive the Differentiation of Human Adipose Stromal Cells toward Nucleus Pulposus-like Cells', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 34(3), pp. 653–667. doi:10.1002/stem.2249.

da Costa, R.C. *et al.* (2020) 'Diagnostic Imaging in Intervertebral Disc Disease', *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 588338. doi:10.3389/fvets.2020.588338.

Cullis, P.R. and Hope, M.J. (2017) 'Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies', *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(7), pp. 1467–1475. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.013.

D'Angelo, A., Godeau, A.L. and Solon, J. (2019) 'A New Player in Tissue Mechanics: MicroRNA Control of Mechanical Homeostasis', *Developmental Cell*, 48(5), pp. 596–598. doi:10.1016/j.devcel.2019.02.019.

David, S., Carmoy, N., Resnier, P., Denis, C., Misery, L., Pitard, B., Benoit, J.P., Passirani, C., *et al.* (2012) 'In vivo imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model', *International Journal of Pharmaceutics*, 423(1), pp. 108–115. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.06.031.

David, S., Carmoy, N., Resnier, P., Denis, C., Misery, L., Pitard, B., Benoit, J.-P., Passirani, C., *et al.* (2012) 'In vivo imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model', *International Journal of Pharmaceutics*, 423(1), pp. 108–115. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.06.031.

David, S., Resnier, P., *et al.* (2012a) 'siRNA LNCs - A novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(2), pp. 448–452. doi:10.1016/j.ejpb.2012.02.010.

David, S., Resnier, P., *et al.* (2012b) 'siRNA LNCs - A novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(2), pp. 448–452. doi:10.1016/j.ejpb.2012.02.010.

David, S., Montier, T., *et al.* (2012) 'Treatment efficacy of DNA lipid nanocapsules and DNA multimodal systems after systemic administration in a human glioma model.', *The journal of gene medicine*, 14(12), pp. 769–775. doi:10.1002/jgm.2683.

David, S. *et al.* (2013) 'DNA nanocarriers for systemic administration: characterization and in vivo bioimaging in healthy mice.', *Molecular therapy. Nucleic acids*, 2(1), p. e64. doi:10.1038/mtna.2012.56.

- Decante, C. *et al.* (2021) 'Collateral effects of targeting the nucleus pulposus via a transpedicular or transannular surgical route: a combined X-ray, MRI, and histological long-term descriptive study in sheep', *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*, 30(2), pp. 585–595. doi:10.1007/s00586-020-06602-5.
- Di Iorio, A. *et al.* (2007) 'From Chronic Low Back Pain to Disability, a Multifactorial Mediated Pathway', *Spine*, 32(26), pp. E809–E815. doi:10.1097/BRS.0b013e31815cd422.
- van Dijk, B., Potier, E. and Ito, K. (2011) 'Culturing bovine nucleus pulposus explants by balancing medium osmolarity', *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 17(11), pp. 1089–1096. doi:10.1089/ten.TEC.2011.0215.
- Ding, F., Shao, Z. and Xiong, L. (2013a) 'Cell death in intervertebral disc degeneration', *Apoptosis*, 18(7), pp. 777–785. doi:10.1007/s10495-013-0839-1.
- Ding, F., Shao, Z. and Xiong, L. (2013b) 'Cell death in intervertebral disc degeneration', *Apoptosis*, 18(7), pp. 777–785. doi:10.1007/s10495-013-0839-1.
- Divi, Srikanth N. *et al.* (2020) 'Circulating miR-155-5p as a Novel Biomarker of Lumbar Degenerative Disc Disease', *Spine*, 45(9), p. E499. doi:10.1097/BRS.0000000000003322.
- Divi, Srikanth N *et al.* (2020) 'Circulating miR-155-5p as a Novel Biomarker of Lumbar Degenerative Disc Disease.', *Spine*, 45(9), pp. E499–E507. doi:10.1097/BRS.0000000000003322.
- Dong, W. *et al.* (2019) 'miR-640 aggravates intervertebral disc degeneration via NF-κB and WNT signalling pathway', *Cell Proliferation*, p. e12664. doi:10.1111/cpr.12664.
- Du, L. *et al.* (2019) 'Engineering a biomimetic integrated scaffold for intervertebral disc replacement', *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 96, pp. 522–529. doi:10.1016/j.msec.2018.11.087.
- Ehmann, H.M.A. *et al.* (2015) 'Gold nanoparticles in the engineering of antibacterial and anticoagulant surfaces', *Carbohydrate Polymers*, 117, pp. 34–42. doi:10.1016/j.carbpol.2014.08.116.
- Erwin, W.M. *et al.* (2006) 'Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes', *Arthritis and Rheumatism*, 54(12), pp. 3859–3867. doi:10.1002/art.22258.
- Erwin, W.M. *et al.* (2011) 'Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration', *Arthritis Research & Therapy*, 13(6), p. R215. doi:10.1186/ar3548.
- Eskola, P.J. *et al.* (2012) 'Genetic Association Studies in Lumbar Disc Degeneration: A Systematic Review', *PLOS ONE*, 7(11), p. e49995. doi:10.1371/journal.pone.0049995.
- Falato, L., Gestin, M. and Langel, Ü. (2022) 'PepFect14 Signaling and Transfection', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2383, pp. 229–246. doi:10.1007/978-1-0716-1752-6_15.
- Faraoni, I. *et al.* (2009) 'miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(6), pp. 497–505. doi:10.1016/j.bbadis.2009.02.013.

- Favaloro, B. *et al.* (2012) 'Role of apoptosis in disease.', *Aging*, 4(5), pp. 330–349. doi:10.18632/aging.100459.
- Fearing, B.V. *et al.* (2018) 'Mechanotransduction and cell biomechanics of the intervertebral disc', *JOR Spine*, 1(3), p. e1026. doi:10.1002/jsp2.1026.
- Feng, H. *et al.* (2006) 'Extracellular matrix in disc degeneration', *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 88 Suppl 2, pp. 25–29. doi:10.2106/JBJS.E.01341.
- Fire, A. *et al.* (1998) 'Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 391(6669), pp. 806–811. doi:10.1038/35888.
- Fontana, G. and See, E. (2015) 'Current trends in biologics delivery to restore intervertebral disc anabolism', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, pp. 146–158. doi:10.1016/J.ADDR.2014.08.008.
- Forterre, A. *et al.* (2020) 'A Comprehensive Review of Cancer MicroRNA Therapeutic Delivery Strategies.', *Cancers*, 12(7). doi:10.3390/cancers12071852.
- Fournier, D.E. *et al.* (2020) 'Vascularization of the human intervertebral disc: A scoping review', *JOR spine*, 3(4), p. e1123. doi:10.1002/jsp2.1123.
- Frapin, L. *et al.* (2019) 'Lessons learned from intervertebral disc pathophysiology to guide rational design of sequential delivery systems for therapeutic biological factors.', *Advanced drug delivery reviews*, 149–150, pp. 49–71. doi:10.1016/j.addr.2019.08.007.
- Frapin, L. *et al.* (2020) 'Controlled release of biological factors for endogenous progenitor cell migration and intervertebral disc extracellular matrix remodelling', *Biomaterials*, 253, p. 120107. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120107.
- Furlan, A.D. *et al.* (2015) 'Massage for low-back pain', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9), p. CD001929. doi:10.1002/14651858.CD001929.pub3.
- Fusellier, M. *et al.* (2020) 'Degenerative lumbar disc disease: in vivo data support the rationale for the selection of appropriate animal models', *European Cells & Materials*, 39, pp. 18–47. doi:10.22203/eCM.v039a02.
- Ganesan, S. *et al.* (2017) 'Prevalence and Risk Factors for Low Back Pain in 1,355 Young Adults: A Cross-Sectional Study', *Asian Spine Journal*, 11(4), pp. 610–617. doi:10.4184/asj.2017.11.4.610.
- García-Cosamalón, J. *et al.* (2010) 'Intervertebral disc, sensory nerves and neurotrophins: who is who in discogenic pain?', *Journal of Anatomy*, 217(1), pp. 1–15. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01227.x.
- Gaudet, A.D. and Popovich, P.G. (2014a) 'Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord', *Experimental Neurology*, 258, pp. 24–34. doi:10.1016/j.expneurol.2013.11.020.
- Gaudet, A.D. and Popovich, P.G. (2014b) 'Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord', *Experimental Neurology*, 258, pp. 24–34. doi:10.1016/j.expneurol.2013.11.020.
- Gebre, M.S. *et al.* (2021) 'Novel approaches for vaccine development', *Cell*, 184(6), pp. 1589–1603. doi:10.1016/j.cell.2021.02.030.

- Genevay, S. *et al.* (2012) 'Adalimumab in acute sciatica reduces the long-term need for surgery: a 3-year follow-up of a randomised double-blind placebo-controlled trial', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(4), pp. 560–562. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200373.
- Ghosh, R. *et al.* (2013) 'A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells', *Biomaterials*, 34(3), pp. 807–816. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.023.
- Gilbert, H.T.J. *et al.* (2016) 'Acidic pH promotes intervertebral disc degeneration: Acid-sensing ion channel -3 as a potential therapeutic target', *Scientific Reports*, 6, p. 37360. doi:10.1038/srep37360.
- Gjeffsen, E. *et al.* (2020) 'The effect of infliximab in patients with chronic low back pain and Modic changes (the BackToBasic study): study protocol of a randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter trial', *BMC musculoskeletal disorders*, 21(1), p. 698. doi:10.1186/s12891-020-03720-5.
- 'Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.' (2017) *Lancet (London, England)*, 390(10100), pp. 1260–1344. doi:10.1016/S0140-6736(17)32130-X.
- Gluais, M. *et al.* (2019) 'In vitro and in vivo evaluation of an electrospun-aligned microfibrinous implant for Annulus fibrosus repair', *Biomaterials*, 205, pp. 81–93. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.03.010.
- Growney Kalaf, E.A. *et al.* (2016) 'Characterization of slow-gelling alginate hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications', *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 63, pp. 198–210. doi:10.1016/j.msec.2016.02.067.
- Gu, S.-X. *et al.* (2015a) 'MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc', *Gene*, 555(2), pp. 80–87. doi:10.1016/j.gene.2014.10.024.
- Gu, S.-X. *et al.* (2015b) 'MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc', *Gene*, 555(2), pp. 80–87. doi:10.1016/j.gene.2014.10.024.
- Guerrini, L., Alvarez-Puebla, R.A. and Pazos-Perez, N. (2018) 'Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids', *Materials (Basel, Switzerland)*, 11(7), p. E1154. doi:10.3390/ma11071154.
- Gugjoo, M.B. *et al.* (2020) 'Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immuno-Modulatory and Anti-Inflammatory Mechanisms in Immune and Allergic Disorders', *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 14(1), pp. 3–14. doi:10.2174/1872213X14666200130100236.
- Guo, Y. *et al.* (2019) 'ERRFI1 Inhibits Proliferation and Inflammation of Nucleus Pulposus and is Negatively Regulated by miR-2355-5p in Intervertebral Disc Degeneration.', *Spine* [Preprint]. doi:10.1097/BRS.00000000000003011.
- Hagedorn, P.H. *et al.* (2018) 'Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, pp. 101–114. doi:10.1016/j.drudis.2017.09.018.
- Hai, B. *et al.* (2019) 'Melatonin benefits to the growth of human annulus fibrosus cells through inhibiting {miR}-106a-5p/{ATG7} signaling pathway.', *Clinical interventions in aging*, 14, pp. 621–630. doi:10.2147/CIA.S193765.

Han, W.M. *et al.* (2012) 'Multi-scale structural and tensile mechanical response of annulus fibrosus to osmotic loading', *Annals of Biomedical Engineering*, 40(7), pp. 1610–1621. doi:10.1007/s10439-012-0525-4.

Hanly, D.J., Esteller, M. and Berdasco, M. (2018) 'Interplay between long non-coding RNAs and epigenetic machinery: Emerging targets in cancer?', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society Publishing. doi:10.1098/rstb.2017.0074.

HAS (2015) *Prise en charge du patient présentant une lombalgie commune*, Haute Autorité de Santé. Available at: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2961499/fr/prise-en-charge-du-patient-presentant-une-lombalgie-commune (Accessed: 19 September 2021).

Henriksson, H.B. *et al.* (2009) 'Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model', *Spine*, 34(2), pp. 141–148. doi:10.1097/BRS.0b013e31818f8c20.

Henry, N. *et al.* (2014) 'Regenerative medicine of the intervertebral disc: from pathophysiology to clinical application.', *Médecine sciences : M/S*, 30(12), pp. 1091–1100. doi:10.1051/medsci/20143012012.

Henry, N. *et al.* (2018a) 'Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery systems', *Biotechnology Advances*, 36(1), pp. 281–294. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.009.

Henry, N. *et al.* (2018b) 'Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery systems', *Biotechnology Advances*, 36(1), pp. 281–294. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.009.

Henry, N. *et al.* (2018c) 'Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: From cell therapies to multiscale delivery systems', *Biotechnology Advances*, 36(1), pp. 281–294. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.009.

Heurtault, B. *et al.* (2002) 'A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers.', *Pharmaceutical research*, 19(6), pp. 875–880. doi:10.1023/a:1016121319668.

Heurtault, B. *et al.* (2003) 'The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution', *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 18(1), pp. 55–61. doi:10.1016/s0928-0987(02)00241-5.

Heurtault B., S.P., Pech B., Proust J.E., Benoit J.P. (2002) 'A novel phase inversion -based process for the preparation of lipid nanocarrier', *Pharmaceutical Research*, 19(6), pp. 875–880.

Heyes, J. *et al.* (2005) 'Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids', *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 107(2), pp. 276–287. doi:10.1016/j.jconrel.2005.06.014.

Hodgkinson, T. *et al.* (2020) 'Regenerative Response of Degenerate Human Nucleus Pulposus Cells to GDF6 Stimulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), p. 7143. doi:10.3390/ijms21197143.

Hoffman, R.M., Margolis, L.B. and Bergelson, L.D. (1978) 'Binding and entrapment of high molecular weight DNA by lecithin liposomes', *FEBS letters*, 93(2), pp. 365–368. doi:10.1016/0014-5793(78)81141-7.

- Hohaus, C. *et al.* (2008) 'Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease', *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*, 17 Suppl 4, pp. 492–503. doi:10.1007/s00586-008-0750-6.
- Horan, R.L. *et al.* (2005) 'In vitro degradation of silk fibroin', *Biomaterials*, 26(17), pp. 3385–3393. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.020.
- Hosseinhali, N. *et al.* (2018) 'Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review.', *Journal of cellular physiology*, 233(8), pp. 5574–5588. doi:10.1002/jcp.26514.
- Hu, P. *et al.* (2015) 'Microarray based analysis of gene regulation by {microRNA} in intervertebral disc degeneration.', *Molecular medicine reports*, 12(4), pp. 4925–4930. doi:10.3892/mmr.2015.4022.
- Hu, Q. *et al.* (2018) 'Chondrocyte affinity peptide modified PAMAM conjugate as a nanoplatform for targeting and retention in cartilage', *Nanomedicine (London, England)*, 13(7), pp. 749–767. doi:10.2217/nnm-2017-0335.
- Huang, C.-Y. and Gu, W.Y. (2008) 'EFFECTS OF MECHANICAL COMPRESSION ON METABOLISM AND DISTRIBUTION OF OXYGEN AND LACTATE IN INTERVERTEBRAL DISC', *Journal of biomechanics*, 41(6), pp. 1184–1196. doi:10.1016/j.jbiomech.2008.02.002.
- Huang, S. *et al.* (2016) 'Folic-Acid-Mediated Functionalized Gold Nanocages for Targeted Delivery of Anti-miR-181b in Combination of Gene Therapy and Photothermal Therapy against Hepatocellular Carcinoma', *Advanced Functional Materials*, 26(15), pp. 2532–2544. doi:10.1002/adfm.201504912.
- Hureaux, J. *et al.* (2009) 'The adaptation of lipid nanocapsule formulations for blood administration in animals.', *International journal of pharmaceutics*, 379(2), pp. 266–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.033.
- Hureaux, J. *et al.* (2010) 'Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice', *Pharmaceutical Research*, 27(3), pp. 421–430. doi:10.1007/s11095-009-0024-y.
- Hutvagner, G. *et al.* (2004) 'Sequence-specific inhibition of small RNA function.', *PLoS biology*, 2(4), p. E98. doi:10.1371/journal.pbio.0020098.
- ISO 10993-5:2009(en), *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* (no date). Available at: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en> (Accessed: 17 October 2021).
- Jeong, E.J. *et al.* (2015) 'The spacer arm length in cell-penetrating peptides influences chitosan/siRNA nanoparticle delivery for pulmonary inflammation treatment', *Nanoscale*, 7(47), pp. 20095–20104. doi:10.1039/c5nr06903c.
- Jeong, J.H. *et al.* (2009) 'Human mesenchymal stem cells implantation into the degenerated coccygeal disc of the rat', *Cytotechnology*, 59(1), pp. 55–64. doi:10.1007/s10616-009-9192-1.
- Ji, M. *et al.* (2016) 'Downregulation of microRNA-193a-3p is involved in intervertebral disc degeneration by targeting MMP14', *Journal of Molecular Medicine*, 94(4), pp. 457–468. doi:10.1007/s00109-015-1371-2.

- Ji, M. *et al.* (2018) 'Preclinical development of a microRNA-based therapy for intervertebral disc degeneration', *Nature Communications*, 9(1), p. 5051. doi:10.1038/s41467-018-07360-1.
- Ji, M.L. *et al.* (2016) 'Dysregulated miR-98 Contributes to Extracellular Matrix Degradation by Targeting IL-6/STAT3 Signaling Pathway in Human Intervertebral Disc Degeneration', *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(4), pp. 900–909. doi:10.1002/jbmr.2753.
- Jing, W. and Jiang, W. (2015) 'No Title', 48(3). doi:10.1111/cpr.12176.
- Johnson, W.E.B., Eisenstein, S.M. and Roberts, S. (2001) 'Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation', *Connective Tissue Research*, 42(3), pp. 197–207. doi:10.3109/03008200109005650.
- Johnstone, B. *et al.* (1992) 'The fluid content of the human intervertebral disc. Comparison between fluid content and swelling pressure profiles of discs removed at surgery and those taken postmortem', *Spine*, 17(4), pp. 412–416. doi:10.1097/00007632-199204000-00006.
- Juang, V. *et al.* (2019) 'pH-Responsive PEG-Shedding and Targeting Peptide-Modified Nanoparticles for Dual-Delivery of Irinotecan and microRNA to Enhance Tumor-Specific Therapy', *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 15(49), p. e1903296. doi:10.1002/smll.201903296.
- Kanber, E. *et al.* (2016) 'Design of Polyamine-Grafted Starches for Nucleotide Analogue Delivery: In Vitro Evaluation of the Anticancer Activity', *Bioconjugate Chemistry*, 27(10), pp. 2431–2440. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00396.
- Kang, L. *et al.* (2017) 'MicroRNA-15b silencing inhibits IL-1 β -induced extracellular matrix degradation by targeting SMAD3 in human nucleus pulposus cells', *Biotechnology Letters*, 39(4), pp. 623–632. doi:10.1007/s10529-016-2280-3.
- Karim, R. *et al.* (2018) 'Enhanced and preferential internalization of lipid nanocapsules into human glioblastoma cells: effect of a surface-functionalizing NFL peptide', *Nanoscale*, 10(28), pp. 13485–13501. doi:10.1039/C8NR02132E.
- Keam, S.J. (2018) 'Inotersen: First Global Approval', *Drugs*, 78(13), pp. 1371–1376. doi:10.1007/s40265-018-0968-5.
- Kern, S. *et al.* (2006) 'Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(5), pp. 1294–1301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342.
- Kim, J. *et al.* (2021) 'Self-assembled mRNA vaccines', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, pp. 83–112. doi:10.1016/j.addr.2020.12.014.
- Kim, Y.-K. and Kim, V.N. (2007) 'Processing of intronic microRNAs', *The EMBO journal*, 26(3), pp. 775–783. doi:10.1038/sj.emboj.7601512.
- Kitis, S. *et al.* (2018) 'Analysis of genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration', *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 64(10), pp. 61–65.
- Knezevic, N.N. *et al.* (2021) 'Low back pain', *Lancet (London, England)*, 398(10294), pp. 78–92. doi:10.1016/S0140-6736(21)00733-9.

- Kong, L. *et al.* (2018) 'MicroRNA-194 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6)', *Medical Science Monitor*, 24, pp. 3056–3067. doi:10.12659/MSM.907280.
- Koshkin, A.A. *et al.* (2001) 'A simplified and efficient route to 2'-O, 4'-C-methylene-linked bicyclic ribonucleosides (locked nucleic acid).', *The Journal of organic chemistry*, 66(25), pp. 8504–12. doi:10.1021/jo010732p.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2014) 'miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data', *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp. D68–D73. doi:10.1093/nar/gkt1181.
- Kulkarni, J.A. *et al.* (2018) 'On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA', *ACS nano*, 12(5), pp. 4787–4795. doi:10.1021/acsnano.8b01516.
- Kumar, A., Zhang, X. and Liang, X.J. (2013) 'Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system', *Biotechnology Advances*, pp. 593–606. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.10.002.
- Kumawat, A. *et al.* (2018) 'Budding Alliance of Nanotechnology in RNA Interference Therapeutics', *Current Pharmaceutical Design*, 24(23), pp. 2632–2643. doi:10.2174/1381612824666180807113948.
- Kuritzky, L. and Samraj, G.P. (2012) 'Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of low back pain', *Journal of Pain Research*, 5, pp. 579–590. doi:10.2147/JPR.S6775.
- Lagarce, F. and Passirani, C. (no date) 'Nucleic-Acid Delivery Using Lipid Nanocapsules.', *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(8), pp. 723–7.
- Lagos-Quintana, M. *et al.* (2002) 'Identification of tissue-specific microRNAs from mouse', *Current biology: CB*, 12(9), pp. 735–739. doi:10.1016/s0960-9822(02)00809-6.
- Le Fournier, L. *et al.* (2017) 'The transpedicular surgical approach for the development of intervertebral disc targeting regenerative strategies in an ovine model', *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*, 26(8), pp. 2072–2083. doi:10.1007/s00586-017-5199-z.
- Lee, C.S. *et al.* (2017) 'Adenovirus-mediated gene delivery: {Potential} applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine', *Genes and Diseases*, 4(2), pp. 43–63. doi:10.1016/j.gendis.2017.04.001.
- Lee, K.-I. *et al.* (2012) 'Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured nucleus pulposus cells using atelocollagen scaffold and growth factors', *Spine*, 37(6), pp. 452–458. doi:10.1097/BRS.0b013e31823c8603.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.', *Cell*, 75(5), pp. 843–54.
- Lee, Rosalind C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75(5), pp. 843–854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- Lee, S.W.L. *et al.* (2019) 'MicroRNA delivery through nanoparticles', *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., pp. 80–95. doi:10.1016/j.jconrel.2019.10.007.

- Lei, L. *et al.* (2019) 'Injectable colloidal hydrogel with mesoporous silica nanoparticles for sustained co-release of {microRNA}-222 and aspirin to achieve innervated bone regeneration in rat mandibular defects', *Journal of Materials Chemistry B*, 7(16), pp. 2722–2735. doi:10.1039/c9tb00025a.
- Lesbats, P., Engelman, A.N. and Cherepanov, P. (2016) 'Retroviral DNA Integration', *Chemical Reviews*. American Chemical Society, pp. 12730–12757. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00125.
- Leung, A.K.K. *et al.* (2015) 'Microfluidic Mixing: A General Method for Encapsulating Macromolecules in Lipid Nanoparticle Systems', *The Journal of Physical Chemistry. B*, 119(28), pp. 8698–8706. doi:10.1021/acs.jpcc.5b02891.
- Lewis, D.L. *et al.* (2002) 'Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice', *Nature Genetics*, 32(1), pp. 107–108. doi:10.1038/ng944.
- Li, C. *et al.* (2019) 'Crosstalk of mRNA, miRNA, lncRNA, and circRNA and Their Regulatory Pattern in Pulmonary Fibrosis.', *Molecular therapy. Nucleic acids*, 18, pp. 204–218. doi:10.1016/j.omtn.2019.08.018.
- Li, D. *et al.* (2018) 'Biomimetic albumin-modified gold nanorods for photothermo-chemotherapy and macrophage polarization modulation', *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 8(1), pp. 74–84. doi:10.1016/j.apsb.2017.09.005.
- Li, G. *et al.* (2018) 'miR-148a inhibits pro-inflammatory cytokines released by intervertebral disc cells by regulating the p38/MAPK pathway', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(3), pp. 2665–2669. doi:10.3892/etm.2018.6516.
- Li, H. *et al.* (2016) 'DOTAP functionalizing single-walled carbon nanotubes as non-viral vectors for efficient intracellular siRNA delivery', *Drug Delivery*, 23(3), pp. 830–838. doi:10.3109/10717544.2014.919542.
- Li, H.R. *et al.* (2016) 'Downregulation of MIR-27b is involved in loss of Type II collagen by directly targeting matrix metalloproteinase 13 (MMP13) in human intervertebral disc degeneration', *Spine*, 41(3), pp. E116–E123. doi:10.1097/BRS.0000000000001139.
- Li, R. *et al.* (2018) 'MEG3-4 is a miRNA decoy that regulates IL-1 abundance to initiate and then limit inflammation to prevent sepsis during lung infection', *Science Signaling*, 11(536). doi:10.1126/scisignal.aao2387.
- Li, W. *et al.* (2017) 'MiR-184 Regulates Proliferation in Nucleus Pulposus Cells by Targeting GAS1', *World Neurosurgery*, 97, pp. 710-715.e1. doi:10.1016/j.wneu.2016.01.024.
- Li, Y. *et al.* (2018) 'Targeted delivery of anti-miR-155 by functionalized mesoporous silica nanoparticles for colorectal cancer therapy', *International Journal of Nanomedicine*, 13, pp. 1241–1256. doi:10.2147/IJN.S158290.
- Li, Z. *et al.* (2020) 'Preclinical ex-vivo Testing of Anti-inflammatory Drugs in a Bovine Intervertebral Degenerative Disc Model', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 583. doi:10.3389/fbioe.2020.00583.
- Liang, G. *et al.* (2016) 'Polyethyleneimine-coated quantum dots for miRNA delivery and its enhanced suppression in HepG2 cells', *International Journal of Nanomedicine*, 11, pp. 6079–6088. doi:10.2147/IJN.S120828.

- Liang, J. *et al.* (2018) 'Sphk2 {RNAi} nanoparticles suppress tumor growth via downregulating cancer cell derived exosomal {microRNA}', *Journal of Controlled Release*, 286, pp. 348–357. doi:10.1016/j.jconrel.2018.07.039.
- Lili, Zhang, L. and Zhang, Y. (2018) 'Roles of miR-494 in intervertebral disc degeneration and the related mechanism', *World Neurosurgery* [Preprint]. doi:10.1016/J.WNEU.2018.12.098.
- Lin, P.J.C. *et al.* (2013) 'Influence of cationic lipid composition on uptake and intracellular processing of lipid nanoparticle formulations of siRNA', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(2), pp. 233–246. doi:10.1016/j.nano.2012.05.019.
- Lin, P.J.C. and Tam, Y.K. (2015) 'Enhancing the pharmacokinetic/pharmacodynamic properties of therapeutic nucleotides using lipid nanoparticle systems', *Future Medicinal Chemistry*, 7(13), pp. 1751–1769. doi:10.4155/fmc.15.108.
- Lin, X. *et al.* (2011) 'A robust in vivo positive-readout system for monitoring {siRNA} delivery to xenograft tumors', *RNA*, 17(4), pp. 603–612. doi:10.1261/rna.2546011.
- Lipscomb, K.E. *et al.* (2017) 'Biomechanical Effects of Human Lumbar Discography: In Vitro Experiments and Their Finite Element Validation', *Clinical Spine Surgery*, 30(3), pp. E219–E225. doi:10.1097/BSD.000000000000077.
- Lisowski, L., Tay, S.S. and Alexander, I.E. (2015) 'Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics', *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd, pp. 59–67. doi:10.1016/j.coph.2015.07.006.
- Liu, B. *et al.* (2015) 'Silk structure and degradation', *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 131, pp. 122–128. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.040.
- Liu, G. *et al.* (2013) 'MiR-27a Regulates Apoptosis in Nucleus Pulposus Cells by Targeting PI3K', *PLoS ONE*. Edited by B. Singh, 8(9), p. e75251. doi:10.1371/journal.pone.0075251.
- Liu, J. *et al.* (2019) 'Targeting of CDKN 1B by miR-222-3p may contribute to the development of intervertebral disc degeneration', *FEBS Open Bio*, 9(4), pp. 728–735. doi:10.1002/2211-5463.12609.
- Liu, M.-H. *et al.* (2016) 'Matrix stiffness promotes cartilage endplate chondrocyte calcification in disc degeneration via miR-20a targeting ANKH expression', *Scientific Reports*, 6(1), p. 25401. doi:10.1038/srep25401.
- Liu, P. *et al.* (2017) 'Downregulation of microRNA-125a is involved in intervertebral disc degeneration by targeting pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1.', *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(11), pp. 1260–1267. doi:10.22038/IJBMS.2017.9542.
- Liu, W. *et al.* (2017) 'MicroRNA-132 upregulation promotes matrix degradation in intervertebral disc degeneration', *Experimental Cell Research*, 359(1), pp. 39–49. doi:10.1016/j.yexcr.2017.08.011.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.', *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp. 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Love, K.T. *et al.* (2010) 'Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), pp. 1864–1869. doi:10.1073/pnas.0910603106.

- Lu, A., Wang, Z. and Wang, S. (2017) 'Role of miR-589-3p in human lumbar disc degeneration and its potential mechanism', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(2), pp. 1616–1621. doi:10.3892/etm.2017.5593.
- Luo, X., Yang, B. and Nattel, S. (2015) 'MicroRNAs and atrial fibrillation: Mechanisms and translational potential', *Nature Reviews Cardiology*, 12(2), pp. 80–90. doi:10.1038/nrcardio.2014.178.
- Luoma, K. *et al.* (2000) 'Low back pain in relation to lumbar disc degeneration.', *Spine*, 25(4), pp. 487–92.
- Lv, F. *et al.* (2017) 'MicroRNA-146a Ameliorates Inflammation via TRAF6/NF- κ B Pathway in Intervertebral Disc Cells.', *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 23, pp. 659–664.
- Lv, J. *et al.* (2018) 'Inhibition of microRNA-30d attenuates the apoptosis and extracellular matrix degradation of degenerative human nucleus pulposus cells by up-regulating SOX9', *Chemico-Biological Interactions*, 296, pp. 89–97. doi:10.1016/J.CBI.2018.09.010.
- Ma, J.F. *et al.* (2016) 'MiR-125a Rs12976445 Polymorphism is Associated with the Apoptosis Status of Nucleus Pulposus Cells and the Risk of Intervertebral Disc Degeneration', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(1), pp. 295–305. doi:10.1159/000438630.
- Maher, C., Underwood, M. and Buchbinder, R. (2017) 'Non-specific low back pain', *Lancet (London, England)*, 389(10070), pp. 736–747. doi:10.1016/S0140-6736(16)30970-9.
- Makadia, H.K. and Siegel, S.J. (2011) 'Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier', *Polymers*, 3(3), pp. 1377–1397. doi:10.3390/polym3031377.
- Malone, R.W., Felgner, P.L. and Verma, I.M. (1989) 'Cationic liposome-mediated RNA transfection', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), pp. 6077–6081. doi:10.1073/pnas.86.16.6077.
- Mannino, R.J., Allebach, E.S. and Strohl, W.A. (1979) 'Encapsulation of high molecular weight DNA in large unilamellar phospholipid vesicles. Dependence on the size of the DNA', *FEBS letters*, 101(2), pp. 229–232. doi:10.1016/0014-5793(79)81014-5.
- Marfia, G. *et al.* (2014) 'Potential use of human adipose mesenchymal stromal cells for intervertebral disc regeneration: a preliminary study on biglycan-deficient murine model of chronic disc degeneration', *Arthritis Research & Therapy*, 16(5), p. 457. doi:10.1186/s13075-014-0457-5.
- Marquez Loza, L.I., Yuen, E.C. and McCray, P.B. (2019) 'Lentiviral vectors for the treatment and prevention of cystic fibrosis lung disease', *Genes*, 10(3). doi:10.3390/genes10030218.
- Martirosyan, N.L. *et al.* (2016) 'Genetic Alterations in Intervertebral Disc Disease', *Frontiers in Surgery*, 3, p. 59. doi:10.3389/fsurg.2016.00059.
- Marzi, M.J. *et al.* (2016) 'Degradation dynamics of micrornas revealed by a novel pulse-chase approach', *Genome Research*, 26(4), pp. 554–565. doi:10.1101/gr.198788.115.
- Mashima, R. (2015) 'Physiological roles of miR-155', *Immunology*, 145(3), pp. 323–333. doi:10.1111/imm.12468.

- Mayer, J.E. *et al.* (2013) 'Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration', *The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society*, 13(3), pp. 299–317. doi:10.1016/j.spinee.2013.01.041.
- Meisel, H.J. *et al.* (2007) 'Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc', *Biomolecular Engineering*, 24(1), pp. 5–21. doi:10.1016/j.bioeng.2006.07.002.
- Meng, X. *et al.* (2018) 'MicroRNA-125b-1-3p mediates intervertebral disc degeneration in rats by targeting teashirt zinc finger homeobox 3.', *Experimental and therapeutic medicine*, 15(3), pp. 2627–2633. doi:10.3892/etm.2018.5715.
- Merceron, C. *et al.* (2010) 'Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 298(2), pp. C355–C364. doi:10.1152/ajpcell.00398.2009.
- Miguélez-Rivera, L. *et al.* (2018) 'Immunomodulation of mesenchymal stem cells in discogenic pain', *The Spine Journal*, 18(2), pp. 330–342. doi:10.1016/j.spinee.2017.09.002.
- Milone, M.C. and O'Doherty, U. (2018) 'Clinical use of lentiviral vectors', *Leukemia*, 32(7), pp. 1529–1541. doi:10.1038/s41375-018-0106-0.
- Minteer, D., Marra, K.G. and Rubin, J.P. (2013) 'Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications', *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 129, pp. 59–71. doi:10.1007/10_2012_146.
- Modic, M.T. *et al.* (1988) 'Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging', *Radiology*, 166(1 Pt 1), pp. 193–199. doi:10.1148/radiology.166.1.3336678.
- Mohamed, A. *et al.* (2019) 'Pulmonary Delivery of Nanocomposite Microparticles (NCMPs) incorporating miR-146a for Treatment of COPD', *International Journal of Pharmaceutics*, p. 118524. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118524.
- Monnard, P.A., Oberholzer, T. and Luisi, P. (1997) 'Entrapment of nucleic acids in liposomes', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1329(1), pp. 39–50. doi:10.1016/s0005-2736(97)00066-7.
- Moon, S.M. *et al.* (2013) 'Evaluation of intervertebral disc cartilaginous endplate structure using magnetic resonance imaging', *European Spine Journal*, 22(8), pp. 1820–1828. doi:10.1007/s00586-013-2798-1.
- Mori, M.A. *et al.* (2019) 'Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease', *Cell Metabolism*, 30(4), pp. 656–673. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.011.
- Morille, M. *et al.* (2009) 'Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting', *International Journal of Pharmaceutics*, 379(2), pp. 293–300. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.065.
- Mui, B.L. *et al.* (2013) 'Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles', *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 2, p. e139. doi:10.1038/mtna.2013.66.
- Murphy, M.B., Moncivais, K. and Caplan, A.I. (2013) 'Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine', *Experimental & Molecular Medicine*, 45, p. e54. doi:10.1038/emm.2013.94.

Mwale, F. *et al.* (2009) 'Characterization of intervertebral disc cells behavior in a mouse subcutaneous model', *Orthopaedic Proceedings*, 91-B(SUPP_II), pp. 226–226. doi:10.1302/0301-620X.91BSUPP_II.0910226a.

Mwale, F., Roughley, P. and Antoniou, J. (2004) 'Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc', *European Cells & Materials*, 8, pp. 58–63; discussion 63–64. doi:10.22203/ecm.v008a06.

Naqvi, Syeda Masooma and Buckley, C.T. (2015) 'Differential response of encapsulated nucleus pulposus and bone marrow stem cells in isolation and coculture in alginate and chitosan hydrogels', *Tissue Engineering. Part A*, 21(1–2), pp. 288–299. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0719.

Naqvi, Syeda M. and Buckley, C.T. (2015) 'Extracellular matrix production by nucleus pulposus and bone marrow stem cells in response to altered oxygen and glucose microenvironments', *Journal of Anatomy*, 227(6), pp. 757–766. doi:10.1111/joa.12305.

Narayan, R. *et al.* (2018) 'Mesoporous silica nanoparticles: {A} comprehensive review on synthesis and recent advances', *Pharmaceutics*, 10(3). doi:10.3390/pharmaceutics10030118.

Naso, M.F. *et al.* (2017) 'Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy', *BioDrugs*. Springer International Publishing, pp. 317–334. doi:10.1007/s40259-017-0234-5.

Nauta, A.J. and Fibbe, W.E. (2007) 'Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells', *Blood*, 110(10), pp. 3499–3506. doi:10.1182/blood-2007-02-069716.

Nguyen, A. *et al.* (2008) 'Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment', *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1–2), pp. 128–135. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.06.033.

Nguyen, T.A. *et al.* (2015) 'Functional Anatomy of the Human Microprocessor', *Cell*, 161(6), pp. 1374–1387. doi:10.1016/J.CELL.2015.05.010.

Niu, C.-C. *et al.* (2019) 'Upregulation of miR-107 expression following hyperbaric oxygen treatment suppresses HMGB1/RAGE signaling in degenerated human nucleus pulposus cells', *Arthritis Research & Therapy*, 21(1), p. 42. doi:10.1186/s13075-019-1830-1.

Noorwali, H. *et al.* (2018) 'Link N as a therapeutic agent for discogenic pain', *JOR spine*, 1(1), p. e1008. doi:10.1002/jsp2.1008.

Ntini, E. and Marsico, A. (2019) 'Functional impacts of non-coding RNA processing on enhancer activity and target gene expression.', *Journal of molecular cell biology* [Preprint]. doi:10.1093/jmcb/mjz047.

Ogon, I. *et al.* (2019) 'Imaging diagnosis for intervertebral disc', *JOR Spine*, 3(1), p. e1066. doi:10.1002/jsp2.1066.

Ohnishi, T. *et al.* (2019) 'Caspase-3 knockout inhibits intervertebral disc degeneration related to injury but accelerates degeneration related to aging', *Scientific Reports*, 9(1), p. 19324. doi:10.1038/s41598-019-55709-3.

Omlor, G.W. *et al.* (2014) 'Short-term follow-up of disc cell therapy in a porcine nucleotomy model with an albumin-hyaluronan hydrogel: in vivo and in vitro results of metabolic disc cell activity and implant distribution', *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, 23(9), pp. 1837–1847. doi:10.1007/s00586-014-3314-y.

O'Neill, C.P. and Dwyer, R.M. (2020) 'Nanoparticle-Based Delivery of Tumor Suppressor microRNA for Cancer Therapy.', *Cells*, 9(2). doi:10.3390/cells9020521.

Ørom, U.A., Kauppinen, S. and Lund, A.H. (2006) 'LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function.', *Gene*, 372, pp. 137–41. doi:10.1016/j.gene.2005.12.031.

Orozco, L. *et al.* (2011) 'Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study', *Transplantation*, 92(7), pp. 822–828. doi:10.1097/TP.0b013e3182298a15.

Paesold, G., Nerlich, A.G. and Boos, N. (2007) 'Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings', *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*, 16(4), pp. 447–468. doi:10.1007/s00586-006-0220-y.

Panjabi, M.M. *et al.* (1994) 'Mechanical behavior of the human lumbar and lumbosacral spine as shown by three-dimensional load-displacement curves', *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 76(3), pp. 413–424. doi:10.2106/00004623-199403000-00012.

Pardi, N. *et al.* (2018) 'mRNA vaccines - a new era in vaccinology', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 17(4), pp. 261–279. doi:10.1038/nrd.2017.243.

Park, S.J. (2020) 'Protein-Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles', *International Journal of Nanomedicine*, 15, pp. 5783–5802. doi:10.2147/IJN.S254808.

Parreira, P. *et al.* (2017) 'Back Schools for chronic non-specific low back pain', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 8, p. CD011674. doi:10.1002/14651858.CD011674.pub2.

Patel, D.H. and Misra, A. (2011) 'Gene Delivery Using Viral Vectors', in *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*. Elsevier Inc., pp. 207–270. doi:10.1016/B978-0-12-384964-9.00005-0.

Patra, A. and Richert, C. (2009) 'High fidelity base pairing at the 3'-terminus', *Journal of the American Chemical Society*, 131(35), pp. 12671–12681. doi:10.1021/ja9033654.

Pautu, V. *et al.* (2021) 'pH-Responsive Lipid Nanocapsules: A Promising Strategy for Improved Resistant Melanoma Cell Internalization', *Cancers*, 13(9), p. 2028. doi:10.3390/cancers13092028.

Peake, N.J. *et al.* (2014) 'Role of C-type natriuretic peptide signalling in maintaining cartilage and bone function', *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(11), pp. 1800–1807. doi:10.1016/j.joca.2014.07.018.

Peng, Y. and Croce, C.M. (2016) 'The role of MicroRNAs in human cancer.', *Signal transduction and targeted therapy*, 1, p. 15004. doi:10.1038/sigtrans.2015.4.

Penolazzi, L. *et al.* (2018) 'MicroRNA - 221 silencing attenuates the degenerated phenotype of intervertebral disc cells', *Aging*, 10(8), pp. 1–15. doi:10.18632/aging.101525.

Perrier, T. *et al.* (2010) 'Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms', *International Journal of Pharmaceutics*, 396(1–2), pp. 204–209. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.06.019.

Perrier, T., Saulnier, P. and Benoît, J.-P. (2010) 'Methods for the functionalisation of nanoparticles: new insights and perspectives', *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 16(38), pp. 11516–11529. doi:10.1002/chem.201000808.

Pettine, K.A. *et al.* (2015) 'Percutaneous injection of autologous bone marrow concentrate cells significantly reduces lumbar discogenic pain through 12 months', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 33(1), pp. 146–156. doi:10.1002/stem.1845.

Pfirrmann, C.W. *et al.* (2001) 'Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration', *Spine*, 26(17), pp. 1873–1878. doi:10.1097/00007632-200109010-00011.

Pfizer (2020) A PHASE 3, RANDOMIZED, DOUBLE BLIND, PLACEBO AND ACTIVE-CONTROLLED, MULTICENTER, PARALLEL-GROUP STUDY OF THE ANALGESIC EFFICACY AND SAFETY OF TANEZUMAB IN ADULT SUBJECTS WITH CHRONIC LOW BACK PAIN. Clinical trial registration NCT02528253. clinicaltrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02528253> (Accessed: 9 September 2021).

Phillips, F.M., Reuben, J. and Wetzel, F.T. (2002) 'Intervertebral disc degeneration adjacent to a lumbar fusion. An experimental rabbit model', *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 84(2), pp. 289–294. doi:10.1302/0301-620x.84b2.11937.

Pi, Y. *et al.* (2011) 'Targeted delivery of non-viral vectors to cartilage in vivo using a chondrocyte-homing peptide identified by phage display', *Biomaterials*, 32(26), pp. 6324–6332. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.017.

Pooni, J.S. *et al.* (1986) 'Comparison of the structure of human intervertebral discs in the cervical, thoracic and lumbar regions of the spine', *Surgical and radiologic anatomy: SRA*, 8(3), pp. 175–182. doi:10.1007/BF02427846.

Pourshafie, N. *et al.* (2018) 'Systemic delivery of {microRNA} using recombinant adeno-associated virus serotype 9 to treat neuromuscular diseases in rodents', *Journal of Visualized Experiments*, 2018(138). doi:10.3791/55724.

Prologo, J.D. *et al.* (2012) 'Percutaneous image-guided delivery for the transplantation of mesenchymal stem cells in the setting of degenerated intervertebral discs', *Journal of vascular and interventional radiology: JVIR*, 23(8), pp. 1084–1088.e6. doi:10.1016/j.jvir.2012.04.032.

Qin, C. *et al.* (2019) 'MicroRNA-149 Suppresses Inflammation in Nucleus Pulposus Cells of Intervertebral Discs by Regulating MyD88.', *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 25, pp. 4892–4900. doi:10.12659/MSM.915858.

Qiu, X. and Hildebrandt, N. (2015) 'Rapid and Multiplexed MicroRNA Diagnostic Assay Using Quantum Dot-Based Förster Resonance Energy Transfer', *ACS Nano*, 9(8), pp. 8449–8457. doi:10.1021/acsnano.5b03364.

Radcliff, K. *et al.* (2013) 'Does opioid pain medication use affect the outcome of patients with lumbar disc herniation?', *Spine*, 38(14), pp. E849–860. doi:10.1097/BRS.0b013e3182959e4e.

Raemdonck, K. *et al.* (2008) 'Maintaining the silence: reflections on long-term RNAi', *Drug Discovery Today*, 13(21–22), pp. 917–931. doi:10.1016/j.drudis.2008.06.008.

Raj, P.P. (2008) 'Intervertebral Disc: Anatomy-Physiology-Pathophysiology-Treatment', *Pain Practice*, 8(1), pp. 18–44. doi:10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x.

- Reid, G. *et al.* (2016) 'Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer', *Epigenomics*, 8(8), pp. 1079–1085. doi:10.2217/epi-2016-0035.
- Reshma, V.G. and Mohanan, P. V. (2019) 'Quantum dots: Applications and safety consequences', *Journal of Luminescence*. Elsevier B.V., pp. 287–298. doi:10.1016/j.jlumin.2018.09.015.
- Resnier, P. *et al.* (2013) 'A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer', *Biomaterials*, 34(27), pp. 6429–6443. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.04.060.
- Resnier, P. *et al.* (2014) 'Efficient in vitro gene therapy with PEG siRNA lipid nanocapsules for passive targeting strategy in melanoma.', *Biotechnology journal*, 9(11), pp. 1389–1401. doi:10.1002/biot.201400162.
- Resnier, P. *et al.* (2017a) 'Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse.', *Pharmacological research*, 126, pp. 54–65. doi:10.1016/j.phrs.2017.01.031.
- Resnier, P. *et al.* (2017b) 'Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse.', *Pharmacological research*, 126, pp. 54–65. doi:10.1016/j.phrs.2017.01.031.
- Resnier, P. *et al.* (2017c) 'Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse.', *Pharmacological research*, 126, pp. 54–65. doi:10.1016/j.phrs.2017.01.031.
- Reynolds, A.R., Moghimi, S.M. and Hodivala-Dilke, K. (2003) 'Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature', *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, pp. 2–4. doi:10.1016/S1471-4914(02)00004-7.
- de Rie, D. *et al.* (2017) 'An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse', *Nature Biotechnology*, 35(9), pp. 872–878. doi:10.1038/nbt.3947.
- Risbud, M.V., Schipani, E. and Shapiro, I.M. (2010) 'Hypoxic regulation of nucleus pulposus cell survival: from niche to notch', *The American Journal of Pathology*, 176(4), pp. 1577–1583. doi:10.2353/ajpath.2010.090734.
- Risbud, M.V. and Shapiro, I.M. (2011) 'Notochordal cells in the adult intervertebral disc: new perspective on an old question', *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 21(1), pp. 29–41. doi:10.1615/critreveukargeneexpr.v21.i1.30.
- Risbud, M.V. and Shapiro, I.M. (2014) 'Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content', *Nature Reviews. Rheumatology*, 10(1), pp. 44–56. doi:10.1038/nrrheum.2013.160.
- Roberts, S. *et al.* (2006) 'Histology and pathology of the human intervertebral disc', *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 88 Suppl 2, pp. 10–14. doi:10.2106/JBJS.F.00019.
- Rodriguez, A.G. *et al.* (2012) 'Morphology of the human vertebral endplate', *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 30(2), pp. 280–287. doi:10.1002/jor.21513.
- Rogers, C. *et al.* (2017) 'Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death', *Nature Communications*, 8, p. 14128. doi:10.1038/ncomms14128.

Romero, G. and Moya, S.E. (2012) 'Synthesis of organic nanoparticles', in *Frontiers of Nanoscience*. Elsevier Ltd, pp. 115–141. doi:10.1016/B978-0-12-415769-9.00004-2.

Romero-Cordoba, S.L. *et al.* (2014a) 'miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer.', *Cancer biology & therapy*, 15(11), pp. 1444–55. doi:10.4161/15384047.2014.955442.

Romero-Cordoba, S.L. *et al.* (2014b) 'miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer.', *Cancer biology & therapy*, 15(11), pp. 1444–55. doi:10.4161/15384047.2014.955442.

Rottiers, V. and Näär, A.M. (2012) 'MicroRNAs in Metabolism and Metabolic Disorders', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), pp. 239–250. doi:10.1038/nrm3313.

Rupaimoole, R. and Slack, F.J. (2017) 'MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases', *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), pp. 203–222. doi:10.1038/nrd.2016.246.

Ryu, J.H. *et al.* (2010) 'Self-cross-linked polymer nanogels: {A} versatile nanoscopic drug delivery platform', *Journal of the American Chemical Society*, 132(48), pp. 17227–17235. doi:10.1021/ja1069932.

Šagát, P. *et al.* (2020) 'Impact of COVID-19 Quarantine on Low Back Pain Intensity, Prevalence, and Associated Risk Factors among Adult Citizens Residing in Riyadh (Saudi Arabia): A Cross-Sectional Study', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(19), p. E7302. doi:10.3390/ijerph17197302.

Sahin, U., Karikó, K. and Türeci, Ö. (2014) 'mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(10), pp. 759–780. doi:10.1038/nrd4278.

Sakai, D. and Andersson, G.B.J. (2015) 'Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions', *Nature Reviews. Rheumatology*, 11(4), pp. 243–256. doi:10.1038/nrrheum.2015.13.

Salehi, S., Koeck, K. and Scheibel, T. (2020) 'Spider Silk for Tissue Engineering Applications', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(3), p. E737. doi:10.3390/molecules25030737.

Sarker, B. *et al.* (2015) 'Combining collagen and bioactive glasses for bone tissue engineering: a review', *Advanced Healthcare Materials*, 4(2), pp. 176–194. doi:10.1002/adhm.201400302.

Sarshad, A.A. *et al.* (2018) 'Argonaute-miRNA Complexes Silence Target mRNAs in the Nucleus of Mammalian Stem Cells', *Molecular Cell*, 71(6), pp. 1040–1050.e8. doi:10.1016/J.MOLCEL.2018.07.020.

Schutgens, E.M. *et al.* (2015) 'Biomaterials for intervertebral disc regeneration: past performance and possible future strategies', *European Cells & Materials*, 30, pp. 210–231. doi:10.22203/ecm.v030a15.

Semple, Sean C. *et al.* (2010) 'Rational design of cationic lipids for siRNA delivery', *Nature Biotechnology*, 28(2), pp. 172–176. doi:10.1038/nbt.1602.

Semple, Sean C *et al.* (2010) 'Rational design of cationic lipids for siRNA delivery.', *Nature biotechnology*, 28(2), pp. 172–6. doi:10.1038/nbt.1602.

Shao, T. *et al.* (2019) 'The long noncoding RNA HOTAIR serves as a microRNA-34a-5p sponge to reduce nucleus pulposus cell apoptosis via a NOTCH1-mediated mechanism', *Gene*, p. 144029. doi:10.1016/J.GENE.2019.144029.

Shao, X. and Hunter, C.J. (2007) 'Developing an alginate/chitosan hybrid fiber scaffold for annulus fibrosus cells', *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 82(3), pp. 701–710. doi:10.1002/jbm.a.31030.

Shapiro, I.M. and Risbud, M.V. (eds) (2014) *The Intervertebral Disc: Molecular and Structural Studies of the Disc in Health and Disease*. Wien: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-3-7091-1535-0.

Shaw, K.A. *et al.* (2019) 'The Effect of Spinal Arthrodesis on Health-Related Quality of Life for Patients with Nonambulatory Cerebral Palsy: A Critical Analysis Review', *JBJS reviews*, 7(12), p. e1. doi:10.2106/JBJS.RVW.19.00036.

Shenoda, B.B., Ramanathan, S. and Ajit, S.K. (2017) 'In Vitro Validation of miRNA-Mediated Gene Expression Linked to Drug Metabolism', *Current protocols in pharmacology*, 79, p. 9.26.1-9.26.15. doi:10.1002/cpph.30.

Shi, C. *et al.* (2019) '{MiR}-202-3p regulates interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinase 1 in human nucleus pulposus', *Gene*, 687, pp. 156–165. doi:10.1016/J.GENE.2018.11.056.

Shiri, R. *et al.* (2019) 'Risk Factors for Low Back Pain: A Population-Based Longitudinal Study', *Arthritis Care & Research*, 71(2), pp. 290–299. doi:10.1002/acr.23710.

Singh, Y., Murat, P. and Defrancq, E. (2010) 'Recent developments in oligonucleotide conjugation.', *Chemical Society reviews*, 39(6), pp. 2054–2070. doi:10.1039/b911431a.

Son, K. *et al.* (2020) 'Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by polysarcosine coating of liposomes', *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 322, pp. 209–216. doi:10.1016/j.jconrel.2020.03.022.

Sonawane, N.D., Szoka, F.C. and Verkman, A.S. (2003) 'Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes.', *The Journal of biological chemistry*, 278(45), pp. 44826–31. doi:10.1074/jbc.M308643200.

Sonkoly, E. and Pivarcsi, A. (2009) 'MicroRNAs in inflammation', *International Reviews of Immunology*, 28(6), pp. 535–561. doi:10.5001/omj.2012.26.

Stafford, M.A., Peng, P. and Hill, D.A. (2007) 'Sciatica: a review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management', *British Journal of Anaesthesia*, 99(4), pp. 461–473. doi:10.1093/bja/aem238.

Steffens, D. *et al.* (2016) 'Prevention of Low Back Pain: A Systematic Review and Meta-analysis', *JAMA internal medicine*, 176(2), pp. 199–208. doi:10.1001/jamainternmed.2015.7431.

Stoyanov, J.V. *et al.* (2011) 'Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells', *European Cells & Materials*, 21, pp. 533–547. doi:10.22203/ecm.v021a40.

Sukumar, U.K. *et al.* (2019) 'Intranasal delivery of targeted polyfunctional gold-iron oxide nanoparticles loaded with therapeutic microRNAs for combined theranostic multimodality imaging and presensitization of glioblastoma to temozolomide', *Biomaterials*, 218, p. 119342.

- Sun, B.S. *et al.* (2008) 'Lentiviral-mediated miRNA against osteopontin suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma', *Hepatology*, 48(6), pp. 1834–1842. doi:10.1002/hep.22531.
- Sun, J. *et al.* (2018) 'Transcription factor 7-like 2 controls matrix degradation through nuclear factor κ B signaling and is repressed by {microRNA}-155 in nucleus pulposus cells', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108(June), pp. 646–655. doi:10.1016/J.BIOPHA.2018.09.076.
- Sun, J. *et al.* (2019) 'MiR-499a-5p suppresses apoptosis of human nucleus pulposus cells and degradation of their extracellular matrix by targeting SOX4', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 113, p. 108652. doi:10.1016/j.biopha.2019.108652.
- Sun, S. *et al.* (2019) 'CD123/CD33 dual-antibody modified liposomes effectively target acute myeloid leukemia cells and reduce antigen-negative escape', *International Journal of Pharmaceutics*, 568, p. 118518. doi:10.1016/J.IJPHARM.2019.118518.
- Sun, Z. *et al.* (2018) 'MiR-532 downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling via targeting Bcl-9 and induced human intervertebral disc nucleus pulposus cells apoptosis', *Journal of Pharmacological Sciences* [Preprint]. doi:10.1016/j.jphs.2018.10.007.
- Sun, Z., Liu, B. and Luo, Z.-J. (2020) 'The Immune Privilege of the Intervertebral Disc: Implications for Intervertebral Disc Degeneration Treatment', *International Journal of Medical Sciences*, 17(5), pp. 685–692. doi:10.7150/ijms.42238.
- Sung, Y.K. and Kim, S.W. (2019) 'Recent advances in the development of gene delivery systems', *Biomaterials Research*, 23(1). doi:10.1186/s40824-019-0156-z.
- Swiecicki, J.-M. *et al.* (2016) 'How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides', *Scientific Reports*, 6, p. 20237. doi:10.1038/srep20237.
- Szwed, M. *et al.* (2020) 'Biological response and cytotoxicity induced by lipid nanocapsules', *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), p. 5. doi:10.1186/s12951-019-0567-y.
- Tabatabaei, S.N. *et al.* (2019) 'Co-delivery of miR-181a and melphalan by lipid nanoparticles for treatment of seeded retinoblastoma', *Journal of Controlled Release*, 298, pp. 177–185. doi:10.1016/j.jconrel.2019.02.014.
- Takayama, Y., Kusamori, K. and Nishikawa, M. (2019) 'Click Chemistry as a Tool for Cell Engineering and Drug Delivery', *Molecules*, 24(1), p. 172. doi:10.3390/molecules24010172.
- Tan, H. *et al.* (2018) 'microRNA-665 promotes the proliferation and matrix degradation of nucleus pulposus through targeting GDF5 in intervertebral disc degeneration', *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(March), pp. 1–8. doi:10.1002/jcb.26888.
- Tang, N. *et al.* (2020) 'Silencing of Long Non-coding RNA NEAT1 Upregulates miR-195a to Attenuate Intervertebral Disk Degeneration via the BAX/BAK Pathway', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. doi:10.3389/fmolb.2020.00147.
- Tani, H., Sato, H. and Torimura, M. (2017) 'Rapid monitoring of RNA degradation activity in vivo for mammalian cells', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(4), pp. 523–527. doi:10.1016/J.JBIOSC.2016.11.010.

- Tao, B. *et al.* (2017) 'microRNA-96 regulates the proliferation of nucleus pulposus cells by targeting ARID2/AKT signaling', *Molecular Medicine Reports*, 16(5), pp. 7553–7560. doi:10.3892/mmr.2017.7560.
- Teixeira, G.Q. *et al.* (2018) 'Immunomodulation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Intervertebral Disc Degeneration: Insights From a Proinflammatory/Degenerative Ex Vivo Model', *Spine*, 43(12), pp. E673–E682. doi:10.1097/BRS.0000000000002494.
- Teng, Q., Federici, T. and Boulis, N.M. (2006) 'Viral Vector Axonal Uptake and Retrograde Transport: Mechanisms and Applications', in *Gene Therapy of the Central Nervous System: From Bench to Bedside*. Elsevier Inc., pp. 253–271. doi:10.1016/B978-012397632-1/50021-6.
- Thomas, O. and Lagarce, F. (2013) 'Lipid nanocapsules: A nanocarrier suitable for scale-up process', *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 23(6), pp. 555–559. doi:10.1016/S1773-2247(13)50084-0.
- Tian, Y. *et al.* (2016) 'TGF β regulates Galectin-3 expression through canonical Smad3 signaling pathway in nucleus pulposus cells: implications in intervertebral disc degeneration', *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 50, pp. 39–52. doi:10.1016/j.matbio.2015.11.008.
- Torchilin, V.P. *et al.* (2001) 'TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), pp. 8786–8791. doi:10.1073/pnas.151247498.
- Tsirimoniaki, E. *et al.* (2013a) 'PKC ϵ signalling activates ERK1/2, and regulates aggrecan, ADAMTS5, and miR377 gene expression in human nucleus pulposus cells', *PLoS ONE*. Edited by D. Kletsas, 8(11), p. e82045. doi:10.1371/journal.pone.0082045.
- Tsirimoniaki, E. *et al.* (2013b) 'PKC ϵ signalling activates ERK1/2, and regulates aggrecan, ADAMTS5, and miR377 gene expression in human nucleus pulposus cells', *PLoS ONE*. Edited by D. Kletsas, 8(11), p. e82045. doi:10.1371/journal.pone.0082045.
- van Tulder, M.W. *et al.* (2003) 'Muscle relaxants for non-specific low back pain', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2), p. CD004252. doi:10.1002/14651858.CD004252.
- Uchida, S. *et al.* (2020) 'Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery', *Molecular Pharmaceutics*, 17(10), pp. 3654–3684. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c00618.
- Urban, J.P.G. and Winlove, C.P. (2007) 'Pathophysiology of the intervertebral disc and the challenges for MRI', *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 25(2), pp. 419–432. doi:10.1002/jmri.20874.
- Vadalà, G. *et al.* (2013) 'The transpedicular approach as an alternative route for intervertebral disc regeneration', *Spine*, 38(6), pp. E319–324. doi:10.1097/BRS.0b013e318285bc4a.
- Vadalà, G. *et al.* (2021) 'Stem Cells and Intervertebral Disc Regeneration Overview-What They Can and Can't Do', *International Journal of Spine Surgery*, 15(s1), pp. 40–53. doi:10.14444/8054.
- Vergroesen, P.-P.A. *et al.* (2015) 'Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle', *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(7), pp. 1057–1070. doi:10.1016/j.joca.2015.03.028.

- Wang, B. *et al.* (2016) 'MiR-138-5p promotes TNF- α -induced apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting SIRT1 through PTEN/PI3K/Akt signaling', *Experimental Cell Research*, 345(2), pp. 199–205. doi:10.1016/j.yexcr.2016.05.011.
- Wang, C., Wang, W.-J.J., *et al.* (2015) 'MicroRNAs: New players in intervertebral disc degeneration', *Clinica Chimica Acta*, 450, pp. 333–341. doi:10.1016/j.cca.2015.09.011.
- Wang, C., Wang, W.-J., *et al.* (2015) 'MicroRNAs: New players in intervertebral disc degeneration.', *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 450, pp. 333–341. doi:10.1016/j.cca.2015.09.011.
- Wang, C. *et al.* (2017) 'MiR-210 facilitates ECM degradation by suppressing autophagy via silencing of ATG7 in human degenerated NP cells', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, pp. 470–479. doi:10.1016/J.BIOPHA.2017.06.048.
- Wang, H. *et al.* (2018) 'Circular RNA circ-4099 is induced by TNF- α and regulates ECM synthesis by blocking miR-616-5p inhibition of Sox9 in intervertebral disc degeneration', *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), p. 27. doi:10.1038/s12276-018-0056-7.
- Wang, H.Q. *et al.* (2011a) 'Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3', *Journal of Pathology*, 225(2), pp. 232–242. doi:10.1002/path.2931.
- Wang, H.Q. *et al.* (2011b) 'Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3', *Journal of Pathology* [Preprint]. doi:10.1002/path.2931.
- Wang, J. *et al.* (2019) 'Upregulated miR-154 promotes ECM degradation in intervertebral disc degeneration', *Journal of Cellular Biochemistry* [Preprint]. doi:10.1002/jcb.28471.
- Wang, R., Wen, B. and Sun, D. (2019) 'miR-573 regulates cell proliferation and apoptosis by targeting Bax in nucleus pulposus cells.', *Cellular & molecular biology letters*, 24(1), p. 2. doi:10.1186/s11658-018-0132-y.
- Wang, T. *et al.* (2015) 'MicroRNA-494 inhibition protects nucleus pulposus cells from TNF- α -induced apoptosis by targeting JunD', *Biochimie*, 115, pp. 1–7. doi:10.1016/j.biochi.2015.04.011.
- Wang, W. *et al.* (2018) 'Upregulation of miR-199 attenuates TNF- α -induced Human nucleus pulposus cell apoptosis by downregulating MAP3K5', *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Preprint]. doi:10.1016/J.BBRC.2018.09.194.
- Wang, W. *et al.* (2019) '{miR}-222 induces apoptosis in human intervertebral disc nucleus pulposus cells by targeting {Bcl}-2.', *Molecular medicine reports* [Preprint]. doi:10.3892/mmr.2019.10732.
- Wang, W.-J.J. *et al.* (2018) 'MiR-21 promotes ECM degradation through inhibiting autophagy via the PTEN/akt/mTOR signaling pathway in human degenerated NP cells', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 99(November 2017), pp. 725–734. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.154.
- Wang, X. *et al.* (2017) 'LncRNA-RP11-296A18.3/miR-138/HIF1A Pathway Regulates the Proliferation ECM Synthesis of Human Nucleus Pulposus Cells (HNPCs)', *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(12), pp. 4862–4871. doi:10.1002/jcb.26166.

- Wang, Xiaobin, Wang, B., *et al.* (2018) 'CircSEMA4B targets miR-431 modulating IL-1 β -induced degradative changes in nucleus pulposus cells in intervertebral disc degeneration via Wnt pathway', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(11), pp. 3754–3768. doi:10.1016/j.bbadis.2018.08.033.
- Wang, Xiaobin, Zou, M., *et al.* (2018) 'LncRNA H19 targets miR-22 to modulate H₂O₂-induced deregulation in nucleus pulposus cell senescence, proliferation, and ECM synthesis through Wnt signaling', *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(6), pp. 4990–5002. doi:10.1002/jcb.26738.
- Wang, Xuesong *et al.* (2018) 'LncRNA-RMRP promotes nucleus pulposus cell proliferation through regulating miR-206 expression', *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [Preprint]. doi:10.1111/jcmm.13817.
- Wang, X.-B. *et al.* (2019) 'LINC00641 regulates autophagy and intervertebral disc degeneration by acting as a competitive endogenous RNA of miR-153-3p under nutrition deprivation stress', *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), pp. 7115–7127. doi:10.1002/jcp.27466.
- Wang, X.W. *et al.* (2017) 'Adenovirus-mediated gene transfer of {microRNA}-21 sponge inhibits neointimal hyperplasia in rat vein grafts', *International Journal of Biological Sciences*, 13(10), pp. 1309–1319. doi:10.7150/ijbs.20254.
- Wang, X.-W. *et al.* (2017) 'The in vitro and in vivo effects of microRNA-133a on intervertebral disc destruction by targeting MMP9 in spinal tuberculosis', *Life Sciences*, 188, pp. 198–205. doi:10.1016/j.lfs.2017.07.022.
- Waxenbaum, J.A. and Futterman, B. (2018) *Anatomy, Back, Intervertebral Discs, StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Waxenbaum, J.A., Reddy, V. and Futterman, B. (2021) 'Anatomy, Back, Intervertebral Discs', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470583/> (Accessed: 30 August 2021).
- Westholm, J.O. and Lai, E.C. (2011) 'Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing.', *Biochimie*, 93(11), pp. 1897–904. doi:10.1016/j.biochi.2011.06.017.
- Whatley, B.R. and Wen, X. (2012) 'Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration', *Materials Science and Engineering: C*, 32(2), pp. 61–77. doi:10.1016/J.MSEC.2011.10.011.
- Williams, F.M.K. *et al.* (2011) 'GDF5 single-nucleotide polymorphism rs143383 is associated with lumbar disc degeneration in Northern European women', *Arthritis and Rheumatism*, 63(3), pp. 708–712. doi:10.1002/art.30169.
- Williams, M.M. *et al.* (1991) 'A comparison of the effects of two sitting postures on back and referred pain', *Spine*, 16(10), pp. 1185–1191. doi:10.1097/00007632-199110000-00010.
- Wold, W.S.M. and Toth, K. (2013) 'Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy.', *Current gene therapy*, 13(6), pp. 421–433.
- Wood, H. (2018) '{FDA} approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis', *Nature Reviews Neurology*, 14(10), p. 570. doi:10.1038/s41582-018-0065-0.

Worgall, S. and Crystal, R.G. (2014) 'Gene Therapy', in *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier, pp. 657–686. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00034-3.

Wu, N. *et al.* (2019) 'Tissue-Specific Immunity in Homeostasis and Diseases', *Journal of Immunology Research*, 2019, p. 7616509. doi:10.1155/2019/7616509.

Xi, Y. *et al.* (2017) 'Long non-coding HCG18 promotes intervertebral disc degeneration by sponging miR-146a-5p and regulating TRAF6 expression', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 13234–13234. doi:10.1038/s41598-017-13364-6.

Xia, C. *et al.* (2019) 'Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration via anti-oxidant and anti-inflammatory effects', *Free Radical Biology & Medicine*, 143, pp. 1–15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.026.

Xu, C. *et al.* (2021) 'Integrated transcriptome and proteome analyses identify novel regulatory network of nucleus pulposus cells in intervertebral disc degeneration', *BMC medical genomics*, 14(1), p. 40. doi:10.1186/s12920-021-00889-z.

Xu, Y. *et al.* (2016) 'Dysregulated miR-133a Mediates Loss of Type II Collagen by Directly Targeting Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) in Human Intervertebral Disc Degeneration', *SPINE*, 41(12), pp. E717–E724. doi:10.1097/BRS.0000000000001375.

Xue, H. *et al.* (2015) 'Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery', *Current Pharmaceutical Design*, 21(22), pp. 3140–3147. doi:10.2174/1381612821666150531164540.

YALTIRIK, C.K. *et al.* (2019) 'The Evaluation of Proteoglycan Levels and the Possible Role of ACAN Gene (c.6423T>C) Variant in Patients with Lumbar Disc Degeneration Disease', *In Vivo*, 33(2), pp. 413–417. doi:10.21873/invivo.11488.

Yan, N. *et al.* (2015) 'No Title', 36(6). doi:10.1159/000430187.

Yan, Y. *et al.* (2019) 'Nanosized functional miRNA liposomes and application in the treatment of TNBC by silencing slug gene', *International Journal of Nanomedicine*, 14, pp. 3645–3667. doi:10.2147/IJN.S207837.

Yáñez-Sedeño, P. *et al.* (2019) 'Copper(I)-Catalyzed Click Chemistry as a Tool for the Functionalization of Nanomaterials and the Preparation of Electrochemical (Bio)Sensors', *Sensors (Basel, Switzerland)*, 19(10), p. 2379. doi:10.3390/s19102379.

Yang, C. *et al.* (2019a) 'miRNA-155 expression and role in pathogenesis in spinal tuberculosis-induced intervertebral disc destruction.', *Experimental and therapeutic medicine*, 17(4), pp. 3239–3246. doi:10.3892/etm.2019.7313.

Yang, C. *et al.* (2019b) '{miRNA}-155 expression and role in pathogenesis in spinal tuberculosis-induced intervertebral disc destruction.', *Experimental and therapeutic medicine*, 17(4), pp. 3239–3246. doi:10.3892/etm.2019.7313.

Yang, J.-J. *et al.* (2018) 'Intervertebral disc needle puncture injury can be repaired using a gelatin-poly (γ -glutamic acid) hydrogel: an in vitro bovine biomechanical validation', *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*, 27(10), pp. 2631–2638. doi:10.1007/s00586-018-5727-5.

- Yang, Q. *et al.* (2019) 'MicroRNA-143-5p targeting eEF2 gene mediates intervertebral disc degeneration through the AMPK signaling pathway', *Arthritis Research & Therapy*, 21(1), p. 97. doi:10.1186/s13075-019-1863-5.
- Yang, R.-S. *et al.* (2019a) 'MiR-146 regulates the repair and regeneration of intervertebral nucleus pulposus cells via Notch1 pathway.', *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(11), pp. 4591–4598. doi:10.26355/eurrev_201906_18036.
- Yang, R.-S. *et al.* (2019b) 'MiR-146 regulates the repair and regeneration of intervertebral nucleus pulposus cells via Notch1 pathway.', *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(11), pp. 4591–4598. doi:10.26355/eurrev_201906_18036.
- Yang, S. *et al.* (2018) 'Bu-Shen-Huo-Xue-Fang (BSHXF) modulates nucleus pulposus cell proliferation and extracellular matrix (ECM) remodeling in intervertebral disc degeneration through miR-483 regulation of Wnt pathway', *Journal of Cellular Biochemistry* [Preprint]. doi:10.1002/jcb.26760.
- Yang, S. *et al.* (2019c) 'Aucubin inhibits IL-1 β - or TNF- α -induced extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cell through blocking the miR-140-5p/CREB1 axis', *Journal of Cellular Physiology* [Preprint]. doi:10.1002/jcp.28044.
- Ye, D. *et al.* (2012) 'MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the P53 signaling', *Stem Cells*, 30(8), pp. 1645–1654. doi:10.1002/stem.1149.
- Ye, D. *et al.* (2016a) 'MIR-155 Inhibits Nucleus Pulposus Cells' Degeneration through Targeting ERK 1/2', *Disease Markers*, 2016, p. 6984270. doi:10.1155/2016/6984270.
- Ye, D. *et al.* (2016b) 'MIR-155 Inhibits Nucleus Pulposus Cells' Degeneration through Targeting ERK 1/2', *Disease Markers*, 2016, pp. 1–7. doi:10.1155/2016/6984270.
- Yin, X. *et al.* (2020) 'Effects of Glucose Deprivation on ATP and Proteoglycan Production of Intervertebral Disc Cells under Hypoxia', *Scientific Reports*, 10(1), p. 8899. doi:10.1038/s41598-020-65691-w.
- Yoo, J. *et al.* (2019) 'Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems', *Cancers*, 11(5), p. E640. doi:10.3390/cancers11050640.
- Yu, B. *et al.* (2009) 'Targeted Delivery Systems for Oligonucleotide Therapeutics', *The AAPS Journal*, 11(1), pp. 195–203. doi:10.1208/s12248-009-9096-1.
- Yu, L. *et al.* (2018) 'LINC00969 promotes the degeneration of intervertebral disk by sponging miR-335-3p and regulating NLRP3 inflammasome activation', *IUBMB Life* [Preprint]. doi:10.1002/iub.1989.
- Yu, X. *et al.* (2013) 'MicroRNA-10b promotes nucleus pulposus cell proliferation through RhoC-Akt pathway by targeting HOXD10 in intervertebral disc degeneration', *PLoS ONE*. Edited by J.Q. Cheng, 8(12), pp. 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0083080.
- Yu, Y. *et al.* (2018) 'LncRNA HOTAIR suppresses TNF- α induced apoptosis of nucleus pulposus cells by regulating miR-34a/Bcl-2 axis', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107(17), pp. 729–737. doi:10.1016/j.biopha.2018.08.033.
- Yuhan Corporation (2015) *A Double-blind, Randomized, Parallel, Placebo Controlled, Phase I/II Clinical Trial to Investigate the Safety, Tolerability and Efficacy of YH14618 Following Single Intradiscal Injection*

in Patients With Degenerative Disc Disease. Clinical trial registration NCT01526330. clinicaltrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01526330> (Accessed: 9 September 2021).

Yuhan Corporation (2016) *A Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Phase 2b Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of YH14618 in Patients With Lumbar Degenerative Disc Disease*. Clinical trial registration study/NCT02320019. clinicaltrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02320019> (Accessed: 9 September 2021).

Yun, Z. *et al.* (2020) 'Overexpression of microRNA-185 alleviates intervertebral disc degeneration through inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and downregulation of Galectin-3', *Molecular Pain*, 16. doi:10.1177/1744806920902559.

Zhang, B. *et al.* (2018) 'Dysregulated MiR-3150a-3p Promotes Lumbar Intervertebral Disc Degeneration by Targeting Aggrecan', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(6), pp. 2506–2515. doi:10.1159/000488269.

ZHANG, D.-Y. *et al.* (2016) 'Role of microRNA-210 in human intervertebral disc degeneration.', *Experimental and therapeutic medicine*, 11(6), pp. 2349–2354. doi:10.3892/etm.2016.3176.

ZHANG, F. *et al.* (2016) 'Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration (Review)', *International Journal of Molecular Medicine*, 37(6), pp. 1439–1448. doi:10.3892/ijmm.2016.2573.

Zhang, G. *et al.* (2018) 'Detection of miR-29a in plasma of patients with lumbar spinal stenosis and the clinical significance', *Molecular Medicine Reports*, 18(1), pp. 223–229. doi:10.3892/mmr.2018.8956.

Zhang, H.J. *et al.* (2020) 'Knockdown of miR-660 protects nucleus pulposus cells from TNF- α -induced apoptosis by targeting serum amyloid A1', *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 15(1), p. 7. doi:10.1186/s13018-019-1538-6.

Zhang, J. *et al.* (2020) 'Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration through inhibiting pyroptosis', *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [Preprint]. doi:10.1111/jcmm.15784.

Zhang, Q. *et al.* (2018) 'Overexpression of miR-140-5p inhibits lipopolysaccharide-induced human intervertebral disc inflammation and degeneration by downregulating toll-like receptor 4', *Oncology Reports*, 40(2), pp. 793–802. doi:10.3892/or.2018.6488.

Zhang, W.L. *et al.* (2017a) 'Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration', *Journal of Orthopaedic Research*, 35(6), pp. 1323–1334. doi:10.1002/jor.23313.

Zhang, W.L. *et al.* (2017b) 'Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration', *Journal of Orthopaedic Research* [Preprint]. doi:10.1002/jor.23313.

Zhang, W.-L.L. *et al.* (2017) 'Role of miR-155 in the regulation of MMP-16 expression in intervertebral disc degeneration', *Journal of Orthopaedic Research*, 35(6), pp. 1323–1334. doi:10.1002/jor.23313.

Zhang, Y. *et al.* (2011) 'Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid ({LNA})-based antisense oligonucleotides without transfection', *Gene Therapy*, 18(4), pp. 326–333. doi:10.1038/gt.2010.133.

Zhang, Y. and Bergelson, J.M. (2005) 'Adenovirus Receptors', *Journal of Virology*, 79(19), pp. 12125–12131. doi:10.1128/jvi.79.19.12125-12131.2005.

- Zhang, Z. *et al.* (2014) 'Differentiation of adipose-derived stem cells toward nucleus pulposus-like cells induced by hypoxia and a three-dimensional chitosan-alginate gel scaffold in vitro', *Chinese Medical Journal*, 127(2), pp. 314–321.
- Zhao, K. *et al.* (2017) 'Methylation of microRNA-129-5P modulates nucleus pulposus cell autophagy by targeting Beclin-1 in intervertebral disc degeneration', *Oncotarget*, 8(49), pp. 86264–86276. doi:10.18632/oncotarget.21137.
- Zhao, Z. *et al.* (2020) 'MicroRNA-25-3p regulates human nucleus pulposus cell proliferation and apoptosis in intervertebral disc degeneration by targeting Bim', *Molecular Medicine Reports* [Preprint]. doi:10.3892/mmr.2020.11483.
- Zheng, H. *et al.* (2020) '{LncRNA} {MALAT1} exhibits positive effects on nucleus pulposus cell biology in vivo and in vitro by sponging {miR}-503', *BMC Molecular and Cell Biology*, 21(1), p. 23. doi:10.1186/s12860-020-00265-2.
- Zheng, Q. *et al.* (2019) 'MicroRNA-365 functions as a mechanosensitive microRNA to inhibit end plate chondrocyte degeneration by targeting histone deacetylase 4.', *Bone*, p. 115052. doi:10.1016/j.bone.2019.115052.
- Zhou, J., Sun, J., *et al.* (2019) 'MicroRNA-145 overexpression attenuates apoptosis and increases matrix synthesis in nucleus pulposus cells', *Life Sciences*, 221, pp. 274–283. doi:10.1016/j.lfs.2019.02.041.
- Zhou, J., Liang, A., *et al.* (2019a) 'MicroRNA-155 suppresses the catabolic effect induced by TNF- α and IL-1 β by targeting C/EBP β in rat nucleus pulposus cells.', *Connective tissue research*, 60(2), pp. 165–177. doi:10.1080/03008207.2018.1483356.
- Zhou, J., Liang, A., *et al.* (2019b) 'MicroRNA-155 suppresses the catabolic effect induced by TNF- α and IL-1 β by targeting C/EBP β in rat nucleus pulposus cells', *Connective Tissue Research*, 60(2), pp. 165–177. doi:10.1080/03008207.2018.1483356.
- Zhou, S. *et al.* (2018) 'miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges', *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), pp. 1073–1084. doi:10.1038/aps.2018.30.
- Zhou, S.S. *et al.* (2018) 'MiRNAs in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges re', *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), pp. 1073–1084. doi:10.1038/aps.2018.30.
- Zhou, X. *et al.* (2017) 'The roles and perspectives of microRNAs as biomarkers for intervertebral disc degeneration', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(12), pp. 3481–3487. doi:10.1002/term.2261.
- Zhu, H. *et al.* (2021) 'N6-Methyladenosine Induced miR-34a-5p Promotes TNF- α -Induced Nucleus Pulposus Cell Senescence by Targeting SIRT1', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, p. 642437. doi:10.3389/fcell.2021.642437.
- Zhu, Jinwen *et al.* (2019) 'lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in lumbar intervertebral disc degeneration.', *Molecular medicine reports* [Preprint]. doi:10.3892/mmr.2019.10569.
- Zhu, Jian *et al.* (2019) 'Sustained release of GDF5 from a designed coacervate attenuates disc degeneration in a rat model', *Acta Biomaterialia*, 86, pp. 300–311. doi:10.1016/j.actbio.2019.01.028.

Zhu, M. *et al.* (2021) 'Construction of biomimetic artificial intervertebral disc scaffold via 3D printing and electrospinning', *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 128, p. 112310. doi:10.1016/j.msec.2021.112310.

Zhuang, X. *et al.* (2020) 'mRNA Vaccines Encoding the HA Protein of Influenza A H1N1 Virus Delivered by Cationic Lipid Nanoparticles Induce Protective Immune Responses in Mice', *Vaccines*, 8(1), p. E123. doi:10.3390/vaccines8010123.

ZX, G. *et al.* (2020) 'LncRNA SNHG6 can regulate the proliferation and apoptosis of rat degenerate nucleus pulposus cells via regulating the expression of miR-101-3p', *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(16). doi:10.26355/EURREV_202008_22621.

Titre : Développement de nanoparticules lipidiques pour la délivrance d'acides nucléiques thérapeutiques : une nouvelle perspective dans la médecine régénératrice du disque intervertébral**Mots clés :** miARN, nanoparticules lipidiques, disque intervertébral, noyau pulpeux, douleurs lombaires

Résumé : Un dysfonctionnement de la régulation des miARN, en particulier le miARN-155, a été associé à de nombreuses maladies dont la lombalgie discogénique. L'administration d'un miARN « libre » souffre cependant d'un problème majeur avec sa dégradation enzymatique rapide *in vivo*, nécessitant des injections itératives. Ainsi, la protection vis à vis des nucléases des miARN est considérée comme une condition préalable à l'utilisation de ces nouveaux agents thérapeutiques. Parmi les approches proposées, les systèmes nanoparticulaires de vectorisation, telles que les nanocapsules lipidiques (LNC), constituent une option particulièrement intéressante au regard de leurs propriétés intrinsèques. L'objectif de cette thèse a été de formuler et de caractériser les LNC chargées en miARN-155 afin d'établir leur potentiel thérapeutique *in vitro* et *in vivo* pour la régénérescence du Disque Intervertébral (DIV). Pour y parvenir, des LNC chargées en miARN-155 ont été formulées par un procédé d'inversion de phase. Après purification, les LNC miARN-155 ont été caractérisées

(diamètre de 75 nm, indice de polydispersité $< 0,1$, potentiel zêta neutre). La protection vis à vis des nucléases par les LNC du miARN-155 a ensuite été démontrée par électrophorèse sur gel d'agarose. L'internalisation cellulaire des LNC miARN-155 sur des cellules primaires humaines et de noyau pulpeux (NP) de brebis a été évaluée par cytométrie en flux et par microscopie confocale à fluorescence. A 24 h, 100 % des LNC miRNA155 ont été internalisées au sein des cellules. L'activité biologique du miARN-155 post-internalisation a été confirmée par Western blot et RT-qPCR. Enfin, la faisabilité et la sécurité de l'injection *in situ* des LNC miARN-155 ont été démontrées chez un modèle gros animal. Un suivi IRM et une analyse histologique confirment la sécurité et la faisabilité d'injection du miR155 vectorisée par des LNC au sein des DIV. En parallèle, la décoration des LNC en surface par un peptide d'intérêt sLink-N a été investiguée afin d'envisager un ciblage spécifique des cellules du NP.

Title: Lipid nanocapsules for the delivery of therapeutic nucleic acids: a new perspective in intervertebral disc regenerative medicine?**Keywords:** miRNA, Lipid nanocapsules, intervertebral disc, *nucleus pulposus*, low back pain

Abstract: Misregulation of miRNA, notably the miRNA-155, have been associated with several diseases including intervertebral disc degeneration (IDD) inducing discogenic low back pain. However, "free" miRNA administration suffers from a major problem with the quick *in vivo* nuclease degradation, requiring iterative injections. Therefore, miRNA protection from nucleases is considered as a prior condition for the development of sustainable systems. Among the approaches proposed, nanoparticulate systems, such as lipid nanocapsules (LNC), represent a suitable strategy thanks to their ability to encapsulate DNA. The objective of this thesis was to formulate and characterize miRNA-155 loaded LNC to establish their *in vitro* and *in vivo* potential as therapeutics for IVD regeneration. To achieve it, miRNA-155 loaded LNC were formulated by the phase inversion process. After purification,

miRNA-155 LNC were fully characterized (diameter of 75 nm, a polydispersity index < 0.1 and a neutral zeta potential). the miRNA protection by LNC was then confirmed using gel electrophoresis. The miRNA-155 LNC cell internalization on human adipose stromal cells and on sheep *nucleus pulposus* (NP) cells was assessed by flow cytometry and fluorescence confocal microscopy: at 24 h, 100% of cells were internalized. The intact biological activity of the miRNA-155 after formulation was then confirmed by a western blot and RT-qPCR. Finally, the feasibility and safety of miRNA-155 LNC injection was demonstrated in big animal model. The Follow-up by MRI and by histology analysis confirmed the injection feasibility of miR-155 embedded in LNC inside IVD. In parallel, surface functionalized LNC by a peptide of interest sLink-N was investigated for specific targeting of NP cells.