



HAL
open science

Utilisation de peptides dérivés des filaments intermédiaires pour leurs propriétés antitumorales et de ciblage des cellules de gliome

Julien Balzeau

► **To cite this version:**

Julien Balzeau. Utilisation de peptides dérivés des filaments intermédiaires pour leurs propriétés antitumorales et de ciblage des cellules de gliome. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2013. Français. NNT: . tel-00836657

HAL Id: tel-00836657

<https://theses.hal.science/tel-00836657>

Submitted on 21 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Julien Balzeau

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

*Discipline : Biologie
Spécialité : Biologie Cellulaire
Laboratoire : Laboratoire de Neurobiologie et Transgénèse, UPRES EA3143*

Soutenue le 9 Janvier 2013

École doctorale : Biologie Santé
Thèse N° 1251

Utilisation de peptides dérivés des filaments intermédiaires pour leurs propriétés antitumorales et de ciblage des cellules de gliome

JURY

Rapporteurs : **Mme Diane BRAGUER**, Professeur d'Université, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II
Mme Véronique PREAT, Professeur d'Université, Université Catholique de Louvain, Belgique

Examineurs : **M. Jean-Pierre BENOIT**, Professeur d'Université, Université d'Angers
M. Joël EYER, Directeur de Recherche, Université d'Angers

Directeur de Thèse : **M. Joël EYER**, Directeur de Recherche, Université d'Angers



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e),
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Docteur Joël Eyer, directeur de l'UPRES EA3143, pour m'avoir accueilli au cours de mes différents stages de Master, puis pour cette thèse. J'ai beaucoup appris sur le plan scientifique et relationnel, sur le travail en laboratoire et l'organisation dans les manips. Je suis vraiment reconnaissant pour l'investissement et la disponibilité au cours de toutes ces années, et pour les nombreuses relectures de ce manuscrit. Encore merci !

Je remercie profondément Madame le Professeur Diane Braguer d'avoir accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur. Encore merci pour votre disponibilité.

J'adresse également tous mes remerciements à Madame le Professeur Véronique Prétat pour avoir consacré une partie de son temps à examiner ce travail. Merci à vous.

Je tiens à remercier également Monsieur le Professeur Jean-Pierre Benoit pour sa participation à ce jury de thèse en tant qu'examineur. Merci pour votre disponibilité.

Je remercie Messieurs les Professeurs Jean-Phillipe Bouchara et Franck Boury d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse. Merci pour les précieux conseils au cours de ces différentes années.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Alan Peterson de l'Université McGill, Montréal, pour ses relectures des articles et pour ses discussions. Je remercie le Docteur Chantal Prévost pour son travail de modélisation et le Docteur Masayuki Takahashi pour les expériences de dichroïsme circulaire.

Je suis sincèrement reconnaissant à Monsieur le Professeur Patrick Saulnier pour sa collaboration et ses conseils sur les techniques de formulation. Je remercie également le Docteur Emmanuel Garcion pour les techniques de cultures de neurones et les autres conseils.

Enfin, je remercie les différentes personnes du laboratoire, Madame le Professeur Annick Barthelaix et le Docteur Catherine Fressinaud pour leur gentillesse et leurs conseils techniques au cours de ces différentes années passées au laboratoire.

A titre personnel, je tiens à remercier le Double Docteur Franck Letournel. Merci à toi pour toute l'aide technique et scientifique apportée, mais aussi pour les nombreuses discussions (hum hum !!), les paris perdus et les photos de toi à table... Encore merci et j'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble.

Je remercie Pascale Champagne, la plus belle, la jeune fille de 16 ans, toujours souriante et disponible. Un grand merci pour tous les petits « abus » et fous-rires au cours de ces années.

Evidemment, un grand merci au Docteur Raphaël Bergès, dit Raphy, dit « Abusator » dans son nouveau labo (allez savoir pourquoi...). Tu m'as accueilli au laboratoire et transmis toute ton expérience en science. Merci pour tes conseils, les délires, les textos pendant Confessions Intimes et le reste (il y en a tellement...). Mais je n'oublie pas que tu me revaudras ça (dixit ta propre thèse !).

Un grand merci et bon courage à Claire Lépinoux-Chambaud dit « la Miss » pour la fin de ta thèse. Les coups de pied sous la table et les fous-rires avec les stagiaires ne t'ont que rarement déconcentré, et je t'en félicite, petit Lapinoux !! Continue à transmettre les traditions du laboratoire (ainsi que mon fauteuil, comme relique), et encore toutes mes félicitations pour ton prochain mariage !!

Je souhaite remercier l'autre Double Docteur du laboratoire, Maud Pinier, avec qui j'ai pu travailler pendant plus d'un an. Merci pour cela, et pour les révisions des mails, CV, lettres en anglais... Et encore félicitations aux jeunes parents pour la petite Margot-Krystal (quel étrange mélange de prénoms...). Et prends bien soin de Tubuline surtout !!

Sans oublier le Docteur Ulrich Jarry, dit le Wicking, pour les voyages en drakkars, les repas, les soirées dans la petite boîte de la Meignanne, les discussions scientifiques ou non. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite de ta carrière. Une grosse bise également à ta petite famille qui, j'espère, accueillera bientôt un petit Thorgal ou Lars-Olaf... Au choix.

Un remerciement à tous les stagiaires-esclaves passés dans le laboratoire, avec lesquels j'ai pu travailler et avancer (Anaïs, Cha-Cha, Jérémy, Laura Ingalls, Arnaud, Fleur et les autres). Un remerciement tout spécial à Sidow, le rayon de soleil orange, sainte patronne des cryo-découpeurs, pour tout (PBS et autres...). C'était « carrément cool » de bosser avec toi. Je te

souhaite toute la réussite que tu mérites. Un autre merci aux anciens stagiaires qui deviennent grands, Amélie « Goi-Goi » Goislard et Pierre « Maître » Hibert, pour votre bonne humeur au labo et en dehors.

Je remercie également tous les collègues doctorants, ingénieurs et techniciens des différents laboratoires chez qui j'ai pu manipuler. Merci à l'équipe de parasitologie pour l'aide technique, et particulièrement à Amandine Rougeron et au Docteur Sandrine Giraud, pour les discussions autour d'un café... Merci aux gens de l'UMR INSERM 892 (Erwan, Simon, Isa et tous les autres) pour leur disponibilité, notamment le vendredi soir quand le FACS tombait en panne (Merci Catherine !). Merci à toutes les personnes du laboratoire MINT/ INSERM 1066 pour toute l'aide apportée au cours de mes nombreux passages chez eux pour les différentes formulations et petits abus (Kaies, Audrey, Anne-Claire, Anne-Laure, J-P, Khaled et tous les autres évidemment !).

Un grand merci à tous mes amis qui ont toujours été présents pour moi. Adrien, mon premier coloc' et amis de longue date, je te souhaite toute la réussite que tu mérites. Une grosse bise à Alix qui t'accompagne pour cela. Un autre grand merci à mes deux autres coloc', Goran (pour les dernières relectures) et Benjamin, pour l'ambiance et pour toutes les soirées mémorables. Et à tous les amis et coloc's « de passage », dans le désordre, Camille et Yann, Oriane, Mathieu et Stéph' et leur petit Paul, Emilie, Djoh et Pripri à Dubaï, Virginie et Yves pour le tennis, Marie, Yanis et leur petite Sophie, à tous les anciens Stosiens (Hélène, Anne-So, Mick, Simon...). Merci à tous.

Je remercie ma famille, avec ma sœur, Emmanuelle, et Sylvain son compagnon, ainsi que mes deux neveux, Alexandre et Maxime. Je vous embrasse de tout cœur.

Enfin, un grand merci à mes parents, Maryse et Jean, qui m'ont toujours soutenu dans ce que je faisais, durant toutes ces années. Cette fois c'est promis, c'est la fin de la vie étudiante !

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	12
Chapitre 1 : Système nerveux et cancer	13
1. Généralités	13
1.1. Le système nerveux central	14
1.2. Le système nerveux périphérique.....	15
2. Les différentes cellules du système nerveux.	15
2.1. Dans le SNC	15
2.1.1. Les neurones	15
2.1.2. Les astrocytes.....	18
2.1.3. Les oligodendrocytes	20
2.1.4. La microglie	21
2.2. Dans le SNP : les cellules de Schwann.....	22
3. Les tumeurs du système nerveux	23
3.1. Epidémiologie	23
3.1.1. Classification des tumeurs du système nerveux central	23
3.1.2. Incidence et pronostic des tumeurs cérébrales	24
3.1.3. Symptômes et diagnostic	26
3.2. Evènements moléculaires conduisant aux gliomes	27
3.2.1. La perte d'hétérozygotie	28
3.2.2. Mutation de TP53	28
3.2.3. Surexpression du récepteur à l'EGF	28
3.2.4. Surexpression du récepteur au PDGF	29
3.2.5. Autres altérations.....	30
3.3. Traitements actuels	31
3.3.1. Chirurgie.....	31
3.3.2. Radiothérapie.....	32
3.3.3. Chimiothérapie	32
Chapitre 2 : Le cytosquelette	34
1. Généralités	34
2. Les microfilaments	35
2.1. Structure et polymérisation des microfilaments	35
2.2. Fonctions des microfilaments	36
3. Filaments intermédiaires.....	37
3.1. Généralités et classification	37
3.2. Structure et assemblage des filaments intermédiaires	39
3.3. Fonctions des filaments intermédiaires.....	41
3.4. Protéines associées aux filaments intermédiaires ou IFAP.....	41

3.5.	Les neurofilaments	43
3.5.1.	Structure et assemblage des neurofilaments	43
3.5.2.	Fonctions des neurofilaments.....	44
3.5.3.	Pathologies associées aux neurofilaments	45
3.6.	La vimentine	46
3.6.1.	Structure de la vimentine.....	47
3.6.2.	Fonctions de la vimentine	48
3.6.2.1.	Intégrité structurale des cellules	48
3.6.2.2.	Adhésion et migration cellulaires	48
3.6.2.3.	Transduction de signaux	49
3.6.2.4.	Apoptose et défense immunitaire	49
3.6.2.5.	Régulation de l'ADN génomique.....	50
4.	Microtubules	51
4.1.	Unité constituante : la tubuline	51
4.2.	Les microtubules.....	53
4.2.1.	Structure	53
4.2.2.	Nucléation.....	54
4.2.3.	Cycle de polymérisation/dépolymérisation	54
4.2.4.	Fonctions des microtubules	56
4.3.	Protéines associées aux microtubules ou MAPs.....	56
4.3.1.	Les MAPs structurales	57
4.3.2.	Les MAPs motrices	58
4.4.	Les microtubules comme cible des agents anticancéreux : les TBAs	59
4.4.1.	Agents stabilisants	61
4.4.2.	Agents déstabilisants	62
4.4.3.	MAPs et résistance aux agents anticancéreux.....	64
4.5.	Interaction entre microtubules et filaments intermédiaires : les sites TBS.....	64
Chapitre 3 : Nouvelles voies de délivrance des médicaments contre les cancers		66
1.	Les nanovecteurs.....	66
1.1.	Définition	66
1.1.1.	Micelles	67
1.1.2.	Liposomes	68
1.1.3.	Les nanoparticules lipidiques solides	68
1.1.4.	Les nanoparticules inorganiques.....	69
1.1.5.	Les nanoparticules polymériques	69
1.1.6.	Les dendrimères.....	70
1.1.7.	Les nanocristaux et les nanotubes	70
1.2.	Les nanocapsules lipidiques.....	71
1.2.1.	Définition et composition	71
1.2.2.	Formulation.....	72
1.2.3.	Encapsulation d'agents anticancéreux en thérapie des gliomes	74
2.	Les peptides de pénétration cellulaire ou CPP	75
2.1.	Définition et découverte.....	75
2.2.	Les différentes catégories de Cell-Penetrating Peptide.....	78
2.2.1.	Par rapport à leur origine.....	78

2.2.2.	Par rapport à leurs propriétés physiques.....	79
2.3.	Applications liées aux Cell-Penetrating Peptide	80
2.3.1.	Agents pour l'imagerie cellulaire et médicale.....	80
2.3.2.	Délivrance d'oligonucléotides en thérapie génique	81
2.3.3.	Utilisation des Cell-Penetrating Peptide en oncologie.....	82
2.3.3.1.	Activation et extinction de gènes	82
2.3.3.2.	Couplage à des radioéléments.....	82
2.3.3.3.	Greffage à des vecteurs chargés.....	84
Chapitre 4 : But des travaux effectués		86
RESULTATS.....		88
1 ^{er}	article.....	89
	The vimentin-tubulin binding site peptide (Vim-TBS.58-81) crosses the plasma membrane and enters the nuclei of human glioma cells.	89
	Julien Balzeau, Alan C. Peterson and Joel Eyer. <i>Int J Pharm</i> (2012) 423(1):77-83.	89
2 ^{ème}	article.....	98
	A tubulin-binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis.	98
	Raphael Berges, Julien Balzeau, Alan C. Peterson and Joel Eyer. <i>Mol Ther</i> (2012) 20(7):1367-77.	98
3 ^{ème}	article.....	112
	Structure-function analysis of the glioma targeting NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site on the light neurofilament subunit.	112
	Raphael Berges, Julien Balzeau, Masayuki Takahashi, Chantal Prevost and Joel Eyer. <i>PLoS One</i> 7(11):e49436. doi: 10.1371/journal.pone.0049436.	112
4 ^{ème}	article.....	127
	Use of the NFL-TBS.40-63 peptide to improve lipid nanocapsules (LNC) uptake in GL261 mouse glioma cells.	127
	Julien Balzeau, Maud Pinier, Raphael Berges, Patrick Saulnier, Jean-Pierre Benoit and Joel Eyer. Soumis à <i>Biomaterials</i>	127
5 ^{ème}	article.....	160
	Brain tumor targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules.....	160
	Anne-Laure Laine, Ngoc Trinh Huynh, Anne Clavreul, Julien Balzeau, Jerome Bejaud, Anne Vessieres, Jean-Pierre Benoit, Joel Eyer and Catherine Passirani. <i>Eur J Pharm Biopharm</i> (2012) 81(3):690-3.....	160
DISCUSSION		165
ANNEXES.....		173
BIBLIOGRAPHIE.....		177

ABBREVIATIONS

Aa : Acides aminés

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine Di-Phosphate

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BPAG : Bullous Pemphigoid AntiGen

CED : Convection-Enhanced Delivery

Chr : Chromosome

CPP : Cell-Penetrating Peptide

DCC : Deleted in Colon Cancer

DiD : 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine

EGF(R) : Epidermal Growth Factor (Receptor)

EMP : Estramustine Phosphate

EMBP : Estramustin-Binding Protein

Fc-diOH : Ferrociphénol

FI : Filaments Intermédiaires

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

γ -TuRC : γ -Tubulin Ring Complex

GBM : Glioblastome Multiforme

GDP : Guanosine DiPhosphate

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GTP : Guanosine TriPhosphate

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor-2

IAP : Inhibitors of Apoptosis proteins

IGF : Insulin-like Growth Factor

INCa : Institut National du Cancer
Ink4 : Inhibitor of the cyclin-dependent kinase 4
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
KIFs : KInesin superFamily
LNC : Lipidic NanoCapsule
LOH : Loss Of Heterozygosity
MA : Microfilaments d'Actine
MAG : Myelin Associated Glycoprotein
MAP : Model Amphipathic Peptide
MAPs : Microtubule-Associated Proteins
MARK : Microtubule Affinity Regulating Kinase
MBP : Myelin Basic Protein
MDM2 : Murine Double Minute 2
MDR : Multi-Drug Resistance
MGMT : O⁶-methylguanine–DNA methyltransferase
MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MT : MicroTubules
MTOC : MicroTubule Organizing Center
NF : NeuroFilaments
NF1 : NeuroFibromatosis 1
NFH : NeuroFilament High molecular weight
NFL : NeuroFilament Low molecular weight
NFM : Neurofilament Medium molecular weight
NGF : Nerve Growth Factor
NLS : Nucleic Localization Sequence
NP : NanoParticule
ODD : Oxygen Dependant Degradation

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PA : Principe Actif

PDGF(R) : Platelet-Derived Growth Factor (Receptor)

PEG-HS : PolyEthylène Glycol HydroxyStéarate

P-gp : glycoprotéine P

PKA/PKC : Protéine Kinase A/Protéine Kinase C

PLA : PolyLactic Acid

PLC : PhosphoLipase C

PLGA : PolyLactic co-Glycolic Acid

PNA : Peptide Nucleic Acid

PNET : Primitive NeuroEctodermal Tumor

PTD : Protein Transduction Domain

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

Rb : Retinoblastoma protein

ROK : RhoA –binding Kinase

SEP : Sclérose En Plaques

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SPIO : SuperParamagnetic Iron Oxide

TBAs : Tubulin-Binding Agents

TBS : Tubulin-Binding Site

TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

VEC : Vascular Endothelial Cadherin

VEGF(R) : Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)

VHL : Von Hippel-Lindau

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Système nerveux et cancer

1. Généralités

Le système nerveux (**Figure 1**) se divise en système nerveux central (SNC) et système nerveux périphérique (SNP). Le SNC est composé du cerveau, du cervelet et du tronc cérébral dans la boîte crânienne et formant l'encéphale, et de la moelle épinière dans le canal rachidien. Le SNP se compose des différents nerfs, soit crâniens partant de l'encéphale et au nombre de douze paires, soit rachidiens partant de la moelle épinière.

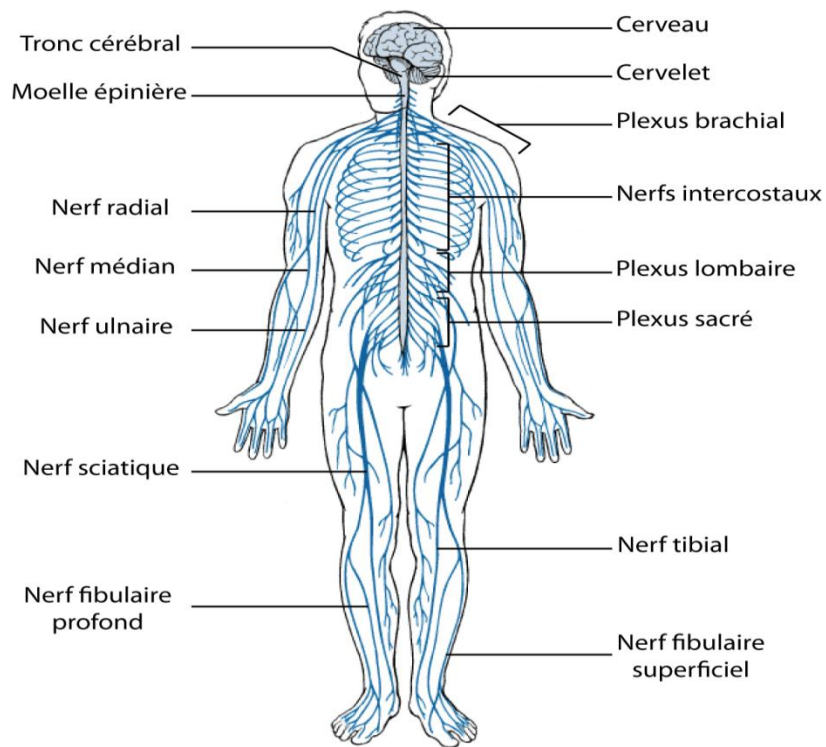


Figure 1 : Schéma du système nerveux chez l'homme

(source : www.ama-assn.org)

Le rôle du SNC est de recevoir et traiter les informations et signaux issus de la périphérie. Le SNP va conduire les informations issues des récepteurs périphériques jusque dans les centres nerveux, et transmettre les réactions motrices adaptées à ces signaux. A eux deux, ils vont pouvoir coordonner les mouvements musculaires en recevant et traitant les informations issues des différents récepteurs, assurer le fonctionnement des différents organes indépendamment de la conscience et réguler l'intellect de l'être humain.

1.1. Le système nerveux central

Le SNC se compose de l'encéphale dans la boîte crânienne (**Figure 2**) et de la moelle épinière protégée par les vertèbres.

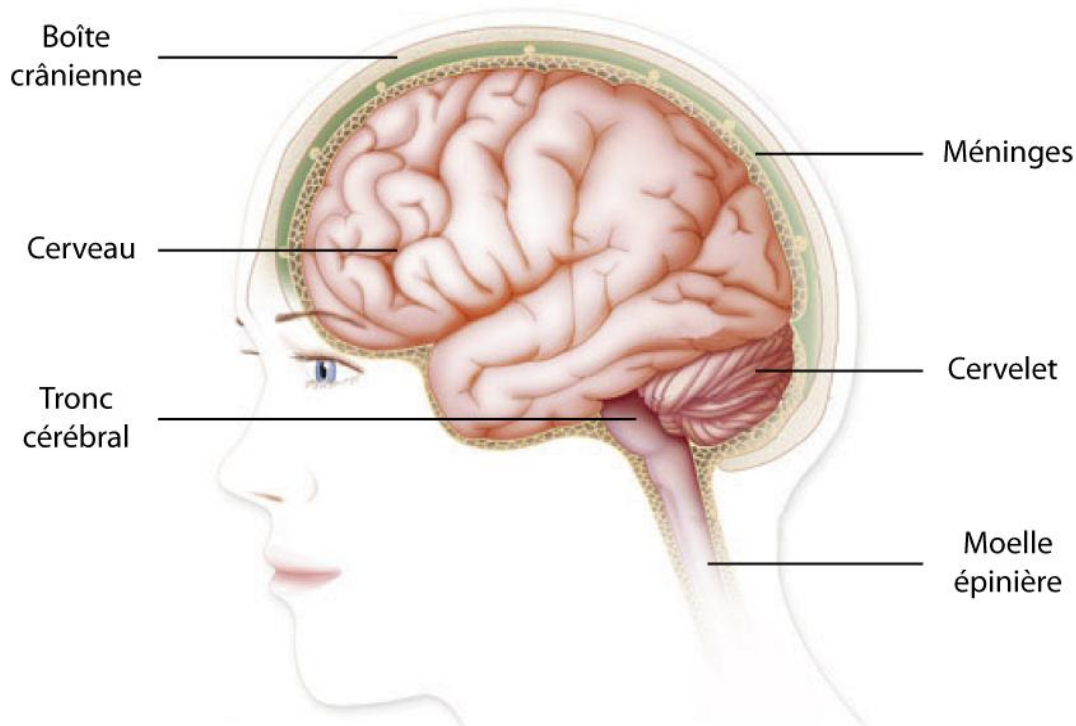


Figure 2 : Schéma de l'encéphale et de ses structures de protection

(source : www.arc-cancer.net)

Le cerveau se divise en deux hémisphères droit et gauche, chacun séparé en quatre lobes (frontal, pariétal, occipital et temporal). Le tronc cérébral fait la jonction entre le cerveau et la moelle épinière qui se situe dans le canal rachidien formé par les différentes vertèbres. Tout comme l'encéphale, la moelle épinière est entourée par les méninges baignées par le liquide cérébro-spinal pour amortir les chocs. Elle se termine au niveau de la première vertèbre lombaire, le reste du canal rachidien est occupé par les racines des nerfs spinaux formant la « queue-de-cheval ». De la moelle épinière sortent les nerfs spinaux qui composent le système nerveux périphérique (SNP).

1.2. Le système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique est composé de deux types de nerfs : les nerfs crâniens attachés à l'encéphale et les nerfs spinaux ou rachidiens attachés à la moelle épinière et sortant du canal rachidien. Les nerfs crâniens sont au nombre de douze paires et vont innerver les organes des sens (vue, ouïe, goût, odorat), la tête et une partie du cou. Les nerfs rachidiens innervent le reste du corps (muscles, peau, vaisseaux...).

2. Les différentes cellules du système nerveux.

2.1. Dans le SNC

Il existe quatre types principaux de cellules qui composent le SNC, chacun ayant son rôle propre (**Figure 3**). La distinction se fait entre les neurones qui vont intégrer les informations et les transmettre aux organes cibles, et les cellules gliales ou de soutien qui vont fournir les nutriments nécessaires aux neurones et évacuer leurs déchets, accélérer la transmission de l'information issue des neurones, ou encore servir de système immunitaire.

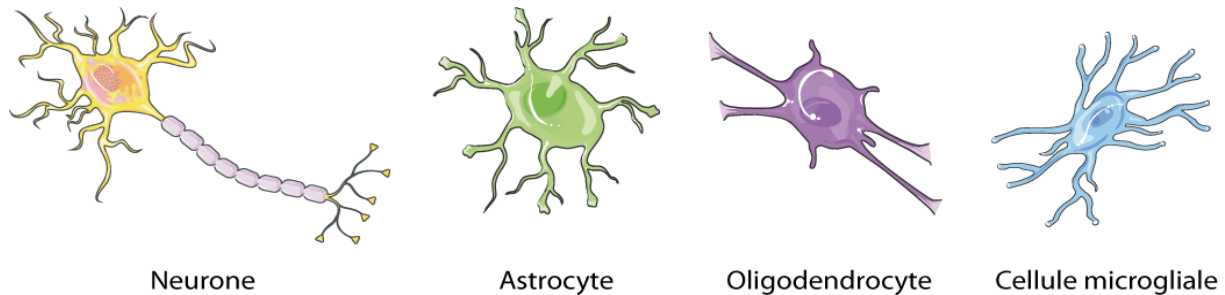


Figure 3 : Différentes cellules du système nerveux central

(source : www.servier.fr)

2.1.1. Les neurones

Jusque dans les années 1960, la plupart des neurobiologistes pensaient que l'homme naissait avec un nombre fini de neurones, et que ces cellules hautement spécialisées étaient incapables de se multiplier après le développement embryonnaire. Altman démontra en 1962 que

chez des rats jeunes adultes ayant subi des lésions cérébrales, de nouveaux neurones apparaissaient à partir de cellules indifférenciées (Altman, 1962). Il a ensuite été montré par une équipe suédoise (Johansson et al., 1999) qu'il existe également des progéniteurs communs aux différentes cellules du SNC dans le cerveau humain appelées cellules souches neurales, et que ces progéniteurs sont capables de donner des neurones ainsi que les autres types de cellules gliales (**Figure 4**).

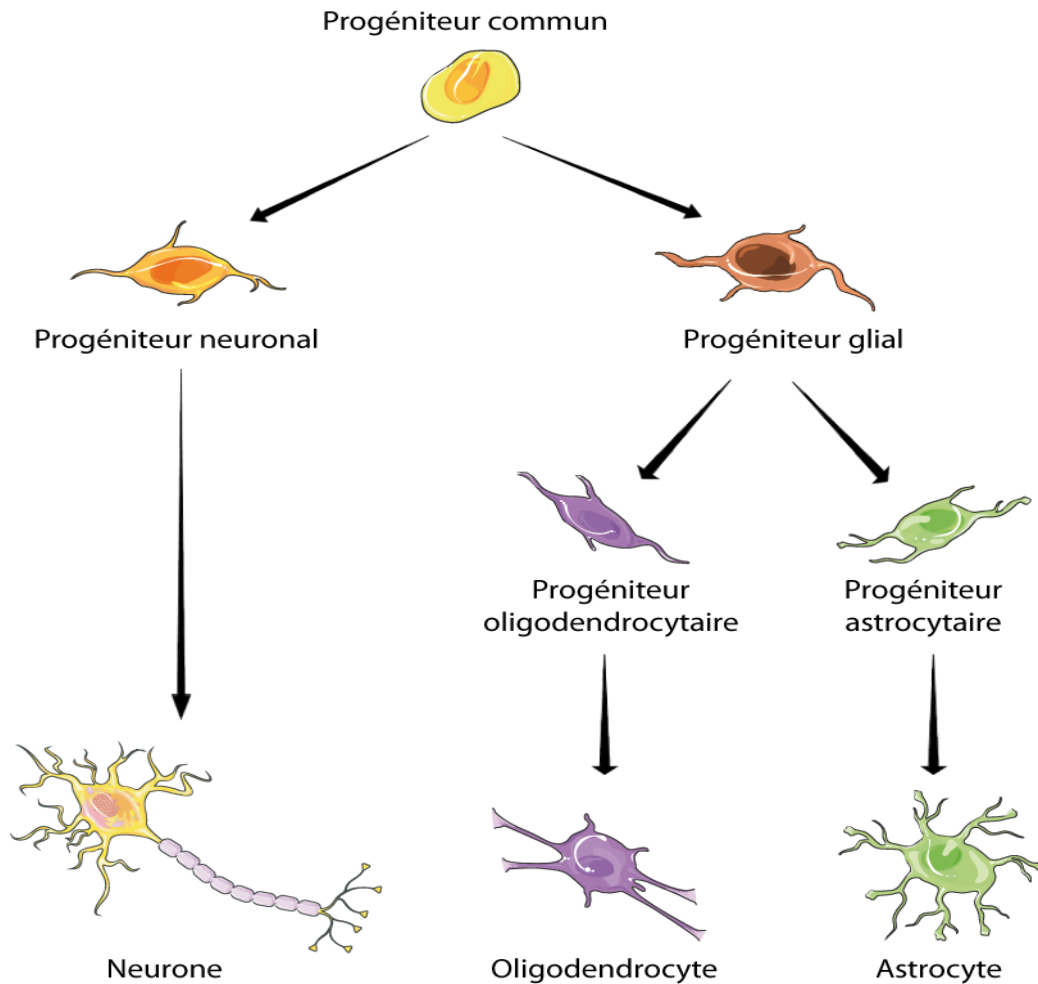


Figure 4 : Différenciation des cellules du système nerveux central

(source : www.servier.fr)

Au cours de l'embryogenèse, il y a prolifération et différenciation des cellules embryonnaires en neur ectoderme, qui va ensuite donner le tube neural ainsi que les crêtes neurales. De ces éléments vont se différencier les neurones et les cellules de la glie.

Il existe différents types de neurones en fonction de leur localisation et de leur fonction au sein du système nerveux (**Figure 5**). Les neurones bipolaires sont des neurones sensoriels associés au goût, à l'odorat, à la vue, à l'ouïe, ainsi qu'aux fonctions vestibulaires. Ils possèdent une dendrite et un axone, chacun de part et d'autre du corps cellulaire ou soma. Les neurones unipolaires sont également des neurones sensoriels. Dans le SNP, leur corps cellulaire se trouve dans les racines dorsales des ganglions. Les neurones multipolaires se retrouvent dans le SNC et dans les ganglions périphériques. Ils regroupent les neurones moteurs et les interneurones. Ces neurones possèdent un axone unique et de nombreuses dendrites qui servent à intégrer un grand nombre d'informations issues de plusieurs autres neurones. Enfin, les cellules pyramidales sont un type particulier de neurone, présentant des variations dans leur forme en fonction de leur localisation dans le tissu nerveux (hippocampe, cortex visuel...). Ce sont des neurones servant dans l'intégration de signaux convergents, avec un arbre dendritique très développé, et un axone pouvant projeter à très grande distance.

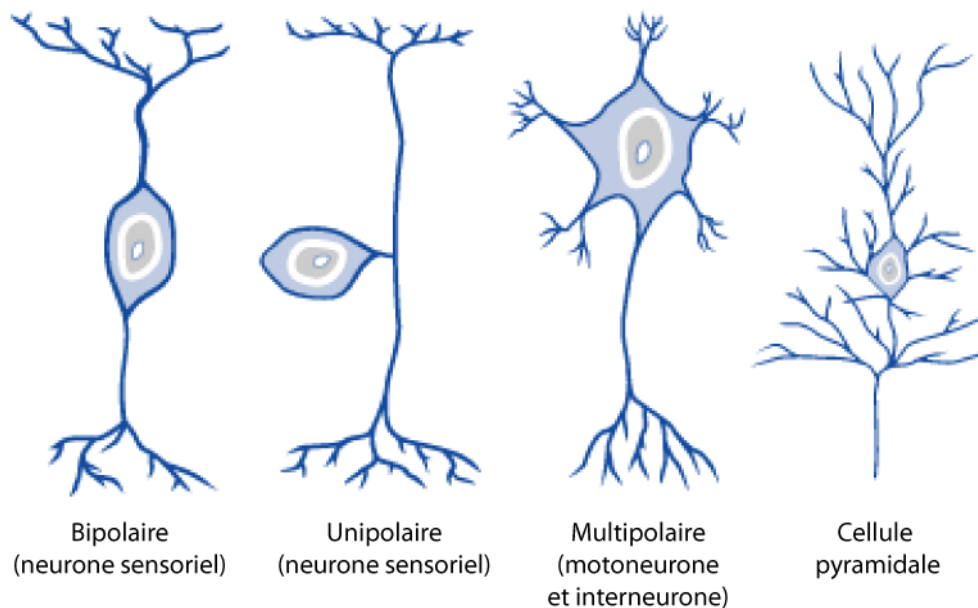


Figure 5 : Les différents types de neurones

(source : www.science.howstuffworks.com)

2.1.2. Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules appartenant à la macroglie, de la même origine neuroectodermique que les neurones et les oligodendrocytes (**Figure 4**). Les astrocytes sont de petites cellules, d'une dizaine de microns, de forme étoilée, avec de fins prolongements s'étendant de façon radiée et se terminant par les pieds astrocytaires. Ces cellules permettent les échanges de nutriments entre les neurones et les vaisseaux sanguins (**Figure 6**). Dans leur corps cellulaire et leurs prolongements se retrouvent les différents constituants de la machinerie cellulaire classique, ainsi que des grains de glycogène, absents des autres cellules nerveuses, et servant de réserve de glucose pour les neurones.

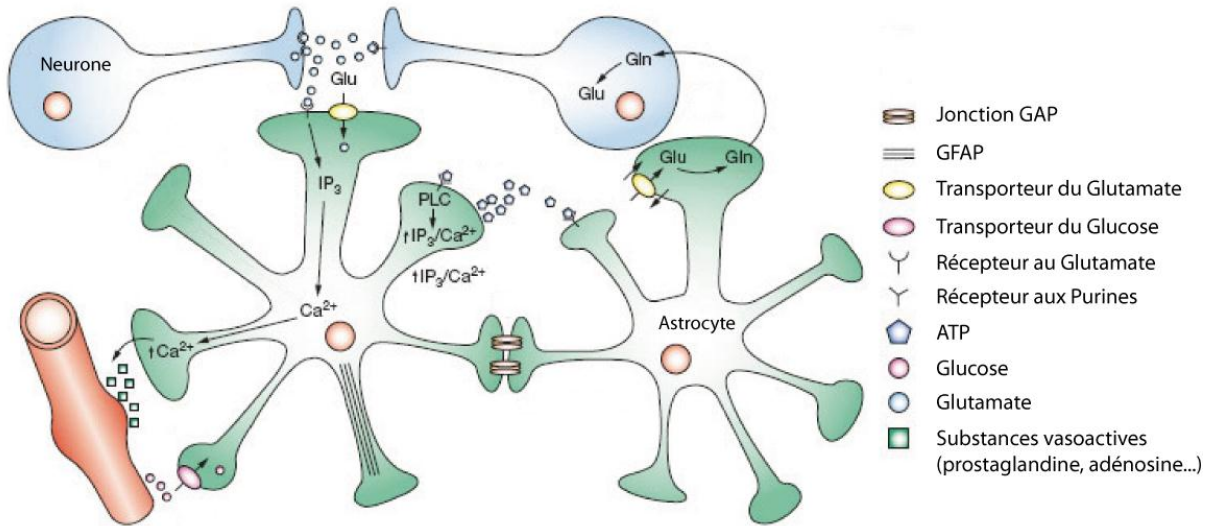
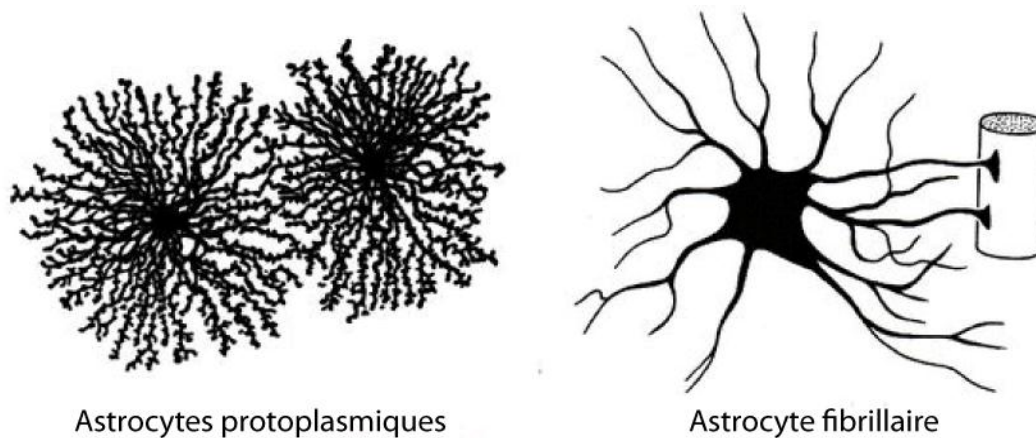


Figure 6 : Echanges normaux entre astrocytes et neurones

(source : Maragakis et Rothstein, 2006)

Les astrocytes échangent des nutriments entre eux à travers les jonctions communicantes ou jonctions GAP. C'est aussi à travers ces jonctions que des molécules telles que le glucose ou l'ATP vont passer d'un astrocyte à l'autre. La protéine des filaments intermédiaires (FI) spécifiquement exprimée dans les astrocytes est la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Cette protéine joue plusieurs rôles importants, notamment dans la communication avec les neurones, lors de la réparation cellulaire ou de la mitose.

Il existe deux types d'astrocytes, ayant chacun leur caractéristiques propres (**Figure 7**).



Astrocytes protoplasmiques

Astrocyte fibrillaire

Figure 7 : Schéma des deux types d'astrocytes

(source : cours d'histologie du Dr Nataf, Université de Lyon)

Les astrocytes protoplasmiques, également appelés de type I, sont localisés préférentiellement au niveau de la substance grise, à l'interface entre les parois des capillaires sanguins, les méninges et les neurones. Ils participent de ce fait à la barrière hémato-encéphalique, leurs pieds étant en contact avec la membrane basale des vaisseaux, et ainsi à la capture des nutriments nécessaires aux autres cellules du cerveau. Leurs prolongements sont courts, très nombreux et la GFAP y est peu présente.

Les astrocytes fibreux, fibrillaires ou de type II se retrouvent principalement au niveau de la substance blanche. Ils se caractérisent par de longs prolongements radiaux riches en GFAP, se terminant par des pieds au niveau des synapses, des axones ou sur les corps cellulaires des neurones. Ils jouent un rôle important dans la recapture des neurotransmetteurs notamment pour le glutamate, grâce à des transporteurs spécifiques.

Les astrocytes vont capter le glucose présent dans les vaisseaux, puis le distribuer aux neurones et aux oligodendrocytes ou le stocker sous forme de grains de glycogène. Ce glycogène pourra être converti en Glucose-6-Phosphate et rentrer dans le cycle de la glycolyse pour produire du pyruvate, puis donner du lactate, qui sera alors transporté vers les neurones et servir pour la production d'énergie. Les astrocytes jouent également des rôles de régulateurs des concentrations ioniques via des transporteurs et des pompes ioniques, de producteurs de facteurs de croissance tels que le NGF (Nerve Growth Factor) ou de cytokines telles que l'IL-1 et l'IL-6. Ils sont également capables de jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène pour la reconnaissance antigénique avec les lymphocytes T.

2.1.3. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont de petites cellules appartenant à la macroglie, et présentes dans le SNC. Leur cytoplasme est peu présent mais très dense, riche en MT mais dépourvu de FI (Kuhlmann-Krieg et al., 1988). Ils produisent de nombreux prolongements qui vont s'enrouler en feuillets autour des axones pour former la gaine de myéline (**Figure 8**). Un même oligodendrocyte peut myéliniser plusieurs dizaines de neurones.

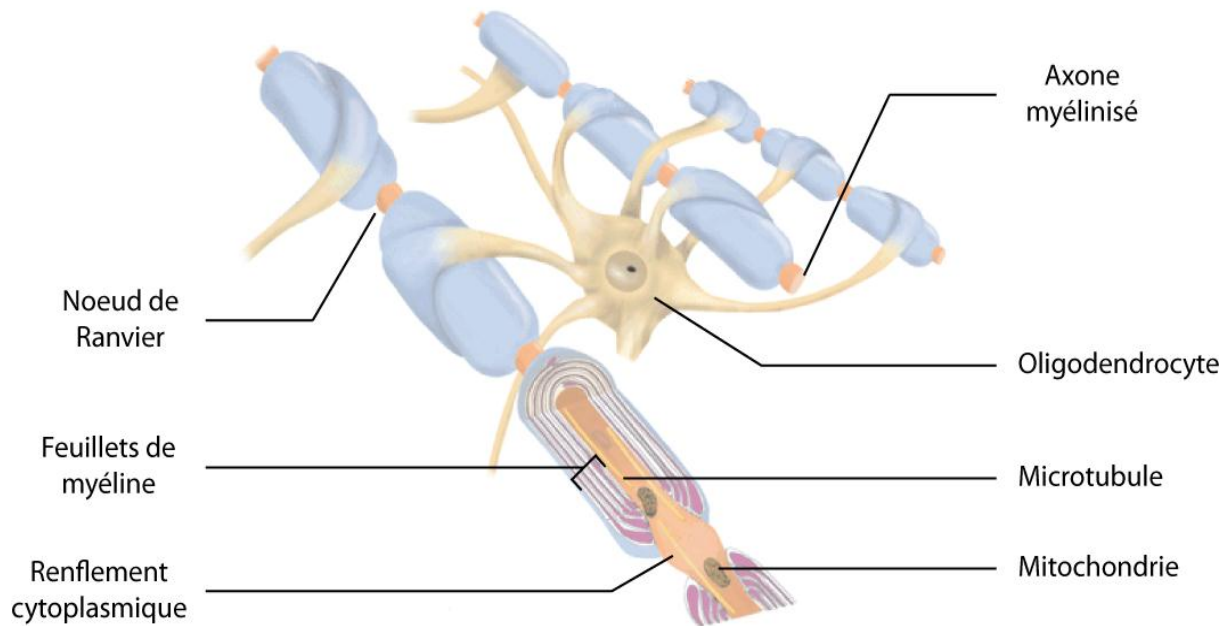


Figure 8 : Myélinisation d'un oligodendrocyte dans le cerveau

(adaptée de différentes sources)

La gaine de myéline s'enroule en spirale de manière compacte, sur des segments de l'ordre du millimètre, interrompus par des espaces sans myéline appelés nœuds de Ranvier. Ces nœuds de Ranvier présentent un renflement cytoplasmique de l'axone riche en canaux sodiques, et peuvent être masqués en partie par des pieds astrocytaires en contact direct avec la membrane plasmique de l'axone. Les fibres myélinisées dont les axones sont les plus larges ont des gaines de myéline plus épaisses et des distances internodales plus importantes, ce qui permet d'optimiser l'influx nerveux.

La gaine de myéline sert d'isolant électrique, et permet ainsi la conduction saltatoire de l'influx nerveux d'un nœud de Ranvier à un autre. Sa fraction protéique comprend plusieurs molécules spécifiques dont la Protéine Basique de la Myéline ou MBP (Myelin Basic Protein), la Glycoprotéine Associée à la Myéline ou MAG (Myelin Associated Protein), la Glycoprotéine de la Myéline des Oligodendrocytes ou MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein). Les protéines MBP et MOG sont d'ailleurs les antigènes cibles dans la Sclérose En Plaques ou SEP.

2.1.4. La microglie

Les cellules de la microglie, classées parmi les macrophages, représentent le système immunitaire dans le SNC. Ces cellules constituent environ 10% des cellules gliales totales, mais avec une répartition variable au sein du SNC. Elles ont pour origine la moelle osseuse (origine myéloïde), sous forme de précurseurs mésodermiques qui vont migrer dans le parenchyme nerveux avant la formation de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE).

Chez le fœtus et durant les premiers jours, les cellules de la microglie se présentent sous forme amiboïde et vont être actives lors de la mise en place du SNC. Ces cellules proliférantes ont plusieurs fonctions, notamment provoquer l'apoptose de certaines cellules pour permettre la mise en place du réseau neuronal, éliminer leurs débris et aider à la mise en place de la vascularisation.

Chez l'adulte dans un état non-pathologique, la microglie est sous forme quiescente, avec une structure très ramifiée. Ces cellules vont sonder leur environnement grâce à leurs prolongements, puis s'activeront lors de la détection d'une anomalie (infection, dommage neuronal, tumeur cérébrale...). Les cellules activées vont proliférer et migrer vers le site de lésion, leur corps cellulaire va s'hypertrophier, leurs prolongements vont s'épaissir, et elles vont sécréter différents facteurs comme des cytokines, des facteurs neurotrophiques et des radicaux libres. En cas de dégénérescence neuronale, les cellules vont s'hyperactiver et devenir amiboïdes avec une forte augmentation de leur pouvoir de phagocytose. Une fois l'état du SNC revenu à la normale, ces cellules hyperactivées vont entrer en apoptose (pour revue : Saijo et Glass, 2011).

2.2. Dans le SNP : les cellules de Schwann

Les cellules de Schwann sont les cellules gliales du SNP participant à l'entretien et à la survie des neurones. Leurs précurseurs sont issus de la crête neurale et vont maturer en cellules de Schwann myélinisantes ou non-myélinisantes (fibres de Remak), en fonction de la taille des axones avec lesquels elles sont en contact (**Figure 9**). Après leur différenciation, ces cellules arrêtent de proliférer, mais peuvent se dédifférencier et retourner à un stade de précurseur en cas de dommage touchant les nerfs et se remettre à proliférer afin de construire un environnement propice à la réparation des fibres nerveuses.

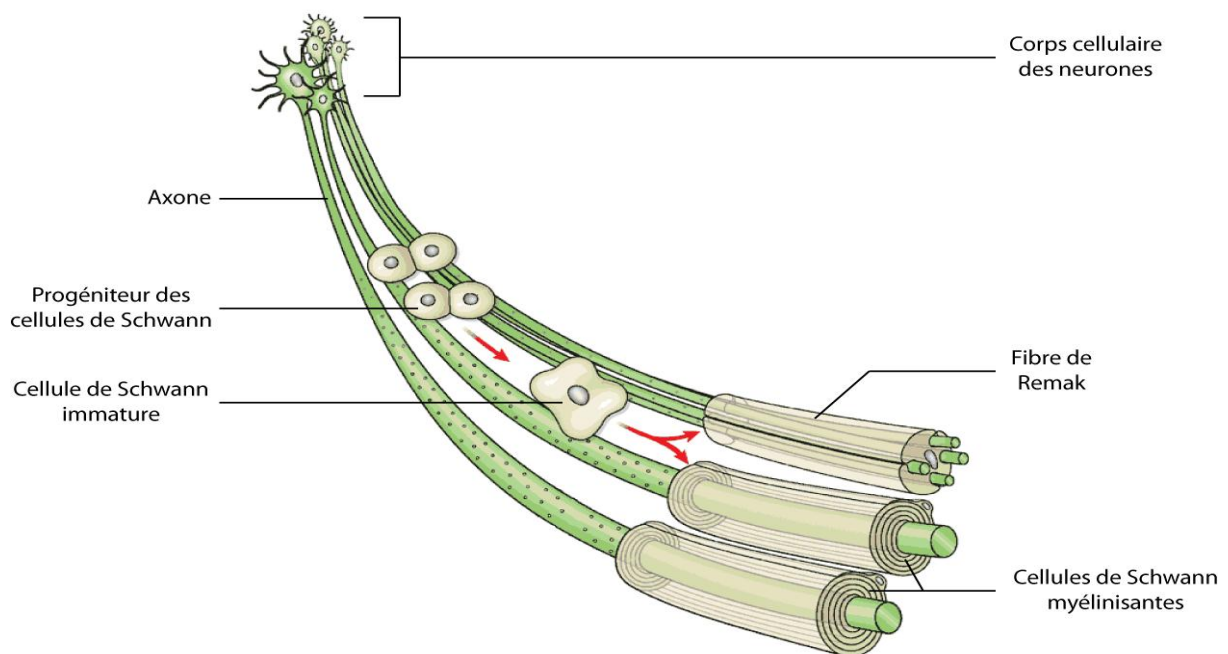


Figure 9 : Processus de maturation des cellules de Schwann

(source : Nave et Schwab, 2005)

La cellule de Schwann myélinisante, à la différence de l'oligodendrocyte, va enrouler un seul axone. Cette cellule est quiescente dans un état physiologique normal, et la myéline qui entoure l'axone sert d'isolant électrique, permettant la conduction saltatoire de l'influx nerveux d'un nœud de Ranvier à un autre. La myéline des cellules de Schwann diffère de celle des oligodendrocytes par sa composition en protéines et leurs proportions respectives. Ces cellules sont impliquées dans plusieurs pathologies comme la lèpre ou la maladie de Charcot-Marie-Tooth.

3. Les tumeurs du système nerveux

3.1. Epidémiologie

En France, les tumeurs du SNC représentent 1,3 % des nouveaux cas de cancer en 2011, soit 4770 patients. Ce type de cancer est le 2^{ème} plus fréquent chez l'enfant (0-14 ans) après la leucémie aiguë, et dont la mortalité est la plus élevée pour cette tranche d'âge (chiffres INCa 2011, www.e-cancer.fr). Les tumeurs cérébrales primaires malignes représentent la 3^{ème} cause de décès par cancer chez les jeunes adultes de 15 à 34 ans en Amérique du Nord (Buckner et al., 2007).

3.1.1. Classification des tumeurs du système nerveux central

Depuis 1993, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis au point une échelle de malignité des tumeurs du SNC, allant des tumeurs les moins agressives (grade I) aux plus agressives (grade IV). Cette échelle sert à évaluer le pronostic et le stade de la tumeur. Les grades I et II sont dits « de bas grade », avec un développement lent et une faible agressivité, le grade III possède un haut taux de prolifération, et le grade IV des tissus nécrotiques et/ou une activité angiogénique, tous deux étant « de haut grade » (**Tableau 1**).

Les tumeurs cérébrales primaires sont des tumeurs se développant à partir des cellules saines du SNC qui se multiplient de façon anarchique, à la différence des tumeurs secondaires issues de métastases provenant d'un autre organe atteint. Parmi ces tumeurs cérébrales primaires se trouvent les tumeurs gliales (issues des cellules de la glie) également appelées gliomes, les plus fréquemment représentées (environ 50 % de toutes les tumeurs intracrâniennes). 90 % de ces tumeurs gliales sont d'origine astrocytaire (astrocytomes), mais certaines tumeurs sont d'origine oligodendrocytaire (oligodendrogliomes), d'un mélange des deux types cellulaires (oligoastrocytomes), ou encore des cellules épendymaires (épendymomes). Les gliomes peuvent être « de bas grade », mais dans la majorité des cas (environ 80 %), ces tumeurs sont malignes. Les Glioblastomes Multiformes (GBM) représentent à eux seuls 60 à 70 % des tumeurs

malignes primitives du cerveau, avec une médiane de survie de 12 à 14 mois (Wen et Kesari, 2008).

Les GBM sont classés en deux catégories suivant leur origine. Les GBM primaires ou *de novo* ne présentent pas de précurseurs d'un grade inférieur, se développent spontanément et communément chez le patient âgé. Ils représentent 95 % des GBM. Les GBM secondaires ou progressifs se développent plus lentement, à partir d'une tumeur de bas grade évoluant vers un stade malin. Ces GBM sont typiques chez les jeunes patients.

3.1.2. Incidence et pronostic des tumeurs cérébrales

L'incidence des tumeurs cérébrales en général a augmenté au cours de ces 30 dernières années, avec le développement des outils diagnostics tels que les scanners et les IRM, l'analyse et la classification histopathologiques, l'évolution de la chirurgie et le vieillissement de la population.

Les chiffres d'incidence varient suivant le sexe, l'âge, l'origine ethnique et le degré de développement du pays. L'incidence des tumeurs cérébrales primaires malignes au niveau mondial est de 3,7 et 2,6 pour 100000 habitants par an, pour l'homme et la femme respectivement. En France, cette incidence est plus élevée (5,7 chez l'homme et 4,2 chez la femme) du fait de meilleurs outils diagnostics et du vieillissement de la population principalement (Bondy et al., 2008 ; Belot et al., 2008).

Le taux de survie des tumeurs cérébrales malignes va également varier suivant le type de tumeur diagnostiquée et l'âge du patient. Par exemple, le taux de survie à 5 ans pour les astrocytomes pilocytiques, oligodendrogliomes et épendymomes de bas grade est de plus de 70 %, alors que pour les astrocytomes de haut grade et les gliomes malins, ce taux est de moins de 40 %, et même de 3,3 % seulement pour les GBM.

En France en 2011, 4770 cas de cancers du SNC ont été détectés (2680 chez l'homme et 2090 chez la femme), avec environ 3000 décès enregistrés (1700 chez l'homme et 1300 chez la femme) (chiffres INCa 2011, www.e-cancer.fr).

Tableau 1 : Les différents types de tumeur touchant le système nerveux selon l'OMS.

	Grade OMS
Tumeurs astrocytaires (Astrocytomes)	
Sous-épendymaires à cellules géantes	I
Pilocytiques	I
De bas grade	II
Xanthoastrocytomes pléomorphes	II-III
Anaplasiques	III
Glioblastomes	IV
Oligodendrogliomes	
De bas grade	II
Anaplasiques	III
Oligoastrocytomes	
De bas grade	II
Anaplasiques	III
Tumeurs épendymaires (épendymomes)	
Astrocytome sous-épendymaires	I
Myxopapillaires	I
De bas grade	II
Anaplasiques	III
Papillomes des plexus choroïdes	
Papillomes	I
Carcinomes	III-IV
Tumeurs neuronales/gliales	
Gangliocytomes	I
Gangliomes	I-II
Ganglioneuromes anaplasiques	III
Ganglioneuromes desmoplastiques infantiles	I
Tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques	I
Neurocytomes centraux	I
Tumeurs pinéales	
Pinéalocytomes	II
Pinéalomes parenchymateux de différenciation intermédiaire	III-IV
Pinéaloblastomes	IV
Tumeurs embryonnaires	
Médulloblastomes	III
Autres PNET	III
Médulloépithéliomes	III
Neuroblastomes	III
Ependymoblastomes	III
Tumeurs des nerfs crâniens et de la moelle épinière	
Schwannomes bénins	I
Tumeurs malignes de la gaine nerveuse périphérique	III-IV
Tumeurs méningées	
Méningiomes	I
Méningiomes atypiques	II
Méningiomes papillaires	II-III
Hémangiopéricytomes	II-III
Méningiomes anaplasiques	III

3.1.3. Symptômes et diagnostic

Les symptômes des tumeurs cérébrales dépendent avant tout de la localisation de la tumeur et de sa taille. L'augmentation de la pression intracrânienne due au développement de la tumeur va provoquer le plus souvent des maux de tête ainsi que des convulsions et des nausées et des crises d'épilepsie dans certains cas. Suivant la localisation de la tumeur, les aires sensorielles vont pouvoir être touchées, provoquant des troubles de la vision, de l'audition, de la parole, ainsi que des troubles de l'équilibre, de la mémoire, voire une paralysie partielle.

Le diagnostic se fait dans un premier temps par imagerie médicale. Le scanner est l'outil utilisé en première intention, pouvant être complété par de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (**Figure 10**). Dans un second temps, un prélèvement de la tumeur est effectué par chirurgie. La biopsie stéréotaxique consiste à prélever un petit échantillon de la tumeur après trépanation. Après IRM et localisation précise de la tumeur, le cadre de stéréotaxie permet d'aller très précisément au niveau de la tumeur et d'en prélever un fragment. Dans certains cas urgents, le prélèvement se fait directement après craniotomie et exérèse de la tumeur dans son ensemble. Le diagnostic final se pose après analyse histopathologique.

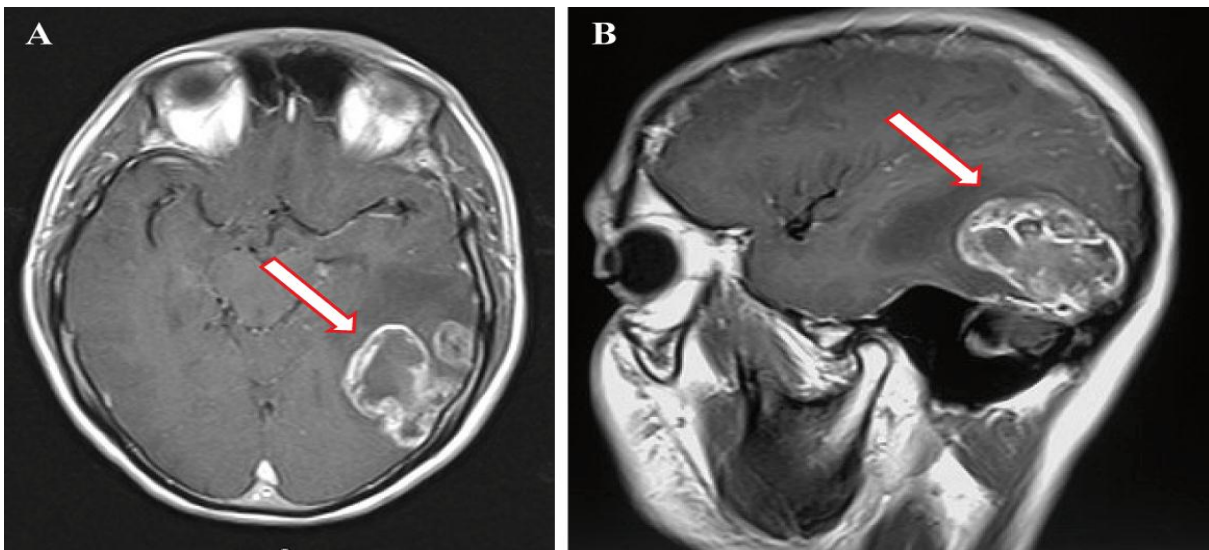


Figure 10 : Coupe axiale (A) et parasagittale (B) d'un patient atteint d'un GBM, mis en évidence par IRM avec injection de gadolinium.

(source : www.neurochirurgia2000.com)

3.2. Evènements moléculaires conduisant aux gliomes

Depuis une dizaine d'années, différentes voies génétiques qui conduisent au GBM ont été mises en évidence par les chercheurs. Les glioblastomes primaires et secondaires présentent des voies différentes pour des aboutissants similaires, avec néanmoins une récurrence pour certaines modifications génétiques. En fonction de l'analyse histopathologique et des résultats cytogénétiques, les diagnostics vont être établis de façon précise, et les traitements vont être mieux adaptés (Loktionov, 2004 ; Yong et al., 2006 ; Verhaak et al., 2010).

La **Figure 11** présente les principales modifications génétiques responsables de la transformation d'une cellule saine en une cellule tumorale, avec le cas d'un astrocyte ou d'un progéniteur glial évoluant vers une cellule de glioblastome.

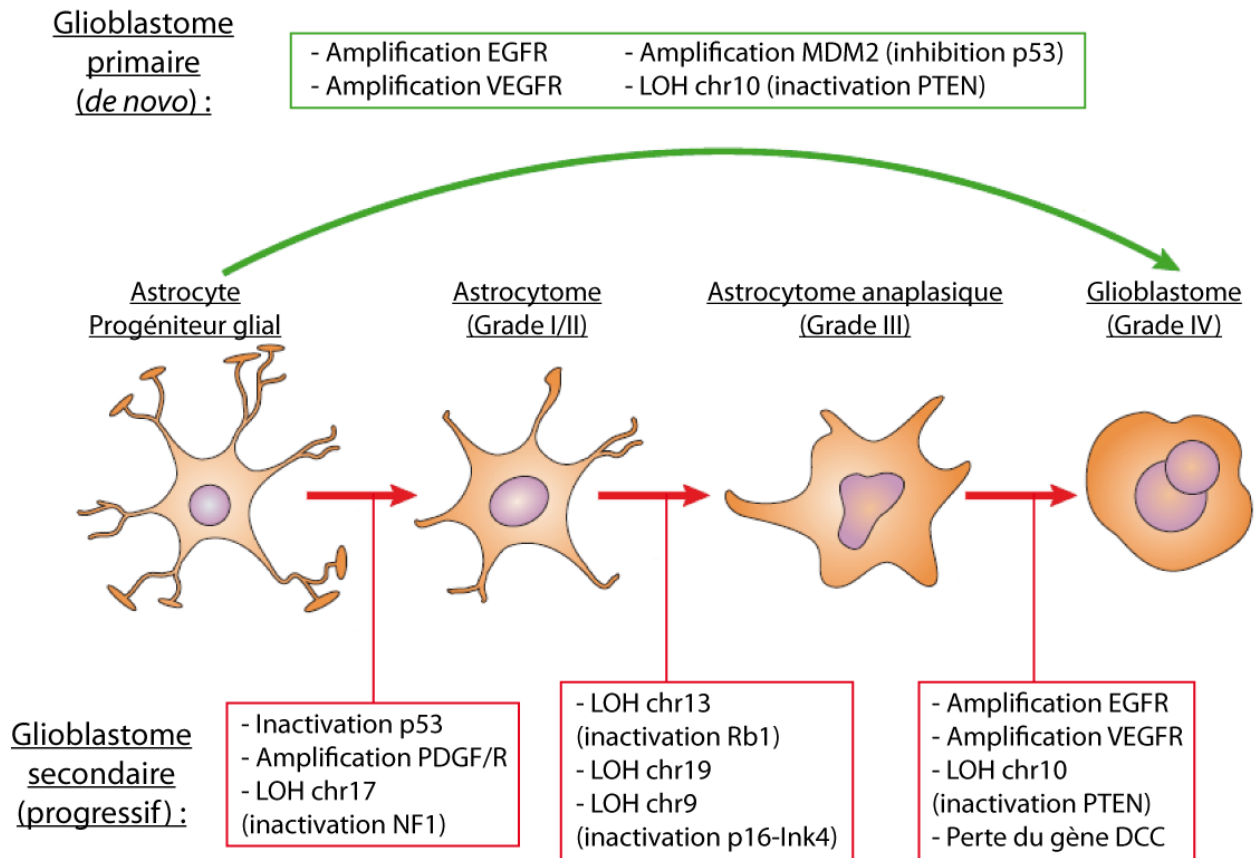


Figure 11 : Processus oncogéniques lors du développement d'un astrocytome

(source : adaptée de Lesniak et Brem, 2004)

3.2.1. La perte d'hétérozygotie

La perte d'hétérozygotie ou LOH (Loss Of Heterozygosity) représente la perte d'une partie du patrimoine génétique d'un des deux parents par délétion ou mutation. Pour un gène donné, la LOH va toucher l'allèle fonctionnant normalement, l'autre allèle étant déjà inactif. Cette LOH dans le cas des processus oncogéniques va toucher les gènes suppresseurs de tumeurs et va les inactiver, permettant ainsi une prolifération ou une survie anormale de la cellule.

L'altération génétique la plus fréquente dans le cas des glioblastomes aussi bien primaires que secondaires est la LOH du chromosome 10q. Elle est présente dans 60 à 90 % des cas. Cette altération, caractéristique du grade IV et pas ou peu des grades inférieurs, combinée à une ou deux autres altérations génétiques, est associée à un pronostic défavorable.

3.2.2. Mutation de TP53

Le gène suppresseur de tumeur TP53, localisé sur le chromosome 17, est le gène codant pour le facteur de transcription p53 responsable de la régulation du cycle cellulaire, pouvant induire l'apoptose et l'inhibition de l'angiogénèse. L'altération de ce gène fut la première décrite dans le cas des tumeurs astrocytaires (Nigro et al., 1989) et a été la plus étudiée. Le gène TP53 est altéré ou supprimé dans 25 à 40 % des GBM primaires et dans 90 % des GBM secondaires où son altération se produit généralement dans les stades précoces de la maladie (Watanabe et al., 1997).

3.2.3. Surexpression du récepteur à l'EGF

Le récepteur à l'EGF ou EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des protéines kinases, capable de se dimériser lors de la fixation de son substrat et d'activer les voies de prolifération cellulaire.

La surexpression de l'EGFR dans les GBM est l'altération génétique la plus fréquente, présente dans 50 à 60 % des cas (von Deimling et al., 1992 ; Heimberger et al., 2005) et provoquant une suractivation des voies de prolifération. La majorité des GBM portant cette surexpression présente également un mutant du gène de l'EGFR appelé EGFRvIII, forme

tronquée de la protéine au niveau extracellulaire capable de s'auto-activer. Ce mutant EGFRvIII est retrouvé dans 25 à 67 % des GBM suivant les études (Pelloski et al., 2007).

3.2.4. Surexpression du récepteur au PDGF

Le récepteur au PDGF ou PDGFR (Platelet-Derived Growth Receptor) est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, impliqué dans les processus de croissance cellulaire et de différenciation, en activant les voies des MAP kinases et de la PI3 kinase, tout comme le récepteur à l'EGFR (**Figure 12**).

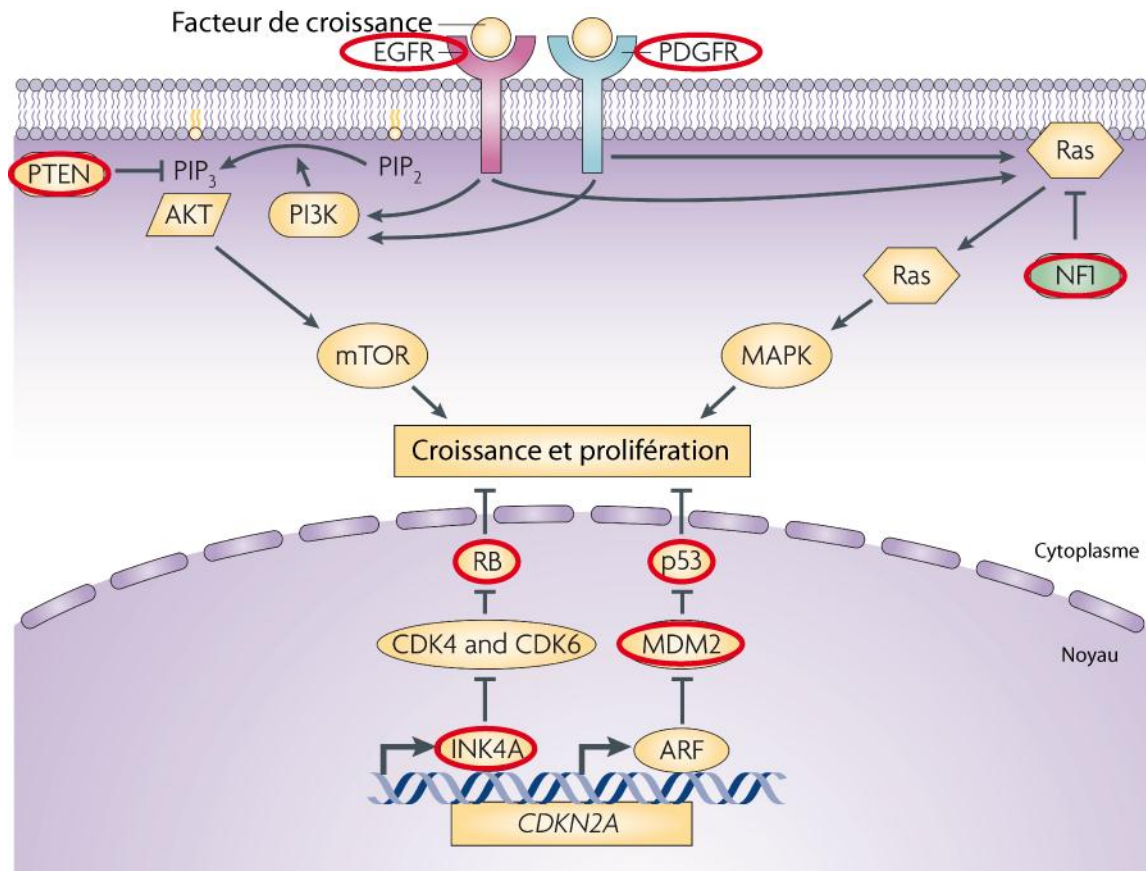


Figure 12 : Voie de signalisation impliquée dans la genèse des gliomes

(source : Huse et Holland, 2010)

Sa surexpression dans les glioblastomes secondaires se retrouve dans environ 60 % des cas, lors des phases précoces de transformation (Puputti et al., 2006).

3.2.5. Autres altérations

La protéine du Rétinoblastome Rb est une protéine responsable du point de contrôle en G1 lors de la division cellulaire, bloquant l'entrée en phase S et inhibant ainsi la croissance (Giacinti et al., 2006) en agissant sur certains facteurs de croissance (famille E2F...). Cette protéine se retrouve altérée dans 20 à 30 % des cas de gliomes malins, soit par inactivation du gène RB après mutation, soit par la perte d'expression de ce gène suite à une délétion (Fueyo et al., 1998 ; Behin et al., 2003 ; Cimini et Ippoliti, 2011).

Le gène suppresseur de tumeur P16-Ink4A code pour un inhibiteur spécifique des kinases cycline D-dépendantes CDK4 et CDK6, qui empêche l'association de ces kinases avec leur cycline correspondante. Dans les glioblastomes, la délétion homozygote du gène P16-INK4A est retrouvée dans plus de 50 % des cas, et le gène est altéré dans 80 % des lignées cellulaires par l'hyperméthylation de son promoteur (Lee et al., 2000 ; Yamanaka, 2008 ; Cimini et Ippoliti, 2011).

La protéine PTEN (Phosphatase/TENsin homolog protein) agit comme un suppresseur de tumeur en inhibant la voie de signalisation de la PI3 kinase/Akt, responsable de la croissance et de la prolifération des cellules via la protéine mTor. L'inactivation de PTEN due à une mutation ou à une perte de fonction du gène se produit dans environ 30 % des glioblastomes primaires, et plus rarement (4 %) dans les glioblastomes secondaires (Li et al., 1997 ; Li, 1997 ; Steck et al., 1997). Cette perte de fonction peut être due à une LOH du gène sur le chromosome 10 (voir précédemment).

La protéine Nf1 (Neurofibromin 1) est une protéine exprimée dans de nombreux types cellulaires, et de façon très abondante dans le système nerveux. Cette protéine, de la famille des Ras-GAP (GTPase-Activating Proteins), va hydrolyser le GTP en GDP au niveau de la protéine Ras, ce qui va l'inhiber et inhiber la voie de prolifération et de différenciation Ras/MAP kinases. Elle est également impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, la migration cellulaire et le développement neuronal. Le gène NF1 se retrouve muté dans 12 à 15 % des gliomes, principalement de bas grade (El-Azouzi et al., 1989 ; Reilly et al., 2000).

Les gliomes sont des tumeurs qui vont exprimer de très forts taux de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), qui va agir sur les cellules endothéliales via ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 pour favoriser leur prolifération et ainsi augmenter l'angiogénèse dans et autour

de la tumeur (Maity et al., 2000 ; Oka et al., 2007). De même, le gène du VEGFR2 est amplifié dans 6 à 17 % des tumeurs malignes, favorisant la croissance tumorale (Joensuu et al., 2005 ; Puputti et al., 2006).

L'oncoprotéine MDM2 (Murine Double Minute-2) régule négativement la protéine p53 créant une balance entre croissance et apoptose. Sa surexpression dans les cellules va avoir les mêmes conséquences qu'une inactivation du gène TP53, et favoriser la prolifération cellulaire (Meltzer, 1994). La surexpression de la protéine MDM2, qui se retrouve dans environ 50 % des gliomes, n'est pas seulement due à une amplification du gène MDM2, qui lui n'est présent que dans 10 à 15 % des gliomes, mais aussi à la stabilisation de la protéine suite à des modifications post-traductionnelles (Korkolopoulou et al., 1997).

3.3. Traitements actuels

3.3.1. Chirurgie

Il faut distinguer deux types de chirurgie dans le cas des tumeurs cérébrales. Le terme de biopsie est employé dans le cas du prélèvement d'un petit morceau de la tumeur suite à une trépanation (petite ouverture de la boîte crânienne) afin de poser un diagnostic histopathologique. Il est à différencier de l'exérèse de la tumeur, acte pas toujours possible du fait de la localisation de la tumeur, et qui commence par l'ouverture de la boîte crânienne sous anesthésie générale avant de retirer le plus possible de tissu tumoral. Les tumeurs cérébrales étant très invasives, la chirurgie ne permet pas de retirer toutes les cellules tumorales. Il est nécessaire de la coupler à une chimiothérapie et/ou une radiothérapie.

Dans tous les cas, la chirurgie est la seule technique permettant de poser le diagnostic histologique et d'orienter le traitement suivant ces résultats.

3.3.2. Radiothérapie

La radiothérapie est utilisée fréquemment dans le traitement des tumeurs cérébrales malignes après chirurgie, en association avec la chimiothérapie. Les protocoles courants se composent d'une trentaine de fractions de 2 grays (Gy) pour un total de 60 Gy, variant suivant la taille de la tumeur (Simon et al., 2005). Pour les bas grades, la radiothérapie précoce après chirurgie n'a pas montré d'effets significatifs sur la survie des patients, et n'est actuellement pas proposée (van den Bent et al., 2005).

L'une des limites de la radiothérapie vient du fait que l'irradiation de la tumeur va toucher les cellules saines avoisinantes. Bien que celles-ci soient plus résistantes et capables de réparer leur ADN, des effets secondaires peuvent être observés allant de maux de tête à la paralysie ou à la démence chez les long-survivants. Dans le cas des GBM, ces tumeurs sont connues pour être radiorésistantes car très hypoxiques. En effet, l'oxygène est un élément essentiel pour la création de radicaux libres suite aux rayonnements, ce qui explique les résultats relativement médiocres d'un traitement par radiothérapie seule.

3.3.3. Chimiothérapie

La chimiothérapie a beaucoup évolué depuis 50 ans avec de nouvelles molécules agissant de manières différentes. Dans les années 1960, les molécules les plus courantes dans le traitement des gliomes étaient les anthracyclines dont la Doxorubicine (ou Adriamycine) est le composé le plus connu. Ces traitements ont évolué vers le Cisplatine, puis vers les nitrosourées (BCNU ou Carmustine, CCNU ou Lomustine), la Vincristine et les dérivés de la Camptothécine (Irinotécan, Topotécan...) dans les années 1990. Malgré toutes ces nouvelles molécules, la médiane de survie n'a que très peu évolué, et reste à 8 mois environ.

Le Témazolomide (Temodal®) est devenu une alternative intéressante à ces molécules au début des années 2000. Agent alkylant de l'ADN capable de provoquer des cassures et d'induire la mort des cellules tumorales, il est devenu la molécule de référence dans le protocole Stupp, en administration concomitante avec la radiothérapie et en administration mensuelle adjuvante

(Stupp et al., 2005 ; Stupp et al., 2009). Avec ce protocole, la médiane de survie est passée à 14,6 mois contre 12,1 pour la radiothérapie seule.

Des études ont montré que le statut de l'enzyme O⁶-methylguanine–DNA methyltransferase (MGMT) dans les gliomes malins de haut grade est un facteur indicatif de l'efficacité du Témzolomide (Balana et al., 2003 ; Hegi et al., 2005). Cette enzyme de réparation de l'ADN joue un rôle clé dans la survie et la résistance des cellules tumorales soumises à la chimiothérapie, mais lorsque son promoteur est méthylé et son gène éteint, la réponse au Témzolomide et aux autres agents alkylants (Carmustine...) est associée à un bien meilleur pronostic chez les patients.

D'autres molécules sont utilisées dans un second temps, en soutien du Témzolomide, comme l'Irinotécan (ou Campto®, inhibiteur des topo-isomérase), le Bévacicumab (ou Avastin®, agent antiangiogénique), et même d'autres agents alkylants tels que la Carmustine (BCNU) ou la Lomustine (CCNU). La Carmustine peut être utilisée en cas de contre-indication du Témzolomide, sous forme de pastilles (Gliadel®) placées directement dans la cavité après exérèse de la tumeur et qui relarguent progressivement la molécule active (**Figure 13**).

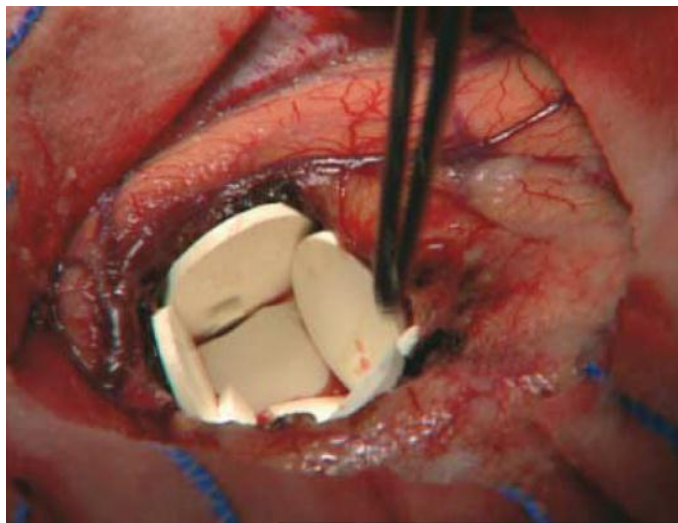


Figure 13 : Implants de Gliadel® placés dans la cavité de résection d'un gliome malin.

(source : Lesniak et Brem, 2004)

Chapitre 2 : Le cytosquelette

1. Généralités

Le cytosquelette constitue un réseau dense et dynamique au sein des cellules. Il se divise en trois types d'éléments différents suivant les protéines qui les composent : les microfilaments (MF), les filaments intermédiaires (FI) et les microtubules (MT) (**Figure 14**). Ces structures ont de nombreuses fonctions, telles que le maintien de la forme de la cellule, ses déplacements ou ceux de ses organites et la séparation des chromosomes lors de la mitose.

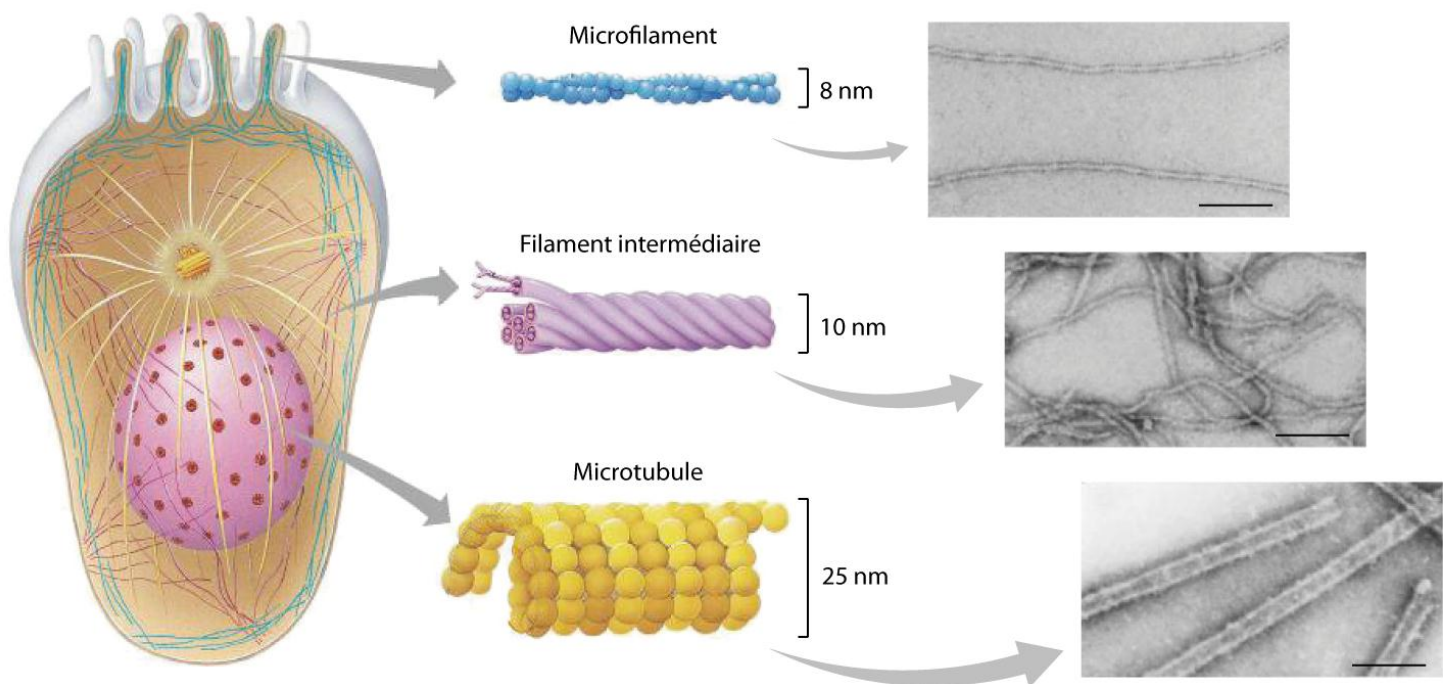


Figure 14 : Représentation schématique du cytosquelette dans une cellule, avec le détail des trois types de fibres le composant (microfilaments, filaments intermédiaire et microtubules) et leur observation en microscopie électronique (barre noire : 100 nm)

(adaptée de différentes sources internet)

Les MF et les MT sont des polymères d'actine et de tubuline respectivement, et se retrouvent dans tous les types cellulaires de l'organisme. Les FI regroupent des fibres hétérogènes au niveau des protéines qui les composent, variant selon le type cellulaire. Les oligodendrocytes ne possèdent pas de FI.

2. Les microfilaments

2.1. Structure et polymérisation des microfilaments

Les MF sont composés d'une protéine très abondante (jusqu'à 10 % de la masse protéique totale) et conservée entre les espèces eucaryotes, l'actine, de 43 kDa environ suivant les isoformes. Cette protéine est présente sous deux formes : globulaire (Actine G) lorsque celle-ci est sous forme monomérique, fibreuse (Actine F) sous forme de microfilaments (**Figure 15A**).

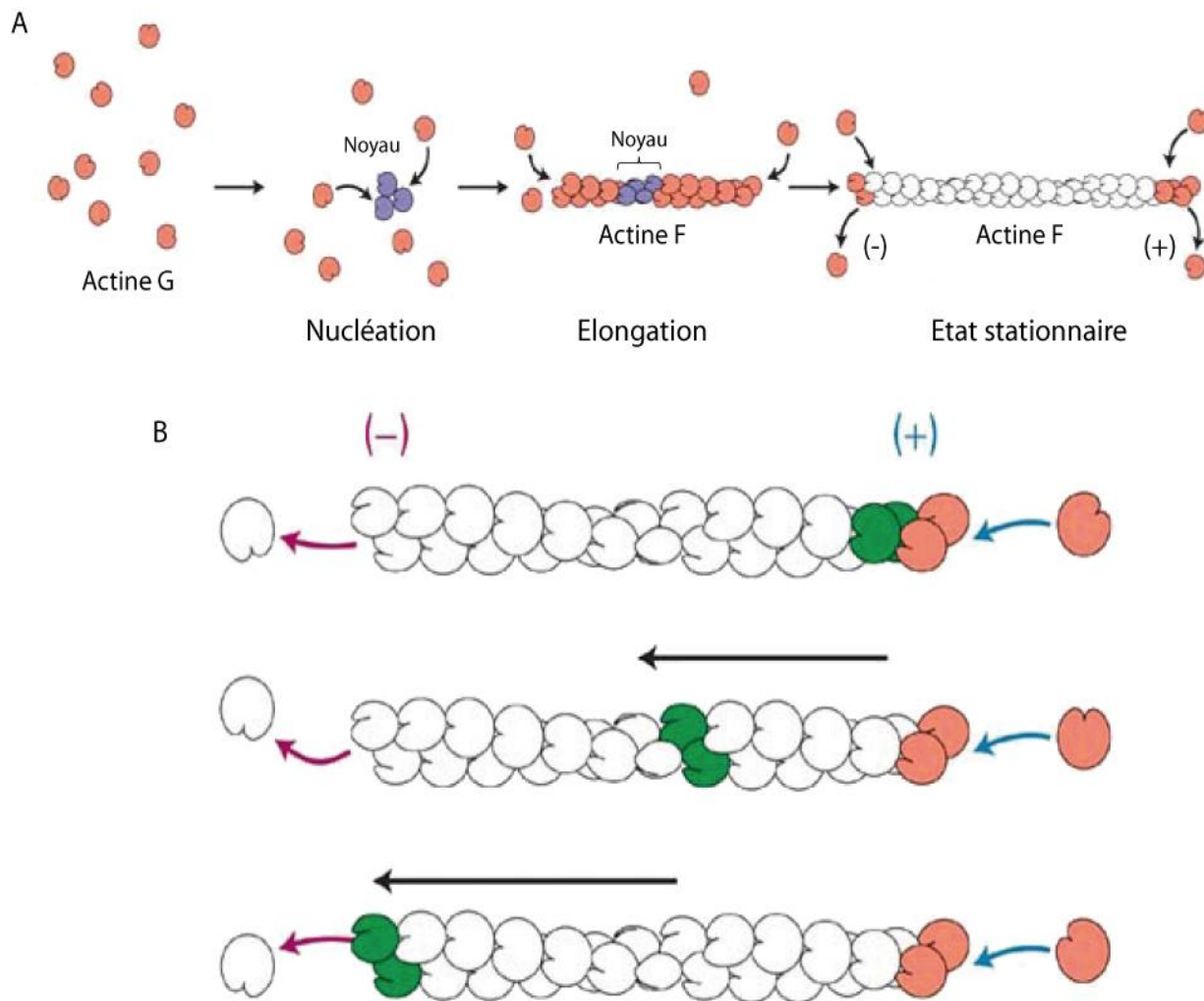


Figure 15 : Polymérisation de l'actine. A : Les différentes étapes de la polymérisation.

B : Illustration du mouvement de « tapis roulant » ou « treadmilling ».

(source : Université de Laval, Canada)

L'actine G est une protéine globulaire composée de deux domaines, séparés par un site de fixation pour l'ATP (Adénosine Tri-phosphate) et un site de fixation pour un cation divalent (Kabsch et al., 1990). Elle fixe une molécule d'ATP de façon non covalente, et plusieurs molécules d'actine G-ATP vont s'associer entre elles grâce à différentes protéines telles que la profiline (Korenbaum et al., 1998), pour former un « noyau » (la nucléation). La polymérisation va continuer par un phénomène de « tapis roulant » ou « treadmilling » (l'élongation) (**Figure 15B**), avec hydrolyse progressive de l'ATP en ADP (Adénosine Di-Phosphate) à l'intérieur de l'actine F. L'actine F couplée à l'ADP va se libérer du microfilament grâce à d'autres facteurs tels que la cofiline (Pfaendtner et al., 2010) et pourra être réutilisée plus tard.

Les MF, d'un diamètre moyen compris entre 7 et 9 nm, sont polarisés, avec une extrémité dite « pointue » (-), où la polymérisation est lente et où a lieu la dépolymérisation, et l'autre dite « barbue » (+), où la polymérisation est rapide (Pollard et Mooseker, 1981 ; Carlier, 1991). L'actine F a une structure hélicoïdale, dont l'hélice tourne à droite avec une distance de répétition de 36 nm. Les MF peuvent atteindre plusieurs dizaines de microns, sur toute la longueur de la cellule (Molloy et al., 1995 ; Steffen et al., 2001).

2.2. Fonctions des microfilaments

La fonction majeure des MF est de permettre les mouvements ou les déplacements des cellules. Dans le cas des cellules musculaires, l'actine interagit avec la myosine pour former les sarcomères, unités de contraction des muscles. L'actine va également permettre la migration des cellules et la formation de pseudopodes pour leurs déplacements en modulant ses cycles de polymérisation/dépolymérisation. Elle participe aussi aux phénomènes de phagocytose impliquant les déformations de la membrane plasmique lors de l'arrivée d'un pathogène.

3. Filaments intermédiaires

3.1. Généralités et classification

Les FI, dont le diamètre est compris entre 8 et 12 nm, représentent un groupe hétérogène de structures protéiques codées par 70 gènes différents (Szeverenyi et al., 2008). Ces protéines sont classées en 6 types différents selon la position de leurs introns (**Tableau 2**). Les types I et II regroupent les kératines acides et basiques, protéines exprimées par les cellules épithéliales. Le type III comporte 4 protéines différentes présentes dans certains types cellulaires : la vimentine dans les cellules d'origine mésodermique, la desmine dans les cellules musculaires, la GFAP principalement dans les astrocytes, et la périphérine dans les neurones périphériques et certains neurones centraux. Le type IV regroupe des protéines spécifiques des neurones, telles que les différentes sous-unités des neurofilaments (sous-unité légère des neurofilaments : NFL ; sous-unité moyenne des neurofilaments : NFM ; sous-unité haute des neurofilaments : NFH), l' α -internexine, la nestine et la synémine. Les lamines A, B et C constituent le type V, et sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes, à la face interne de la membrane nucléaire. Enfin, le type VI comporte deux protéines chez les mammifères, spécifiques du cristallin : la filensine et la phakinine. Toutes ces protéines sont responsables d'au moins 72 pathologies humaines différentes.

Tableau 2 : Classification des protéines des filaments intermédiaires chez les mammifères.

Type	Protéine	Masse moléculaire en kDa	Distribution tissulaire	Revue de référence	
I	Kératines acides (K9 à K24)	40 à 64	Cellules épithéliales	Schweizer et al., 2006 Bragulla et al., 2009	
II	Kératines basiques (K1 à K8)	53 à 67	Cellules épithéliales	Schweizer et al., 2006 Bragulla et al., 2009	
III	Vimentine	56	Cellules d'origine mésodermique, cellules gliales	Minin et Moldaver, 2008	
	Desmine	53	Cellules musculaires lisses, striées et cardiaques	Tang, 2008	
	GFAP	50	Astrocytes et certaines cellules de Schwann	Middeldorp et Hol, 2011	
	Périphérine	57	Neurones périphériques et certains neurones centraux	Konishi et al., 2007	
IV	Neurofilament	NFL	68	Neurones matures	Perrot et al., 2008
		NFM	160	Neurones matures	Perrot et al., 2008
		NFH	205	Neurones matures	Perrot et al., 2008
	alpha-internexine	66	Neurones matures du SNC et neurones embryonnaires	Fliegner et al., 1990	
	Nestine	200	Cellules souches neuro-épithéliales	Michalczyk et Ziman, 2005	
	Synémine	41 à 173	Neurones matures du SNC, progéniteurs astrocytaires, épendymocytes	Mizuno et al., 2007 Pitre et al., 2012	
V	Lamine A	72	Toutes les cellules eucaryotes, à la face interne de la membrane nucléaire	Worman, 2012	
	Lamine B	66	Toutes les cellules eucaryotes, à la face interne de la membrane nucléaire	Worman, 2012	
	Lamine C	62	Toutes les cellules eucaryotes, à la face interne de la membrane nucléaire	Worman, 2012	
VI	Filensine (BFSP1)	75	Cellules du cristallin	Song, 2009	
	Phakinine (BFSP2)	46	Cellules du cristallin	Song, 2009	

3.2. Structure et assemblage des filaments intermédiaires

Les FI, composés de protéines fibrillaires à la différence des protéines globulaires des MT et MF, possèdent des caractéristiques communes entre eux (**Figure 16A**). Le domaine central (ou « Rod domain ») est dit α -hélicoïdal car il possède plusieurs hélices α . Ce domaine est séparé en 2 segments comportant chacun 2 hélices α (1A et 1B pour le premier segment, 2A et 2B pour le second). Entre chaque hélice se trouve une séquence non-hélicoïdale servant de lien, les linkers (L1, L1/2 et L2). Les parties N-terminale (Tête) et C-terminale (Queue) diffèrent d'une protéine à l'autre, alors que les domaines centraux sont relativement homologues entre ces protéines (Herrmann et Aebi, 2004). Seules les lamines présentent un domaine central plus long (environ 350 Aa au lieu de 310) (Minin et Moldaver, 2008 ; Worman, 2012).

Les monomères ne nécessitent pas de source d'énergie particulière ni de protéines particulières pour s'assembler en dimère de 48 nm: leur assemblage est spontané (**Figure 16B**). Les domaines N-terminaux des monomères s'associent ensemble, tout comme les domaines C-terminaux, parallèlement entre eux. Deux dimères vont s'associer de façon anti-parallèle, avec un décalage entre les deux dimères, formant ainsi des tétramères, qui s'associent ensuite en protofilament de 2 nm de diamètre. Ces protofilaments, en s'associant ensemble, donnent des filaments intermédiaires de 8 à 12 nm de diamètre.

Les FI, à la différence des MF et des MT, ne sont pas en équilibre avec des monomères solubles, et ne participent donc pas à des cycles réversibles de polymérisation et dépolymérisation. Les protéines des FI sont insolubles dans la plupart des tampons aqueux, mais deviennent solubles dans l'urée. Si l'urée est enlevée, ces protéines pures vont spontanément polymériser en FI à structure normale (Franke et al., 1983). Les FI sont dégradés par des protéases spécifiques suivant les types cellulaires telles que la calpaïne pour les kératines (Makowski et Ramsby, 1998) ou les caspases pour la vimentine (Byun et al., 2001).

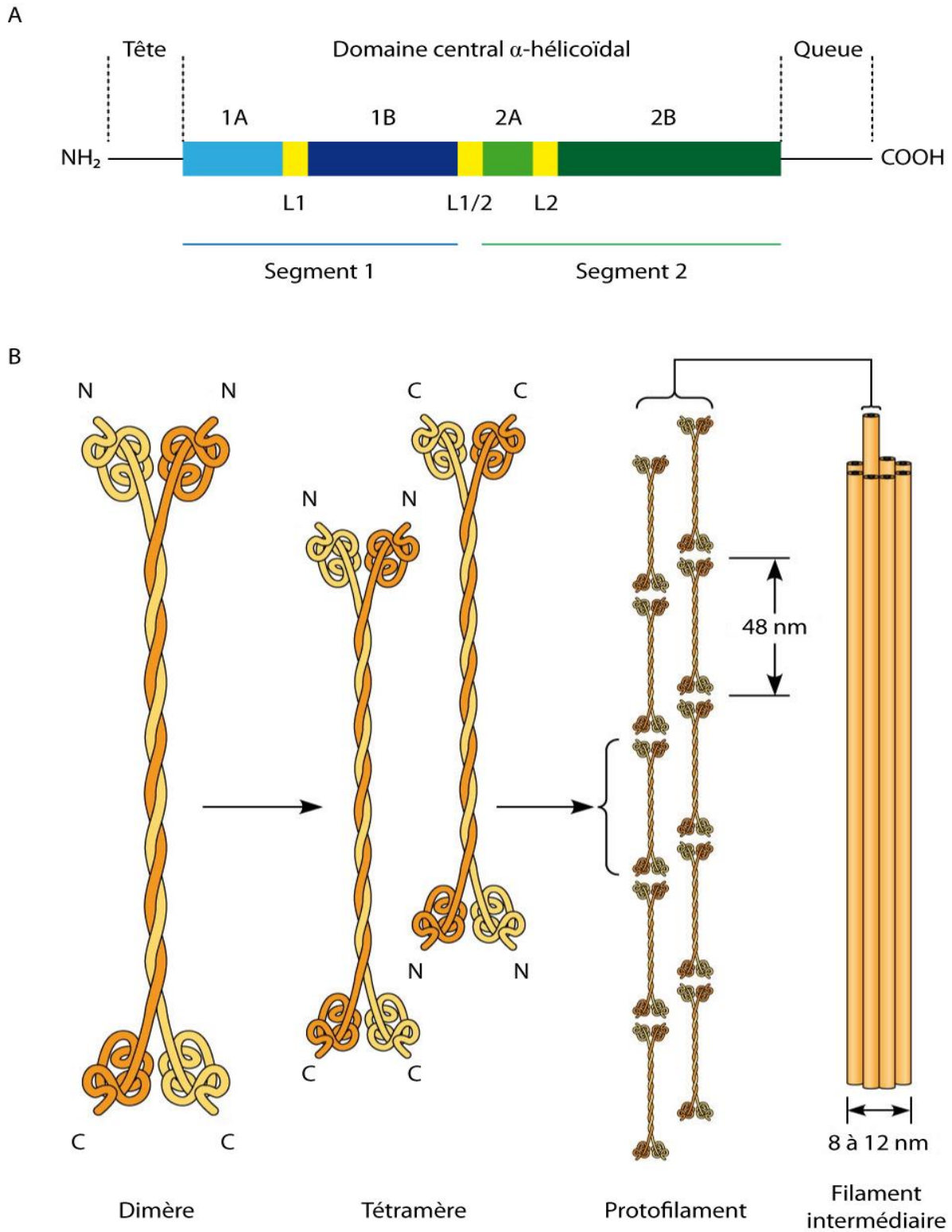


Figure 16 : Schémas de la structure d'une protéine de FI (A) et de son assemblage (B)

(source : www.pearsoned.co.uk)

3.3. Fonctions des filaments intermédiaires

Les rôles des FI varient suivant leur type et leur localisation cellulaire et tissulaire, mais leurs fonctions principales sont le renfort de la structure de la cellule et le maintien de la forme grâce à leurs interactions avec les autres éléments du cytosquelette. Les FI sont aussi responsables de l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire et aux autres cellules par leurs interactions avec les desmosomes au niveau de la membrane plasmique. Les lamines sont un cas particulier car elles servent de soutien à l'enveloppe nucléaire dans toutes les cellules eucaryotes nucléées.

Les FI possèdent d'autres fonctions plus spécifiques suivant le type cellulaire : la desmine et la vimentine, outre le maintien de la structure des cellules musculaires, jouent un rôle prépondérant dans l'activation de la contraction musculaire par des réorientations de leurs faisceaux. La kératine participe également à renforcer l'organisme contre les agressions physiques et chimiques au niveau de la peau (kératinocytes), par son abondance dans les couches superficielles ainsi que son insolubilité dans l'eau et sa résistance aux détergents et aux tensions.

3.4. Protéines associées aux filaments intermédiaires ou IFAP

Il existe un nombre important de protéines interagissant avec les FI (IFAP), servant à ancrer les FI à la membrane plasmique, aux desmosomes, aux organites cellulaires ou aux autres éléments du cytosquelette (**Tableau 3**) (Foisner et Wiche, 1991 ; Green et al., 2005). Ces protéines sont ubiquitaires ou spécifiques d'un type cellulaire, et interagissent avec plusieurs types de FI ou un seul en particulier. Par exemple, la plectine est une protéine ubiquitaire qui permet l'ancrage des différents FI aux MT et aux MF ainsi qu'aux desmosomes (Herrmann et Wiche, 1987), alors que la filaggrine ne se retrouve que dans les épithéliums kératinisés et relie les filaments de kératines à la membrane plasmique (Dale et al., 1985). D'autres protéines interagissent avec les FI mais sont classées dans d'autres catégories, telles que les protéines associées aux MT ou MAPs (Microtubules-Associated Proteins) qui seront développées dans un chapitre suivant.

Tableau 3 : Classification des principales protéines associées aux filaments intermédiaires (IFAP)

Protéine	Masse moléculaire en kDa	Distribution tissulaire	Fonctions	Références
Ankyrine	200	Tout type cellulaire	Liaison des FI aux MF et à la membrane plasmique	Bennett et Stenbuck, 1979
Calponine	33	Cellules musculaires principalement	Interaction avec la desmine et les MF	Mabuchi et al., 1997
Desmoplakines	I	Constituants des desmosomes, présents dans tous les tissus. Egalement hors des desmosomes dans les jonctions endothéliales spécialisées	Liaison des FI aux desmosomes	Skerrow et Matoltsy, 1974 Schmelz et Franke, 1993
	II			
Dystonine	BPAG1-e	230	Cellules épithéliales	Liaison des FI aux MF et aux MT Stanley et al., 1981 Sawamura et al., 1991 Okumura et al., 2002
	BPAG1-a	619	Neurones	
	BPAG1-b	824	Cellules musculaires	
	BPAG1-n	230	Neurones et cellules musculaires	
Envoplakine	210	Cellules épithéliales stratifiées squameuses	Liaison de l'enveloppe cornifiée aux desmosomes et aux FI	Ruhrberg et al., 1996
Epiplakine	450	Cellules du foie, des intestins, des glandes salivaires, de l'estomac	Liaison des FI à la membrane plasmique	Fujiwara et al., 2001 Wang et al., 2006
Filaggrine	37	Cellules épithéliales kératinisées	Liaison des kératines à la membrane plasmique	Lynley et Dale, 1983 Dale et al., 1985
Fimbrine (ou plastine)	68	Toutes les cellules répliquantes	Interaction avec la vimentine pour adhésion cellulaire	Correia et al., 1999
Periplakine	190	Cellules épithéliales	Liaison de l'enveloppe cornifiée aux desmosomes et aux FI	Ruhrberg et al., 1997
Plectine	300	Tout type cellulaire	Liaison des FI aux MT et aux MF, ancrage aux desmosomes	Wiche et al., 1984 Herrmann et Wiche, 1987
Spectrine	260	Tout type cellulaire	Liaison des FI aux MF et à la membrane plasmique	Langley et Cohen, 1987
Trichohyaline	220	Cellules épithéliales kératinisées de la langue et follicules pileux	Liaison des kératines à la membrane plasmique	Lee et al., 1993

3.5. Les neurofilaments

Les neurones expriment plusieurs types de FI durant leur développement et suivant leur localisation, tels que la nestine, l' α -internexine, la synémine et la périphérine, mais ce sont les neurofilaments (NF) qui sont les éléments du cytosquelette les plus abondants dans les longs axones myélinisés du SNC et SNP chez l'homme adulte.

3.5.1. Structure et assemblage des neurofilaments

Les NF sont composés de trois sous-unités, classées suivant leur poids moléculaire : la sous-unité légère des NF ou NFL (68 kDa), la sous-unité moyenne des NF ou NFM (160 kDa) et la sous-unité haute des NF ou NFH (205 kDa). Chacune des trois sous-unités possède un domaine amino (très court) et carboxy-terminal, ainsi qu'un domaine central en hélice α mesurant approximativement 310 Aa comme les autres FI (Geisler et al., 1983). Le domaine N-terminal et le domaine central ne varient que très peu entre les trois sous-unités, alors que le domaine C-terminal, riche en acides glutamiques et en domaines KSP (lysine/sérine/proline) varie fortement en longueur (**Figure 17**). Ces domaines KSP, surtout présents sur NFH, possèdent de nombreux sites de phosphorylation et de O-glycosylation.

Les différentes sous-unités sont synthétisées dans le corps cellulaire des neurones matures, et s'associent juste après la synthèse (Czosnek et al., 1980). La polymérisation commence par la dimérisation de NFL avec NFH ou NFM au niveau des domaines centraux, puis ces dimères vont former des tétramères antiparallèles, des protofilaments et des filaments, comme décrit précédemment (**Figure 16**). Les domaines C-terminaux des sous-unités NFH et NFM émettent des projections latérales, perpendiculaires à l'axe du NF (Hirokawa et al., 1984 ; Hisanaga et Hirokawa, 1988). Ces projections latérales participent à la stabilité du réseau de NF et permettent des interactions avec d'autres éléments du cytosquelette, différents organites (mitochondries, vésicules...), ou des protéines.

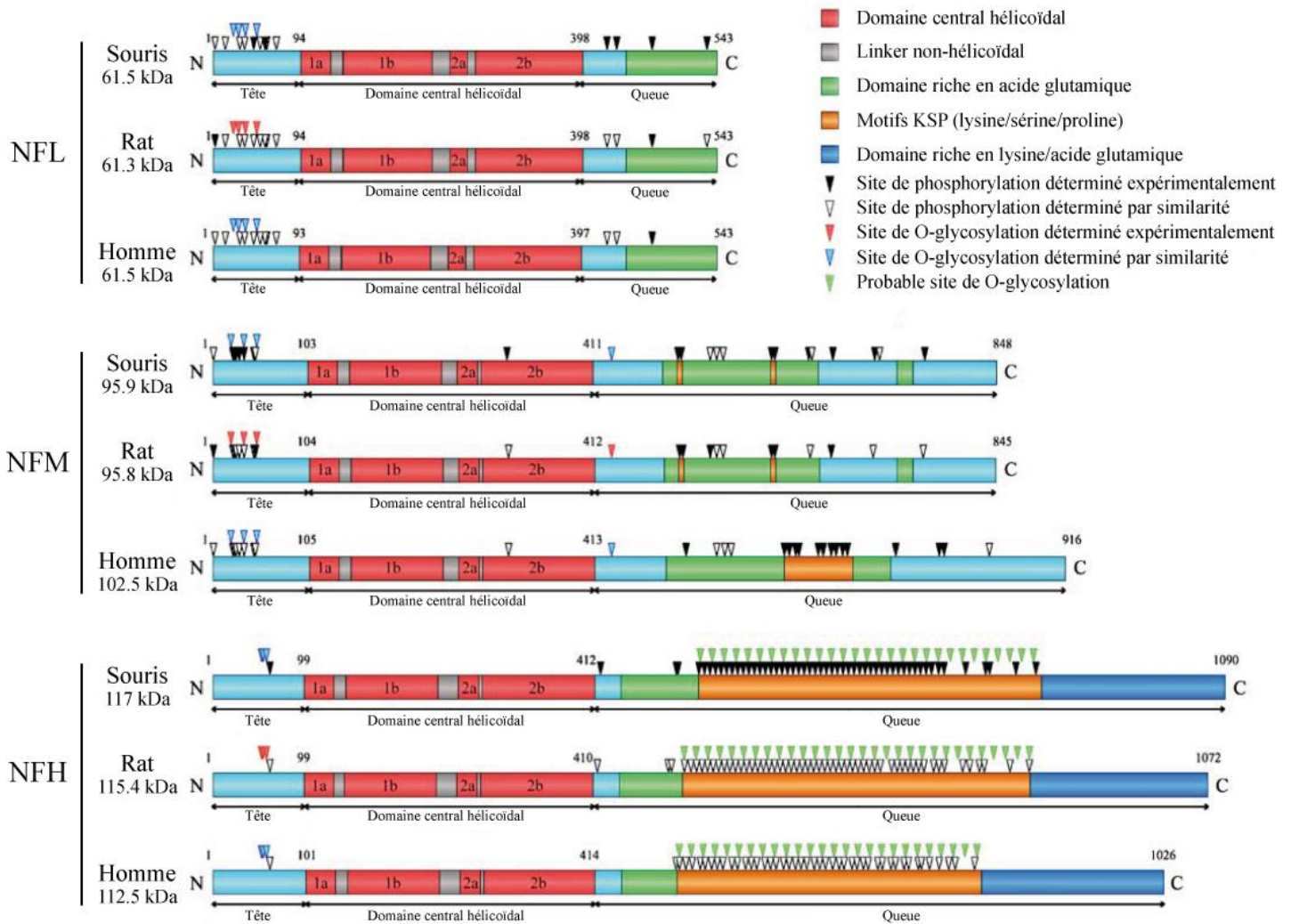


Figure 17 : Représentation schématique des différentes sous-unités des NF chez la souris, le rat et l'homme (source : Perrot et al., 2008)

3.5.2. Fonctions des neurofilaments

La principale fonction des NF est de réguler la croissance et le maintien du calibre des axones. Il a été montré que l'augmentation du nombre et de la densité des NF était corrélée avec une augmentation du calibre axonal (Friede et Samorajski, 1970). Ceci a été validé par un modèle de caille japonaise Quiver caractérisé par une absence de NF dans leurs axones provoquée par une mutation non-sens du gène de NFL et qui présentent un diamètre axonal

diminué (Yamasaki et al., 1991 ; Yamasaki et al., 1992 ; Ohara et al., 1993). Un modèle de souris transgéniques (NFH-LacZ) exprimant une protéine de fusion NFH- β -galactosidase qui séquestre et agrège les NF dans le péricaryon a montré que les axones déficients en NF ont un diamètre plus petit. Cependant, les souris ne présentent pas de trouble neurologique majeur et les neurones ne dégèrent pas (Eyer et Peterson, 1994). Un autre modèle de souris transgéniques déficiente en NFL a montré que chez ces souris, il y a une diminution de 20 fois environ des taux de NFM et NFH dans le cerveau et dans le nerf sciatique ainsi qu'une diminution du calibre axonal, mais que ces souris se développent normalement sans phénotype particulier (Zhu et al., 1997). A l'inverse, une augmentation du calibre des axones est observée chez des souris surexprimant NFL et NFH ou NFM (Xu et al., 1996). La surexpression d'une seule sous-unité, ou de NFH et NFM ensemble, diminue la croissance radiale des axones, indiquant le rôle prépondérant de NFL dans la structure des NF.

Une autre fonction des NF, conséquence de la précédente, est la régulation de la vitesse de conduction le long des axones. La vitesse de conduction de l'influx nerveux le long de l'axone est directement proportionnelle à son diamètre, ainsi qu'à l'épaisseur de la gaine de myéline et à la distance internodale. Chez les caillies japonaises Quiver ayant un diamètre axonal diminué, la vitesse de conduction est réduite par l'absence de NF (Sakaguchi et al., 1993). Les mêmes observations ont été réalisées chez les souris NFH-LacZ, avec des ralentissements des vitesses de conduction dans les nerfs caudal et tibial des animaux (Zochodne et al., 2004 ; Perrot et al., 2007). Les NF sont donc cruciaux pour une vitesse de conduction normale de l'influx nerveux et leur absence induit des processus neurodégénératifs.

3.5.3. Pathologies associées aux neurofilaments

Dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, des mutations des protéines des NF ont été identifiées. Des agrégats anormaux de NF se retrouvent comme marqueurs de ces maladies telles que la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Ces agrégats sont provoqués par des mutations sur les gènes des NFs, des dérégulations de ces gènes ou des dégradations de ces protéines. De plus, des NF sont relargués dans le liquide céphalo-rachidien chez ces patients.

La SLA est une pathologie neurodégénérative progressive touchant les neurones moteurs dans le cerveau et la moelle épinière, pouvant provoquer la mort des neurones et la perte du contrôle des muscles puis conduire à une paralysie des membres. L'un des marqueurs de cette pathologie est la formation d'agrégats de NF dans les neurones dégénéralant (Munoz et al., 1988 ; Murayama et al., 1992), avec pour cause principale une réduction de plus de 70% de la transcription du gène de NFL (Bergeron et al., 1994).

Dans la maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative du SNC, l'hyperphosphorylation des protéines des NF et de la protéine Tau est due à la perturbation de la balance entre les activités kinase et phosphatase (Gong et al., 2000). Ces protéines hyperphosphorylées s'accumulent dans le péricaryon des neurones, et provoqueraient l'agrégation des protéines des NF (Gong et al., 2003 ; Rudrabhatla et Pant, 2011). Leur rôle ainsi que celui des plaques séniles dans la maladie reste énigmatique.

Un dernier exemple de pathologie progressive du SNC est la maladie de Parkinson, causée par la dégénérescence des neurones pigmentés de la substance noire du cerveau, provoquant une diminution de la dopamine. L'un des changements majeurs dans cette pathologie est l'apparition des corps de Lewy, accumulation d'inclusions protéiques contenant essentiellement de l' α -synucléine, les trois sous-unités des NF, de l'ubiquitine et les sous-unités du protéasome (Galloway et al., 1992). Des mutations dans le gène de la Parkin, mais aussi dans le gène de NFM ont été observées, ainsi que des diminutions de la transcription de NFL (Hill et al., 1993), prouvant l'implication vraisemblable des gènes et des protéines des NF dans cette maladie.

3.6. La vimentine

La vimentine est un FI de type III se retrouvant dans les cellules d'origine mésenchymateuse et se présentant sous forme de filaments allant de la membrane plasmique jusqu'au noyau. Elle est très fortement exprimée dans les fibroblastes et les cellules endothéliales (Franke et al, 1979).

3.6.1. Structure de la vimentine

Comme les autres FI, un monomère de vimentine (56 kDa, 466 Aa) possède une structure hélicoïdale en son centre, entourée par une tête aminée et une queue carbonée (**Figure 18**). La vimentine va s'associer en dimères puis en tétramères antiparallèles, puis en protofilaments pour finir en filaments, selon le même schéma que précédemment (**Figure 16**).

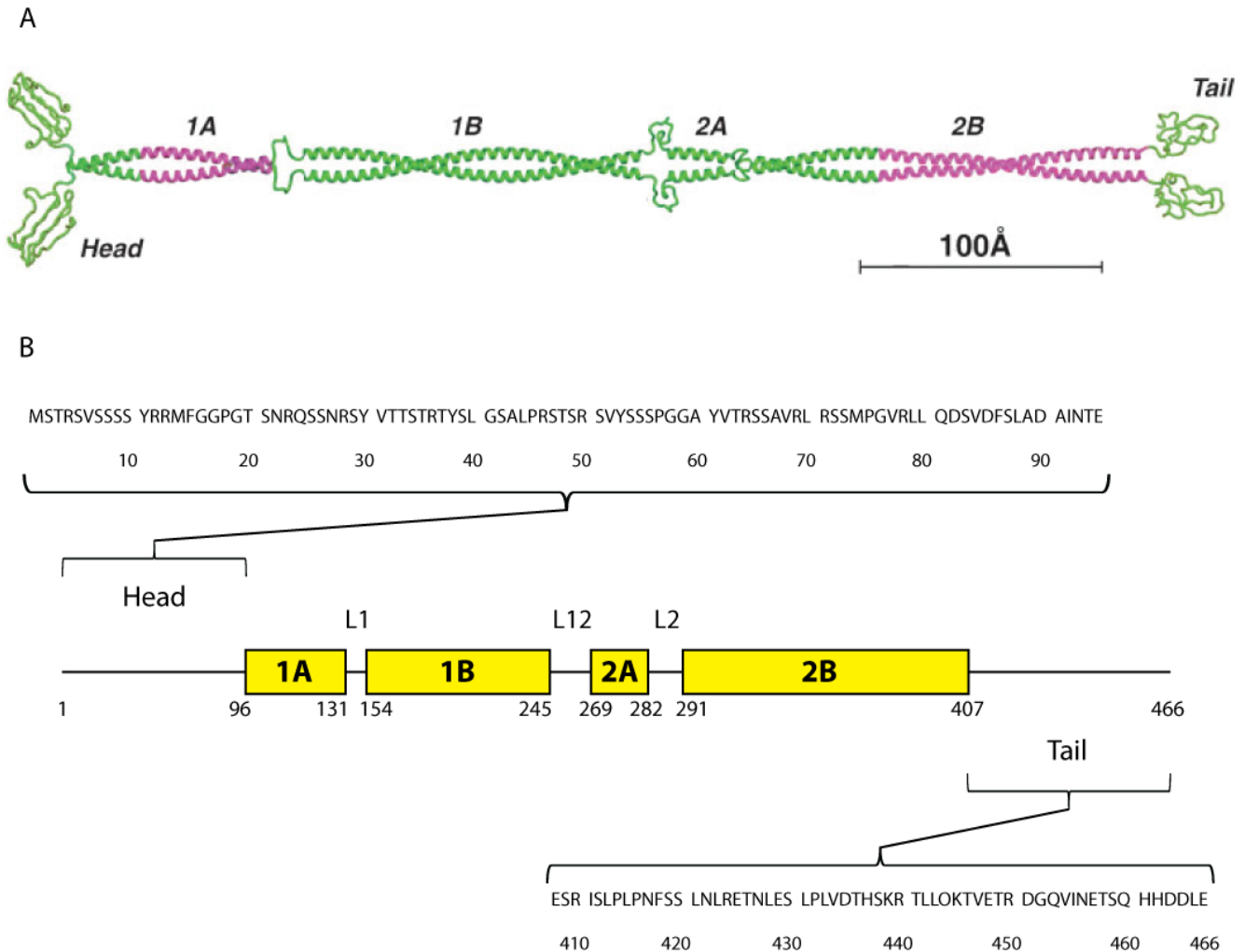


Figure 18 : Structure (A) et composition (B) de la vimentine humaine.

Les filaments de vimentine forment un réseau très souple, capables de répondre rapidement à des stimuli extérieurs comme des contraintes de flux sur des cellules de l'endothélium vasculaire (Helmke et al., 2000). Cette propriété va leur permettre d'avoir de nombreuses fonctions, au-delà de l'aspect purement structural.

3.6.2. Fonctions de la vimentine

3.6.2.1. Intégrité structurale des cellules

La première fonction décrite pour la vimentine s'est basée sur les observations en microscopie électronique de l'architecture d'une lignée de fibroblastes de rat par Katsumoto et collaborateurs (Katsumoto et al., 1990). Katsumoto décrit ces filaments de vimentine comme étant très proches du noyau, du réticulum endoplasmique et des mitochondries, représentant un véritable échaffaudage intracellulaire et un lien entre ces organelles.

Sous de fortes contraintes, les filaments de vimentine vont montrer une rigidité plus importante et une résistance à la cassure (Janmey et al., 1991). Cette propriété, très différente des MF et des MT plus souples, va permettre une complémentarité entre ces structures et explique sa présence, avec la desmine, dans les cellules musculaires (Tang, 2008). De plus, des fibroblastes dépourvus de vimentine issus de souris transgéniques KO pour la vimentine sont plus fragiles (Goldman et al., 1996), appuyant le fait que la vimentine joue un rôle majeur dans l'intégrité cellulaire.

3.6.2.2. Adhésion et migration cellulaires

Les intégrines sont des récepteurs ayant un rôle crucial dans l'adhésion et la migration cellulaire, par l'interaction de leurs sous-unités α et β avec les ligands extracellulaires, les connectant au cytosquelette et à la machinerie de transduction sous-membranaire. La vimentine interagit avec de nombreuses sous-unités α et β des intégrines suivant leur fonction, comme l'intégrine $\alpha\beta3$ dans l'angiogenèse (Gonzales et al., 2001) ou l'intégrine $\alpha2\beta1$ pour l'adhésion au collagène dans les cellules endothéliales (Kreis et al., 2005). Cette interaction entre la vimentine et les différentes intégrines se fait par l'intermédiaire d'IFAP telle que la plectine ou la fimbrine chez les macrophages (Correia et al., 1999).

La vimentine joue également un rôle important dans la migration des cellules immunitaires. Les lymphocytes sont capables de traverser la barrière endothéliale par diapédèse, soit en passant entre les cellules endothéliales, soit en les traversant directement. Nieminen et

collaborateurs ont montré que des cellules mononucléaires du sang périphérique déficientes en vimentine avaient une capacité réduite d'atteindre les nœuds lymphatiques mésentériques et la rate (Nieminen et al., 2006). Les cellules endothéliales déficientes en vimentine présentent également une intégrité diminuée, avec une expression aberrante des molécules de surface nécessaires au guidage des cellules immunitaires. Des observations similaires sur des cellules endothéliales cardiaques de rat ont montré que la vimentine était la protéine permettant la migration de ces cellules (Obermeyer et al., 2003).

3.6.2.3. Transduction de signaux

Par ses interactions avec les intégrines, la vimentine interagit avec de nombreuses protéines kinases impliquées dans les processus d'adhésion cellulaire et d'endocytose/exocytose. Ses changements rapides d'état de phosphorylation modulent son assemblage en filaments, et de nombreux sites de phosphorylation ont été identifiés comme étant régulés par différents isoformes de la Protéine Kinase C (PKC). Il a été montré par Ivaska et collaborateurs en 2005 que la PKC ϵ était capable de phosphoryler la vimentine et ainsi de réguler le retour des intégrines β 1 des vésicules endocytotiques vers la membrane plasmique (Ivaska et al., 2005).

La RhoA-binding kinase α (ROK α) a également montré des propriétés de spécificité et d'interaction avec la vimentine. ROK α est un effecteur direct de RhoA, protéine impliquée dans des phénomènes d'adhésion, de migration, de prolifération, de survie cellulaire et de réarrangement du cytosquelette. L'activation de RhoA va provoquer un effondrement du réseau de vimentine qui sert de réservoir de ROK α , entraînant son relargage et sa migration vers la périphérie de la cellule (Sin et al., 1998). Ces deux exemples d'implication dans des voies de signalisation et de transduction de signaux montrent bien que la vimentine n'a pas qu'un rôle architectural dans la cellule.

3.6.2.4. Apoptose et défense immune

La vimentine est capable de fixer la protéine p53, indiquant sa participation dans la régulation de la mort cellulaire et de la survie. Il a été montré dans des fibroblastes synoviaux

d'arthrose rhumatoïde que lorsque ces cellules sont exposées à des agents apoptotiques tel que TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et la lactacystine (inhibiteur du protéasome), il y a activation des caspases, provoquant la dégradation de la vimentine avec relargage de p53 et augmentation de l'apoptose (Byun et al., 2001 ; Yang et al., 2005). La dégradation du réseau de vimentine explique en partie les profonds changements morphologiques que subissent les cellules apoptotiques.

La vimentine participe à la protection contre certaines infections, telle que le virus de la fièvre porcine africaine. Suite à des réarrangements de la vimentine provoqués par les MT, il y a formation d'une cage autour des particules virales regroupées sous forme d'un « aggrésome », afin de limiter leurs mouvements dans le cytoplasme (Stefanovic et al., 2005). L'infection par le virus Bluetongue responsable de la fièvre catarrhale chez certains animaux va provoquer l'association directe de la vimentine dans sa partie N-terminale avec une protéine virale de la capsid externe (Bhattacharya et al., 2007). Cette association est nécessaire à la sortie du virus hors de la cellule infectée.

3.6.2.5. Régulation de l'ADN génomique

Les lamines sont les FI se situant à la surface interne de la membrane nucléaire, formant une couche protéique pouvant affecter la réplication de l'ADN et la transcription de certains gènes. Cependant, la vimentine est également capable de réguler certains facteurs de transcription, tel que p53, et d'interagir avec l'ADN directement. Les travaux de Traub et collaborateurs ont montré depuis le début des années 2000 que la vimentine peut interagir avec les ADN satellites (Tolstonog et al., 2000), les télomères, les rétroposons (variété de transposon) et l'ADN mitochondrial (Tolstonog et al., 2001). Cette association s'effectue essentiellement au niveau de la partie N-terminale de la séquence de la vimentine (acides aminés 1 à 95) (Wang et al., 2000). La vimentine interagit enfin avec les protéines s'associant à la région d'attachement de la matrice nucléaire (MAR-binding proteins). Ces régions d'attachement de la matrice nucléaire participant à l'organisation, la recombinaison et la réparation de la chromatine, l'équipe de Traub a démontré que la vimentine pouvait être considérée comme une protéine régulatrice de gènes.

4. Microtubules

4.1. Unité constituante : la tubuline

La tubuline est la protéine de base formant les MT. C'est une petite protéine globulaire composée de deux sous-unités α et β de 50 kDa chacune (**Figure 19**).

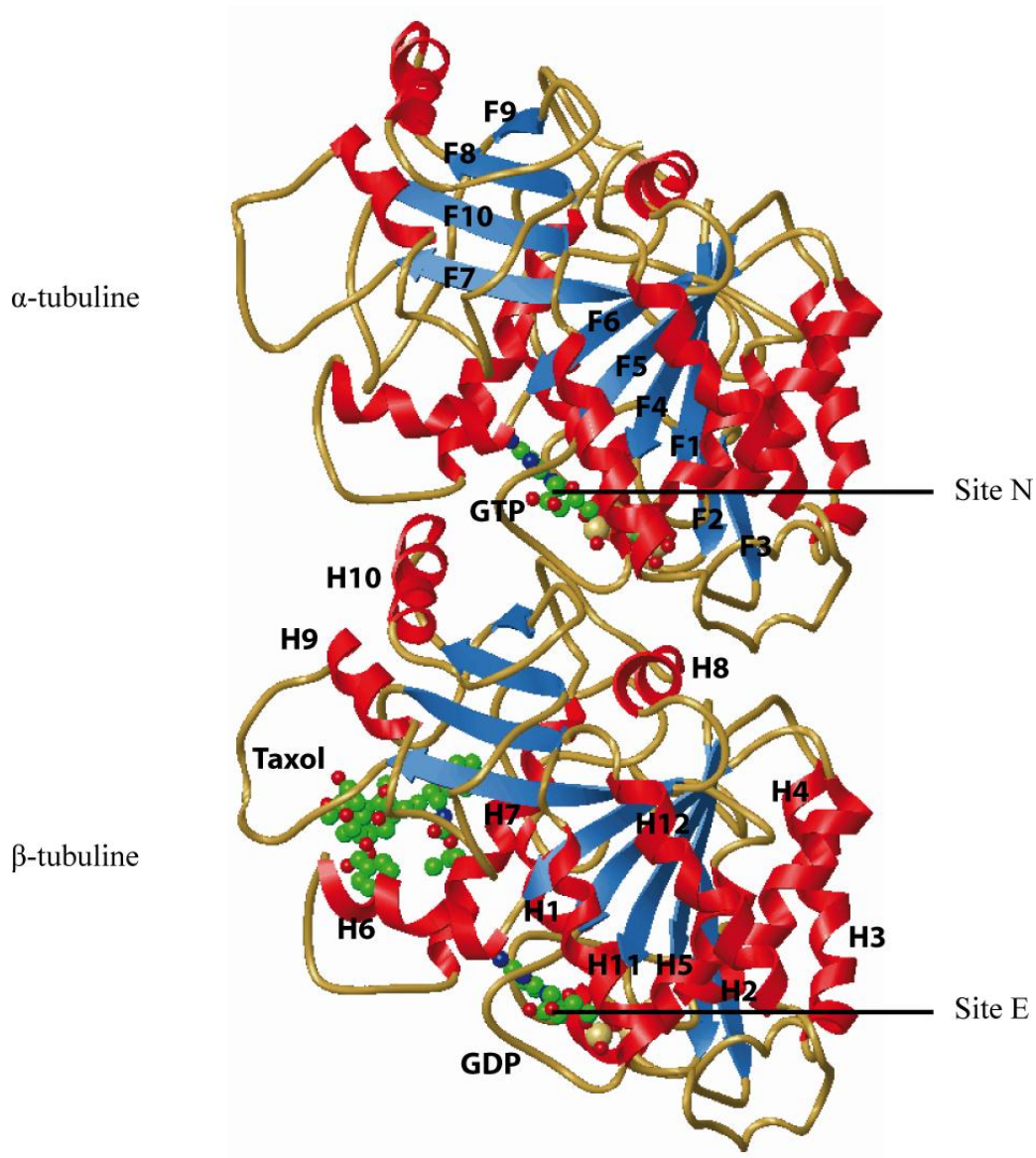


Figure 19 : Structure tri-dimensionnelle du dimère $\alpha\beta$ de tubuline.

F : Feuillet β ; H : Hélice α (adaptée de Nogales et al., 1998)

Ces monomères α et β appartiennent à une superfamille de protéines composée des tubulines α , β , γ , δ , ϵ et ζ , chacune ayant différentes fonctions et expressions suivant les cellules. La tubuline γ joue un rôle essentiel dans la nucléation des MT au niveau des centrosomes et des Centres Organiseurs des MicroTubules (MTOC). La tubuline δ se retrouve dans les centrosomes tout comme la tubuline ϵ qui est également impliquée dans la duplication des centrioles et l'organisation péricentriolaire. Enfin, la tubuline ζ est présente dans les corps basaux chez le parasite *Trypanosoma brucei*. Il existe deux autres formes de tubuline, la tubuline η et la tubuline ι , identifiées respectivement par Ruiz et collaborateurs (Ruiz et al., 2000) et Dupuis-Williams et collaborateurs (Dupuis-Williams et al., 2002), mais dont la localisation et les fonctions sont moins connues à l'heure actuelle.

Les sous-unités α et β sont ubiquitaires mais existent sous plusieurs isotypes différents chez l'homme en fonction de leur domaine C-terminal. Ce domaine varie suivant la localisation cellulaire et temporelle (Ludueña, 1993 ; Roach et al., 1998). Par exemple, la β III tubuline est spécifique des neurones et des cellules de Sertoli et va s'exprimer de façon prédominante durant le développement embryonnaire, alors que la β IV tubuline et la β II tubuline sont ubiquitaires. Ces sous-unités peuvent subir de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que l'acétylation, la phosphorylation, la détyrosination, la polyglutamylation et la polyglycation (Macrae, 1997). Une autre raison de l'hétérogénéité des sous-unités de tubuline est le fait que les sous-unités α et β sont codées respectivement par 6 et 7 gènes différents chez les mammifères (Cleveland et Sullivan, 1985). Tous ces isotypes différents vont conférer aux MT des propriétés particulières.

Sur chaque sous-unité α et β se trouve un site de fixation pour le GTP. Sur la sous-unité α , la molécule de GTP se fixe sur le site N et n'est pas interchangeable, alors que la molécule de GTP qui se fixe sur le site E de la sous-unité β peut être échangée avec une molécule de GDP au cours de la polymérisation.

4.2. Les microtubules

4.2.1. Structure

Les monomères α et β de tubuline s'associent pour former un hétérodimère qui va s'associer à d'autres hétérodimères pour former un protofilament, avec une alternance des sous-unités α et β (**Figure 20**). Les MT sont habituellement constitués de 12 ou 13 protofilaments associés pour former un tube creux polarisé d'approximativement 25 nm de diamètre. Les MT possèdent une extrémité plus (+) sur laquelle s'assemblent les dimères de tubuline $\alpha\beta$, et une extrémité moins (-) où soit l'assemblage est beaucoup plus lent, soit il y a désassemblage des dimères.

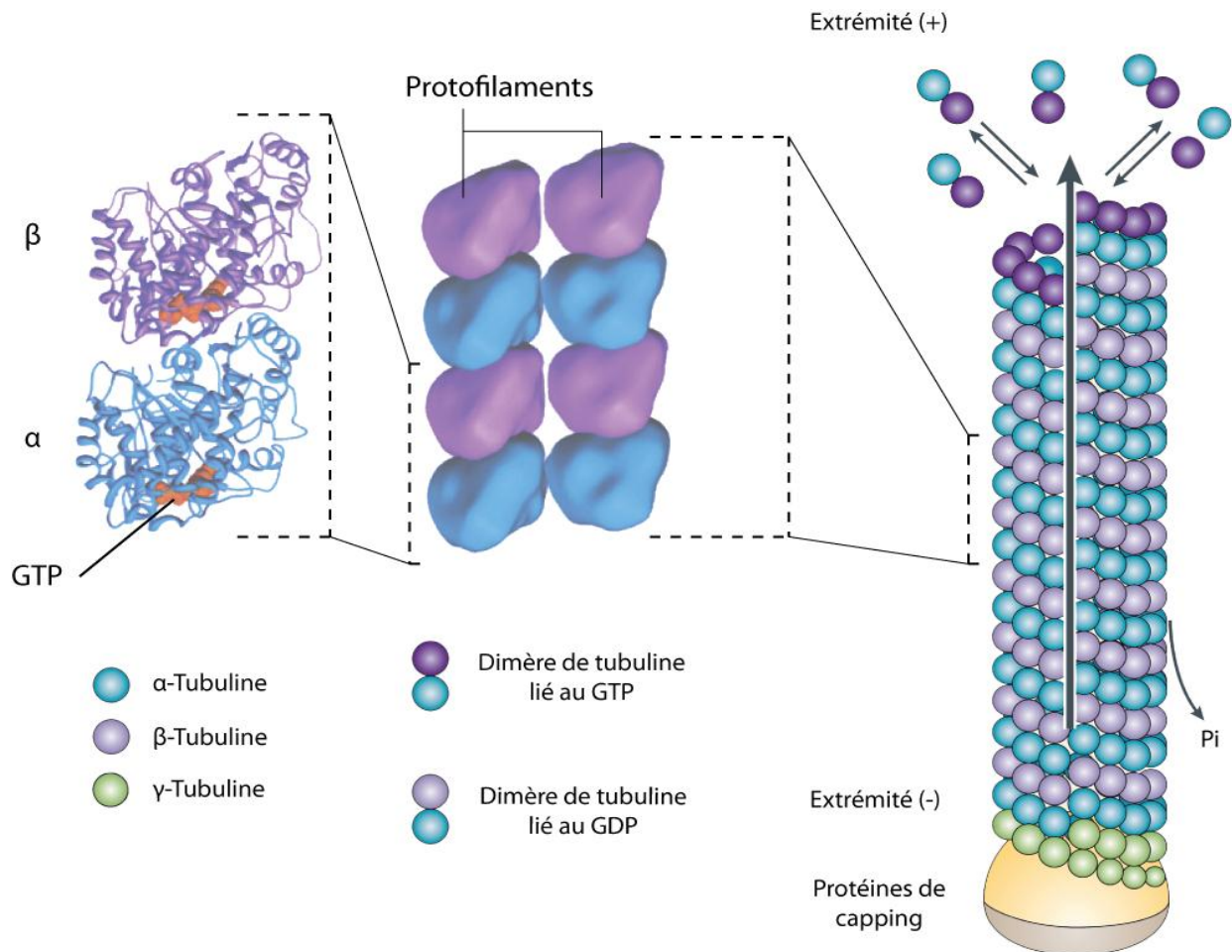


Figure 20 : Composition (à gauche) et représentation schématique (à droite) d'un MT en phase de polymérisation (adapté de : Conde et Cáceres, 2009).

4.2.2. Nucléation

La nucléation, phénomène permettant la formation des MT, se déroule dans le cytoplasme des cellules, au niveau des centrosomes qui vont permettre l'orientation des MT. La nucléation est possible grâce à un complexe protéique en anneau appelé γ -TuRC (γ -Tubulin Ring Complex) (Zheng et al., 1995). Ce complexe, d'un diamètre de 25 à 28 nm, est composé d'une dizaine de protéines dont la plus abondante est la γ tubuline, représentant environ 30 % de la masse du complexe (Job et al., 2003). La γ tubuline est très conservée chez les Eucaryotes (Stearns et al., 1991), et elle est localisée dans les MTOC et dans les complexes γ -TuRC libres dans le cytoplasme.

Les dimères libres d' $\alpha\beta$ tubuline se fixent sur le γ -TuRC, en interaction avec la γ tubuline qui va stabiliser le complexe avec les autres protéines de capping et former une structure en hélice. La formation de cette première couche de dimères $\alpha\beta$ tubuline va déterminer le nombre de protofilaments qui composeront le MT en formation. L'extrémité moins du MT se retrouve ancrée dans le MTOC, et la polymérisation du MT va commencer à l'extrémité plus.

4.2.3. Cycle de polymérisation/dépolymérisation

La phase de polymérisation des MT continue avec l'élongation et s'effectue par fixation à l'extrémité plus du MT de dimères de tubuline $\alpha\beta$ porteur de GTP sur leur site E, provoquant l'hydrolyse du GTP en GDP dans un second temps (Penningroth et Kirschner, 1977, Carlier et al., 1987). Cette hydrolyse se déroule dans le cœur du MT. Lorsque le MT est recouvert d'une coiffe de GTP à son extrémité plus, la tubuline peut polymériser et le MT peut croître, mais l'hydrolyse du GTP en GDP rend l'extrémité moins stable, pouvant stopper la polymérisation et provoquer la dépolymérisation avec libération des dimères de tubuline $\alpha\beta$ associés au GDP (Müller-Reichert et al., 1998). *In vitro*, il est possible de mesurer la polymérisation de la tubuline en MT en mesurant la turbidimétrie à 350 nm en spectrophotométrie. Cette polymérisation à partir de tubuline purifiée est possible en présence de GTP à 37°C (Swindell et al., 1991).

La dynamique des MT se déroule de deux manières différentes : la première consiste en un phénomène de « tapis roulant » ou « treadmilling », avec une extrémité plus en croissance et une extrémité moins stable ou en dépolymérisation. Ce phénomène se déroule notamment pendant la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes. Le second mécanisme est appelé « instabilité dynamique », avec de rapides changements entre des phases de croissance et des phases de régression des MT. Le passage d'une phase de polymérisation à une phase de dépolymérisation s'appelle une « catastrophe », et le phénomène inverse un « sauvetage » (**Figure 21**).

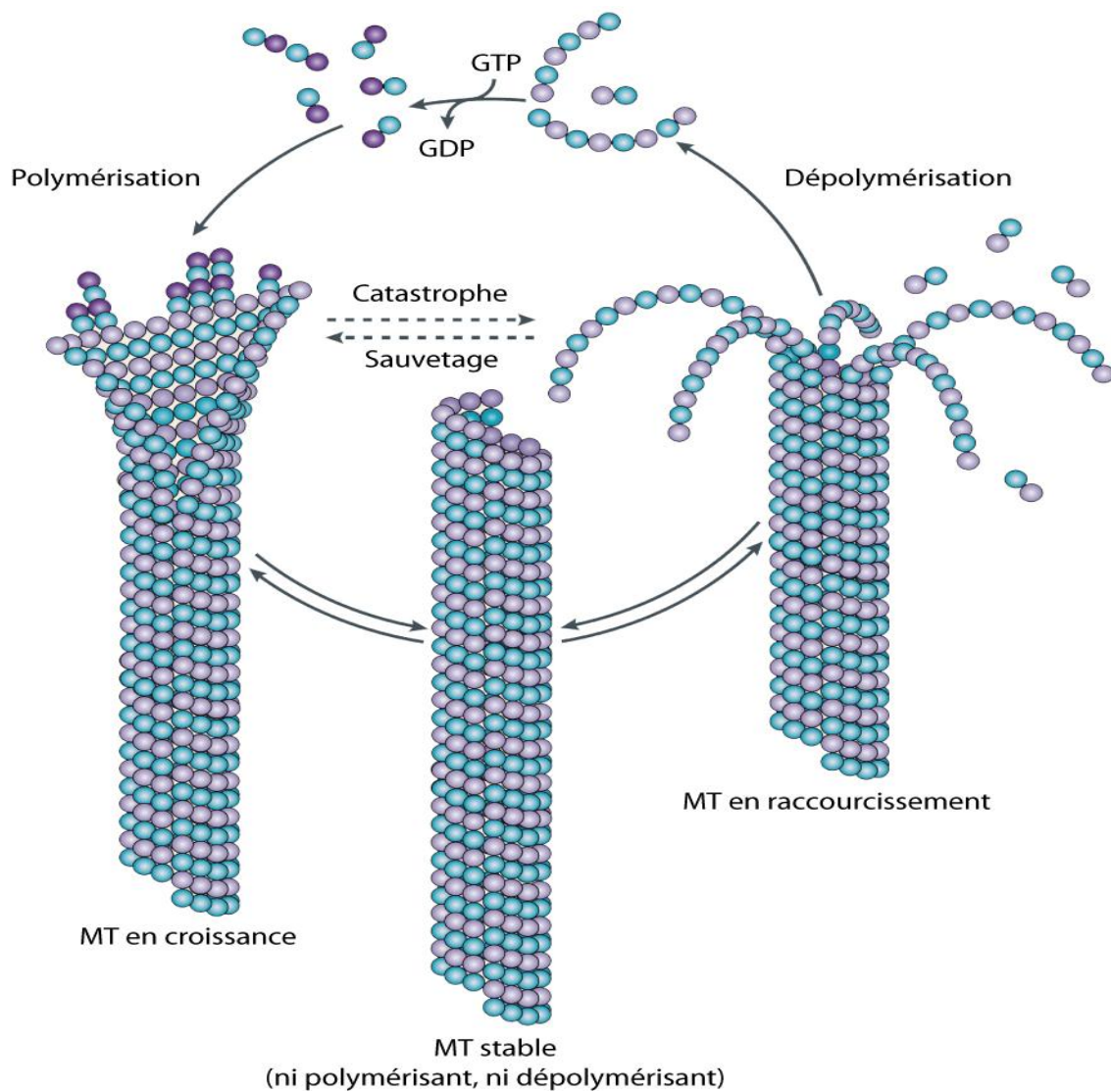


Figure 21 : Cycle de polymérisation et dépolymérisation des MT.

(source : Conde et Cáceres, 2009).

4.2.4. Fonctions des microtubules

De par leur architecture s'étendant dans tout le cytoplasme, les MT participent au maintien de la forme et de la polarité des cellules et à l'organisation cytoplasmique des différents organites. Ils permettent le transport de molécules, d'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) et de complexes protéiques (Müsch, 2004) pour les différents compartiments cellulaires, et participent aussi à l'endocytose et l'exocytose (Sanghavi et al., 2012).

Dans certaines cellules, les MT permettent la mobilité de la cellule ou de certaines parties de la cellule : ainsi, ils sont impliqués dans les mouvements des flagelles et des cils (Pease, 1963 ; Doolin et Birge, 1966).

Enfin, les MT sont indispensables à la formation du fuseau mitotique. Pendant la mitose, les MT vont se désassembler pour former un nouveau réseau permettant la migration des chromosomes. Les chromosomes vont se fixer sur les MT grâce à des complexes protéiques appelés kinétochores, puis vont se répartir de façon identique vers les deux cellules filles.

4.3. Protéines associées aux microtubules ou MAPs

Les protéines associées aux microtubules ou MAPs représentent une grande famille de protéines interagissant avec les MT et leur environnement. Suivant leur fonction, elles seront séparées en MAPs structurales lorsqu'elles participent à l'organisation tridimensionnelle des MT et en MAPs motrices pour la régulation du transport de molécules dans la cellule et pour la motilité cellulaire. De plus, la plupart des MAPs ne sont pas ubiquitaires, et ne sont pas forcément présentes à tout moment dans les cellules. Ici ne seront exposées que les principales MAPs.

4.3.1. Les MAPs structurales

Les MAPs structurales sont des protéines filamenteuses capables de se fixer aux MT de façon réversible avec une forte affinité. Ces MAPs sont séparées en différentes familles, dont les plus étudiées sont les familles MAP1A/1B et MAP2/Tau. Dans cette partie ne sera évoquée que les protéines de la famille MAP2/Tau.

La famille MAP2/Tau regroupe les protéines MAP2 et Tau, principalement présentes dans les neurones (respectivement dans les dendrites et dans les axones), et MAP4, absente des neurones mais présente notamment dans les cellules non-neuronales (Dehmelt et Halpain, 2004). L'expression de ces protéines peut varier suivant le développement embryonnaire : l'expression des différentes isoformes de MAP2 est faible dans les précurseurs neuronaux, puis augmente un jour après l'expression de la β III tubuline qui est neurone-spécifique (Menezes et Luskin, 1994). Ces MAPs favorisent la polymérisation de la tubuline, stabilisent les MT formés et servent de points de jonction entre les MT et leur environnement comme les filaments d'actine (Weingarten et al., 1975 ; Herzog et Weber, 1978 ; Roger et al., 2004). Il a été montré par Qiang et collaborateurs que la protéine Tau protégeait les MT de la dégradation par la katanine dans les axones des neurones et stabilisait leur structure (Qiang et al., 2006).

L'interaction entre ces MAPs et les MT est fortement dépendante de l'état de phosphorylation des MAPs (pour revue, voir Drewes et al., 1998). Par exemple, il a été montré que la phosphorylation de la sérine 262 de Tau réduisait fortement son interaction avec les MT (Biernat et al., 1993). MAP2 et Tau sont phosphorylés par de nombreuses kinases telles que la protéine kinase A (PKA) et la kinase régulant les affinités aux microtubules (Microtubule Affinity Regulating Kinase : MARK). La phosphorylation des MAPs va en général diminuer leur affinité pour les MT.

4.3.2. Les MAPs motrices

Les MAPs motrices sont divisées en deux superfamilles, les kinésines (KIFs) et les dynéines, qui participent au transport de différents organites et molécules le long des MT, ainsi qu'à la mitose. Ce transport est possible par hydrolyse d'ATP et conversion de cette énergie chimique en énergie cinétique, permettant les déplacements sur les MT. Classiquement, les neurones sont un bon modèle pour l'étude des mouvements des MAPs motrices le long de leur axone, en différenciant le transport antérograde (de l'extrémité « - » vers l'extrémité « + ») du transport rétrograde (de l'extrémité « + » vers l'extrémité « - ») (Hirokawa, 1994 ; Hirokawa, 1998).

La superfamille des kinésines ou KIFs regroupe plusieurs centaines de protéines (Lawrence et al., 2004 ; Hirokawa et Noda, 2008), possédant un domaine moteur où se fixe l'ATP qui peut se trouver soit à l'extrémité amino, soit à l'extrémité carboxy, soit au centre de la protéine, et des séquences consensus de fixation aux MT. Leur fonction est le transport antérograde des organites tels que les mitochondries, les vésicules de sécrétion et les macromolécules, mais aussi toutes les protéines impliquées dans la mitose et celles nécessaires à la séparation des centrosomes et des chromosomes (Boleti et al., 1996 ; Clark et al., 1997).

La superfamille des dynéines est composée de nombreuses protéines, servant à la mobilité des flagelles et des cils pour les dynéines axonémales et au transport rétrograde pour les dynéines cytoplasmiques. Elles contribuent également à la mitose, à la migration cellulaire et aux autres fonctions cellulaires basiques (Vallee et al., 2012). Comme pour les kinésines, la conversion d'ATP en ADP permet les mouvements des dynéines (Burgess et al., 2003).

4.4. Les microtubules comme cible des agents anticancéreux : les TBAs

Les MT étant des structures essentielles dans la division cellulaire notamment, ils ont été utilisés comme une cible pour les traitements anticancéreux. Ces composés naturels ciblant la tubuline sont appelés « agents ciblant la tubuline » ou TBAs (Tubulin-Binding Agents) et, de par leurs propriétés anti-mitotiques, sont utilisés en thérapie anti-cancéreuse avec d'autres molécules (**Tableau 4**). Ces TBAs se distinguent en deux catégories, ceux stabilisant les MT, et ceux favorisant leur dépolymérisation (**Figure 22**).

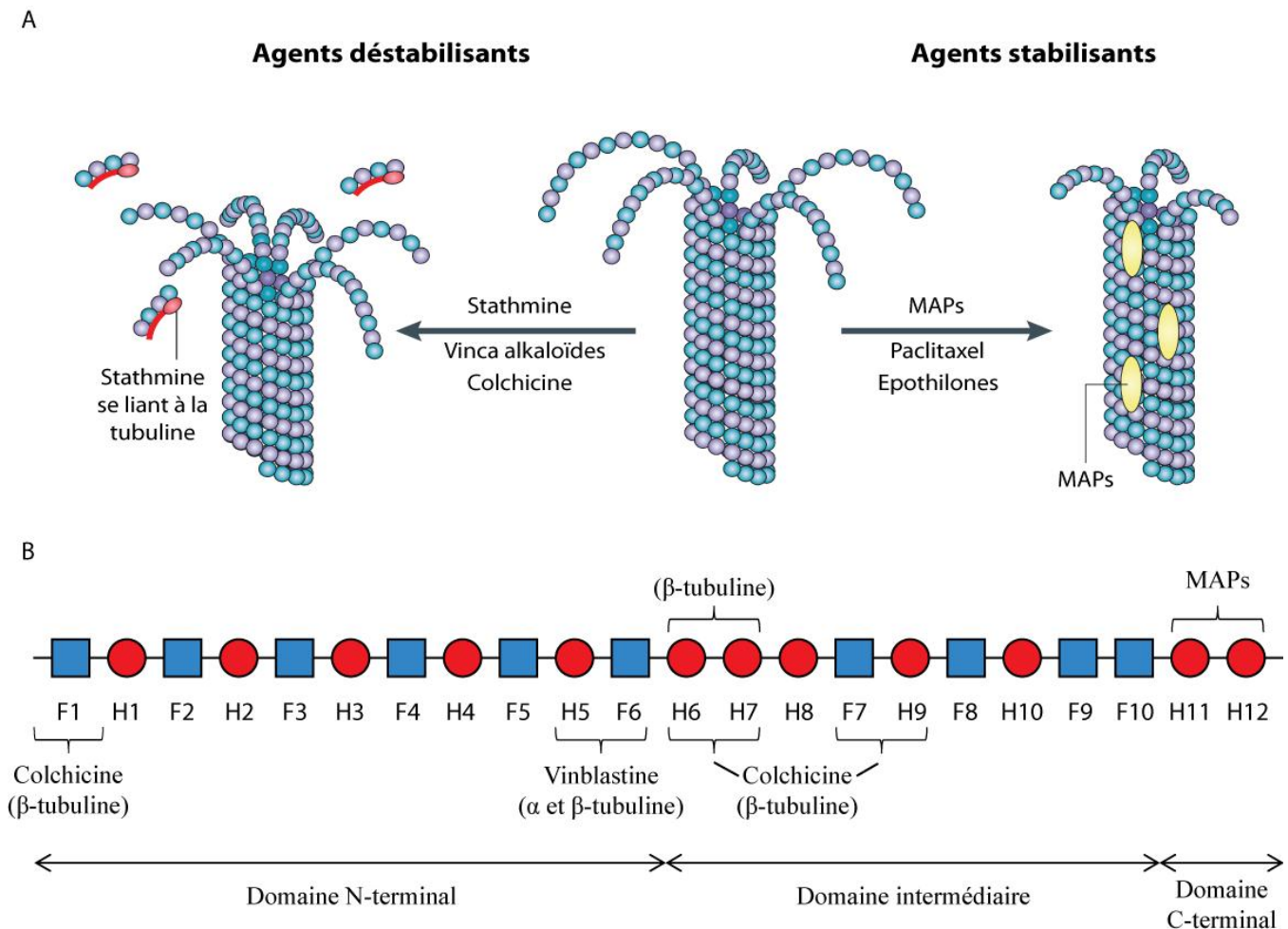


Figure 22 : Effets (A) et sites d'action (B) des TBAs et des protéines sur la stabilité des MT

F : Feuillet β ; H : Hélice α (adapté de Kavallaris, 2010)

Tableau 4 : Les principaux agents ciblant la tubuline

Composés	Origine	Site de fixation	Effets	Utilisation en cancérologie	Références
Taxanes	Ils <i>Taxus</i>	Domaine "taxane" sur la β -tubuline	Stabilisation des MT	Paclitaxel et Docétaxel sont utilisés en traitement dans de nombreux types de cancers : sein, ovaire, prostate...	Wani et al., 1971
Epothilones	Myxobactérie <i>Sorangium cellulosum</i>	Domaine "taxane" sur la β -tubuline	Stabilisation des MT	Plusieurs essais cliniques contre les tumeurs ovariennes, du colon, de la prostate...	Bollag et al., 1995
Laulimalide	Eponge marine <i>Cacospongia mycofijiensis</i>	Proche de l'interface entre les deux sous-unités α et β , au-dessus du domaine "colchicine"	Stabilisation des MT	Efficacité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur la lignée de cancer colorectal humain HCT-116	Mooberry et al., 1999 Bennett et al., 2010
Peloruside A	Eponge marine <i>Mycale hentscheli</i>	Proche de l'interface entre les deux sous-unités α et β , au-dessus du domaine "colchicine"	Stabilisation des MT	Phase de développement préclinique	West et al., 2000 Nguyen et al., 2010
Discodermolide	Eponge marine <i>Discodermia dissoluta</i>	Domaine "taxane" sur la β -tubuline, mais orientation différente par rapport au Taxol	Stabilisation des MT	Efficacité sur les tumeurs solides et résistantes au Taxol	Ter Haar et al., 1996 Khrapunovich-Baine et al., 2009
Eleuthérobine	Corail <i>Eleutherobia</i>	Domaine "taxane" sur la β -tubuline	Stabilisation des MT	Rareté du produit par rapport à son origine. Synthèse chimique en développement.	Long et al., 1998
Vinca-alkaloïdes	Pervenches <i>Vinca</i>	Domaine "vinca" sur la β -tubuline	Inhibition de la polymérisation des MT	Vinblastine, vincristine, vindésine : utilisation en traitement dans de nombreux types de cancers : poumon, sein, lymphomes, neuroblastome...	Cutts et al., 1960 Warwick et al., 1960
Maytansine	Arbre <i>Maytenus</i>	Partiellement sur le domaine "vinca" sur la β -tubuline	Inhibition de la polymérisation des MT	Dérivés utilisés en combinaison avec un anticorps monoclonal : Bivatuzumab mertansine, Cantuzumab mertansine...	Remillard et al., 1975
Rhizoxine	Champignon <i>Rhizopus microsporus</i>	Partiellement sur le domaine "vinca" sur la β -tubuline	Inhibition de la polymérisation des MT	Essais cliniques sur des tumeurs ovariennes, rénales et colorectales. Effets secondaires très importants.	Takahashi et al., 1987 Tsuruo et al., 1986
Halichondrine B	Eponge marine <i>Halichondria okadai</i>	Domaine "vinca" sur la β -tubuline	Inhibition de la polymérisation des MT	L'Halaven, dérivé de l'halichondrine B, a reçu un avis favorable début 2011 pour le traitement du cancer du sein.	Bai et al., 1991
Colchicine	Colchiques <i>Colchicum</i>	Domaine "colchicine" sur la β -tubuline	Inhibition de la polymérisation des MT	Effets secondaires très importants, des dérivés semi-synthétiques sont actuellement testés.	Brues et Cohen, 1936
Combretastatines	Arbre <i>Combretum caffrum</i>	Domaine "colchicine" sur la β -tubuline	Inhibition de la polymérisation des MT	Essais cliniques en cours pour les dérivés, en traitement de cancers du poumon, de la prostate et de carcinomes.	Hamel et Lin, 1983
2-méthoxyoestradiol	Métabolite naturel de l'oestradiol	Domaine "colchicine" sur la β -tubuline	Inhibition de la polymérisation des MT	Essais cliniques en cours pour le traitement de carcinomes rénaux.	D'Amato et al., 1994 Bruce et al., 2012
Chalcones	Synthèse chimique	Domaine "colchicine" sur la β -tubuline	Inhibition de la polymérisation des MT	Efficacité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur des lignées de cancer du sein.	Peyrot et al., 1989 Edwards et al., 1990
Stathmine ou Op18	Protéine	Fixation de deux dimères de tubuline libres en un complexe courbé	Inhibition de la polymérisation des MT	Peut servir de marqueur de risque suivant son expression dans le cancer de l'endomètre.	Belmont et Mitchison, 1996 Trovik et al., 2011

4.4.1. Agents stabilisants

Les agents qui vont stabiliser les MT agissent sur un site précis appelé « site taxane ». La famille la plus connue est celle des Taxanes, qui regroupe le Paclitaxel (Taxol) et le Docétaxel (Taxotère), ainsi que leurs dérivés. Ces molécules agissent en se fixant sur la sous-unité β de la tubuline, et change la conformation du site de fixation du GDP pour le rendre plus stable pour le GTP. En stabilisant les protofilaments, les MT vont rentrer dans une phase de sur-polymérisation qui va entraîner la mort de la cellule par apoptose (Morris et Fournier, 2008). Les taxanes sont principalement utilisés dans le traitement des tumeurs solides telles que les tumeurs du sein, des ovaires, gastro-œsophagiennes et de la prostate.

Les Epothilones représentent une nouvelle famille de molécules perturbant les MT, agissant sur un site proche du site des taxanes, et par un mécanisme distinct du Paclitaxel, les rendant efficaces sur des lignées résistantes au Paclitaxel (Kowalski et al., 1997). La Patupilone est un dérivé naturel de l'Epothilone B qui s'est montré 20 fois plus efficace que le Paclitaxel, avec des effets secondaires relativement atténués (Goodin et al., 2004 ; Pagano et al., 2012). Sa meilleure efficacité par rapport au Paclitaxel viendrait d'une sensibilité moindre à la surexpression de la glycoprotéine P, responsable du reflux du Paclitaxel dans certaines cellules tumorales. L'Ixabepilone, dérivée de l'Epothilone B, s'est également révélée plus toxique que le Paclitaxel, mais avec des effets moins importants que ceux de la Patupilone, tout comme les dérivés synthétiques de l'Epothilone B et de l'Epothilone D. Plusieurs de ces molécules sont testées actuellement en phase clinique.

D'autres agents stabilisants, moins étudiés que les précédents, présentent quelques variations. Ainsi, la Laulimalide va se fixer sur la sous-unité α de la tubuline avec des effets similaires au Paclitaxel (Mooberry et al., 1999 ; Bennett et al., 2010). La Peloruside A, présentant des similarités structurelles avec les Epothilones, se fixe également sur la sous-unité α de la tubuline (West et al., 2000 ; Nguyen et al., 2010). Ces deux molécules, dont le site de fixation diffère du Paclitaxel, peuvent être utilisées avec celui-ci. La Discodermolide et la Dictyostatine présentent des effets proches de ceux du Paclitaxel avec une localisation différente, mais sont plus efficaces sur les cellules surexprimant la tubuline β III (Madiraju et al., 2005).

4.4.2. Agents déstabilisants

La seconde catégorie d'agents anti-microtubules est composée des drogues dépolymérisantes se fixant sur deux sites : le domaine « vinca » et le domaine « colchicine ». A de fortes concentrations, ces agents déstabilisent la structure des MT, mais à des concentrations thérapeutiques, ils vont inhiber la dynamique des MT et réduire la polymérisation, bloquant ainsi la division cellulaire et pouvant conduire à l'apoptose.

Le domaine « vinca » de la tubuline fixe une famille très hétéroclite de composés. Les principaux membres sont les vinca alkaloïdes, issus de la pervenche, dont les premières molécules furent isolées dès les années 50, et les premiers effets anti-tumoraux découverts en 1960 pour la Vincaléukoblastine également appelée Vinblastine (Cutts et al., 1960 ; Warwick et al., 1960). Les membres de cette famille, lorsqu'ils sont présents à de faibles doses, agissent en se fixant sur la sous-unité β de la tubuline, près du site de fixation du GTP à l'extrémité + des MT, altérant la conformation du dimère α - β et inhibant l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui arrête la croissance des MT et provoque un arrêt de la mitose (Toso et al., 1993). A de fortes concentrations, les vinca alkaloïdes ont une affinité pour les hétérodimères libres de tubuline, provoquant la formation de cristaux, de spirales ou de pseudo-tubules de tubuline.

Les vinca alkaloïdes de première génération, Vinblastine et Vincristine (Johnson et al., 1963), d'origine naturelle, sont à différencier de ceux de seconde génération, semi-synthétiques, telles que la Vindésine (Bayssas et al., 1980), la Vinorelbine (ou Navelbine) (Maral et al., 1984) et la Vinflunine (Kruczynski et al., 1998), et qui présentent une meilleure efficacité que les précédents. D'autres molécules déstabilisantes se fixent sur le domaine « vinca » ou partiellement sur ce site, telles que les Maytansinoides et la Rhizoxine, et peuvent rentrer en compétition avec les vinca alkaloïdes, avec des efficacités variables suivant le type de cellules tumorales et les concentrations utilisées.

Le domaine « colchicine » se situe à l'interface entre les deux sous-unités α et β du dimère de tubuline, proche du site de fixation du GTP de la sous-unité α (**Figure 22**). La Colchicine fixe les dimères de tubuline libre de façon réversible avant d'induire un changement de conformation de celui-ci et de former un complexe tubuline-colchicine presque irréversible. La Colchicine et ses analogues inhibent la croissance des MT à faibles doses et dépolymérisent les MT à fortes concentrations (Hastie, 1991 ; Skoufias et Wilson, 1992).

Parmi les autres familles de molécules les plus étudiées se fixant au domaine « colchicine » se trouvent les Combretastatines, le 2-méthoxyoestradiol et les Chalcones agissant de manière similaire sur les dimères de tubulines et pouvant rentrer en compétition avec la Colchicine. Certaines de ces molécules sont actuellement testées en phase clinique, comme la Combretastatin-A4-phosphate (Ng et al., 2011) et le 2-méthoxyoestradiol (Kulke et al., 2011).

La Stathmine, également appelée oncoprotéine 18 (Op18), est une petite protéine (19 kDa) très exprimée dans les cellules leucémiques. Une molécule de Stathmine interagit avec deux dimères de tubuline libres dans un arrangement tête-à-queue des deux dimères de tubuline, le domaine stathmine formant une longue hélice α reliant les deux (**Figure 23**). La fixation de la Stathmine donne un complexe courbé qui va empêcher la tubuline de former des MT en diminuant la réserve de tubuline libre, et favoriser la catastrophe (Belmont et Mitchison, 1996). Il a été également montré que la Stathmine était capable de favoriser la catastrophe des MT à l'extrémité négative (Manna et al., 2006).

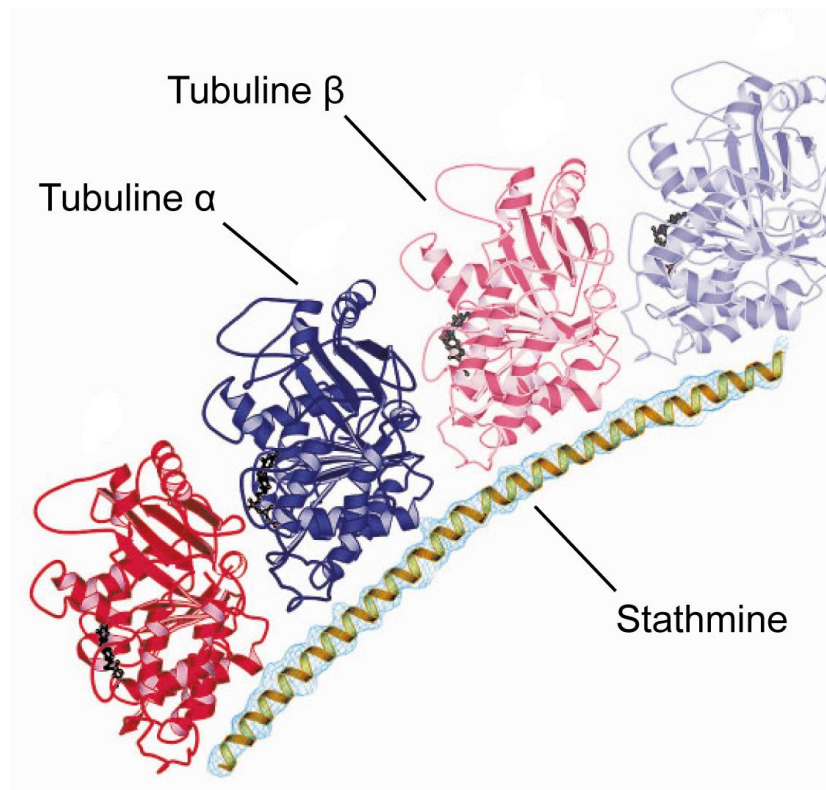


Figure 23 : Fixation de la stathmine sur les dimères de tubuline

(source : www.esrf.fr)

4.4.3. MAPs et résistance aux agents anticancéreux

L'augmentation de l'expression des MAPs stabilisant les MT peut être associée à une résistance ou à une augmentation de la sensibilité aux TBAs. Par exemple, la forte expression de Tau dans les cancers du sein est associée à une réponse moins importante au Paclitaxel, expliquée par un encombrement stérique de Tau empêchant le paclitaxel de se fixer sur ces sites (Rouzier et al., 2005). A l'inverse, une lignée cellulaire de neuroblastome sélectionnée pour être résistante à la vincristine est associée à la sous-expression de MAP2c provoquant une résistance aux agents déstabilisants : l'équilibre des MT est déplacé vers une hyperstabilité, contrant les effets de ces agents (Don et al., 2004).

Il a été montré que l'expression de MAP4 est régulée par p53, protéine connue pour la suppression de tumeur par induction de l'apoptose (Murphy et al., 1996). La répression du gène de MAP4 réduit la stabilité des MT et diminue la sensibilité au paclitaxel mais augmente la sensibilité à la vinblastine (Zhang et al., 1999). Inversement, l'inactivation de p53 augmente l'expression de MAP4.

La stathmine est une protéine nécessaire à la progression de la mitose dans de nombreux types cellulaires. Le gène de la stathmine, *STMN1*, est surexprimé dans de nombreux cancers solides et hématologiques, tels que les leucémies, les lymphomes, les neuroblastomes, les cancers ovariens, de la prostate, du sein, du poumon et du mésothélium (Rana et al., 2008). Cette propriété fait d'elle une cible intéressante en thérapie : son inhibition augmente la sensibilité de plusieurs cancers aux TBAs (Alli et al., 2007).

4.5. Interaction entre microtubules et filaments intermédiaires : les sites TBS

Les travaux du laboratoire portent en partie sur l'étude des relations entre les différents éléments du cytosquelette, notamment entre les microtubules et les filaments intermédiaires. Les travaux menés par Bocquet et collaborateurs ont permis de mettre en évidence des sites de fixation pour la tubuline sur différentes protéines des FI (Bocquet et al., 2009). Ces sites, appelés Tubulin-Binding Sites ou TBS, ont été identifiés sur la kératine, la vimentine, les 3 sous-unités des NF, la GFAP et la desmine. La tubuline, lorsqu'elle n'est pas sous forme de MT dans les cellules, interagit au niveau de ces séquences sur les FI qui représentent des réservoirs de tubuline libre (**Figure 24**).

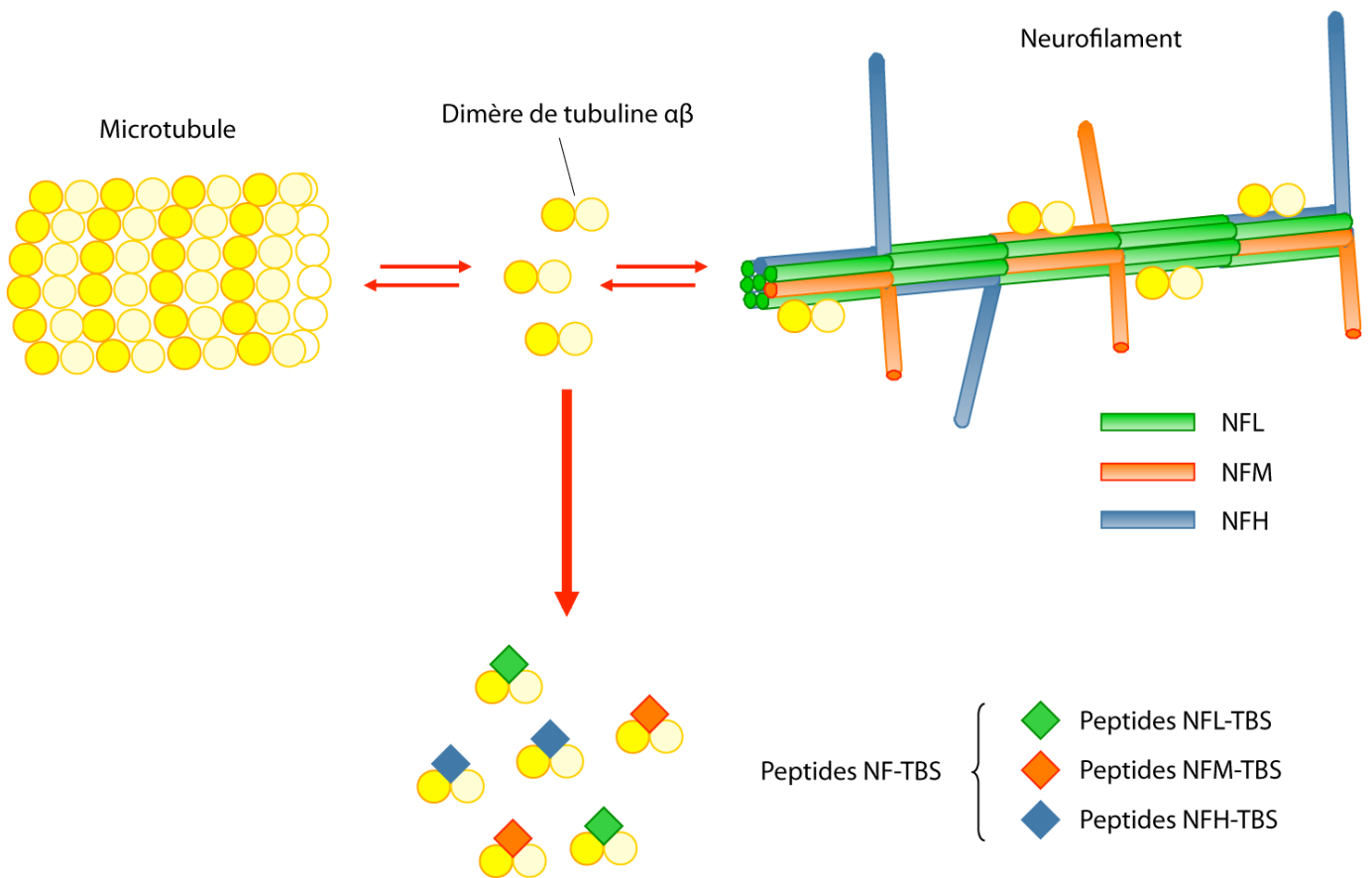


Figure 24 : Les neurofilaments comme réservoir de tubuline libre.

Différents peptides ont été synthétisés à partir de ces séquences. Certains sont capables de fixer la tubuline et d'inhiber *in vitro* la polymérisation de la tubuline en MT de façon dose-dépendante (**Figure 24**). Les peptides NFL-TBS.40-63 et Ker-TBS.1-24 sont capables de rentrer dans une lignée humaine de glioblastome (T98G) et d'affecter le réseau de MT de ces cellules, en formant des agrégats de peptide et de tubuline dépolymérisée. Les cellules T98G traitées avec ces peptides prolifèrent moins et ont tendance à s'arrêter en phase G1 du cycle cellulaire. Les propriétés des peptides NFL-TBS.40-63 et Vim-TBS.58-81 seront développées dans la partie Résultats de ce manuscrit, à travers les articles de Berges et al., 2012 et Balzeau et al., 2012. Ces peptides font l'objet d'un brevet déposé et présent en **Annexe 3**.

Chapitre 3 : Nouvelles voies de délivrance des médicaments contre les cancers

La recherche médicale a fait des progrès immenses dans les domaines d'imagerie, de diagnostic, de traitement des maladies et d'amélioration de la qualité de vie des patients. Ces progrès sont particulièrement visibles dans le domaine de la cancérologie, où le dépistage et la prise en charge des cancers se fait de plus en plus précocement. Mais l'efficacité de nombreux agents anticancéreux est limitée par la faible pénétration dans les tissus cibles et par leurs effets sur les cellules saines, ce qui limite la dose injectée. Certaines cellules développent des mécanismes de résistance pour ces agents, les rendant inefficaces. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux moyens pour traiter ces maladies, soit en trouvant ou en synthétisant de nouvelles molécules (« drug design »), soit en améliorant la libération des molécules actives, en les protégeant de l'environnement extérieur et en les guidant vers les cellules cibles.

Le développement des nanotechnologies dans le domaine médical est un domaine en plein essor, avec le développement de nanoparticules. Leurs buts sont d'emprisonner des principes actifs (PA) pour les protéger de la dégradation par leur environnement extérieur, et de cibler certaines cellules pour les rendre visibles par les différentes techniques d'imagerie médicale ou pour les détruire spécifiquement. Une autre voie d'étude porte sur les peptides pénétrant les cellules (CPP), utilisés pour le ciblage des cellules ou de certains organites intracellulaires. Dans ce chapitre seront évoquées ces deux catégories de vecteurs, principalement dans le domaine de la cancérologie.

1. Les nanovecteurs

1.1. Définition

Les nanovecteurs ou nanoparticules au sens large (NP) sont par définition des vecteurs dont la taille est comprise entre 1 et 1000 nm, mais la plupart d'entre eux sont inférieurs à 300 nm. Il existe de nombreux types de NP utilisés en nanomédecine, variant suivant la forme, la structure ou la composition. (**Figure 25**).

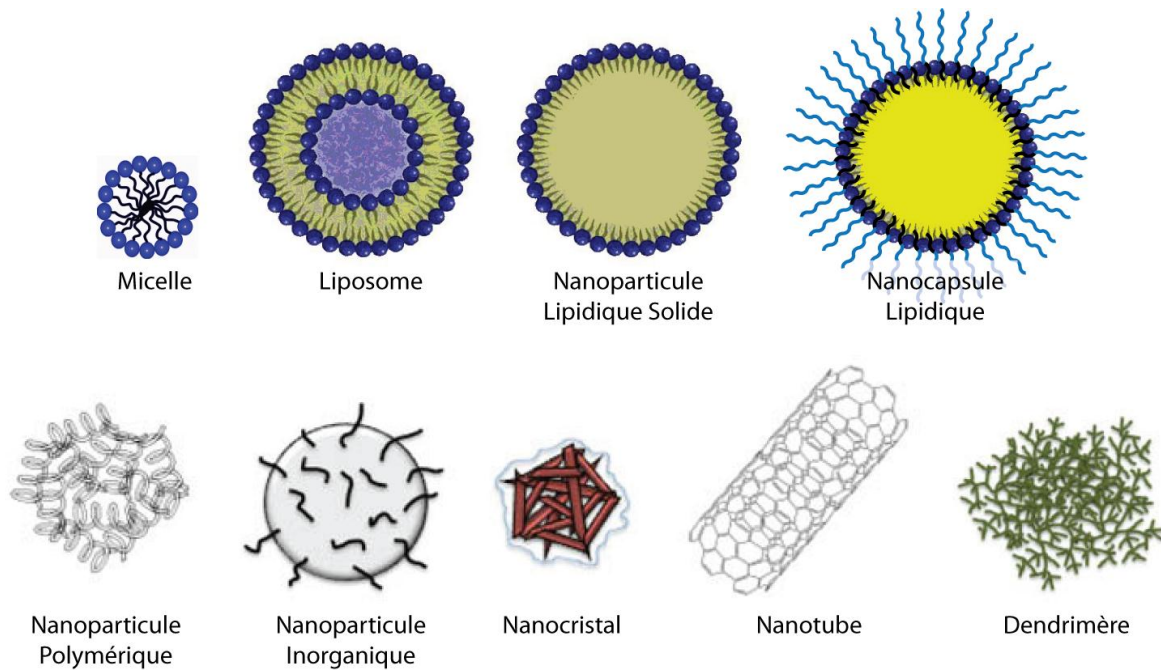


Figure 25 : Les différents types de nanovecteurs (adapté de Faraji et Wipf, 2009)

1.1.1. Micelles

Les micelles sont les premiers nanoobjets à avoir été décrits, dont la taille est généralement comprise entre 5 et 100 nm. Ils se forment spontanément lorsque les molécules amphiphiles sont dans des concentrations suffisantes en solution aqueuse, en donnant des nanostructures avec un cœur hydrophobe et une coque hydrophile (Torchilin, 2007). Grâce à cette structure, les micelles représentent un outil intéressant pour délivrer des composés peu solubles dans l'eau et lipophiles.

De nombreux agents anticancéreux ont été incorporés dans des micelles et testés pour différents types de cancer, tel que le Paclitaxel, la Doxorubicine, le Cisplatine et l'Irinotécan (pour revue, voir Oerlemans et al., 2010). Dans le cas des gliomes, la barrière hémato-encéphalique, limitant la pénétration des agents anticancéreux seuls, peut être traversée par des micelles qui peuvent alors atteindre les cellules cancéreuses. Le Paclitaxel, molécule lipophile, a été incorporé dans des micelles et testé sur des lignées de gliome de rat C6 (Xie et al., 2007). Ces micelles ont ensuite été fonctionnalisées avec différentes molécules afin d'en augmenter l'incorporation dans les cellules *in vitro* et *in vivo* (Zhang et al., 2012). Les études actuelles portent sur la fonctionnalisation de ces micelles, afin d'améliorer encore la libération des agents d'intérêt.

1.1.2. Liposomes

Les liposomes sont des vésicules composées d'une double couche de phospholipides entourant un cœur aqueux, avec une taille de l'ordre de 100 nm, pouvant atteindre quelques microns. Leur nature amphiphile leur permet de pouvoir transporter des molécules hydrophiles dans leur cœur, ou des composés hydrophobes dans la bicouche lipidique, et même des molécules amphiphiles entre les deux. Leur surface, facilement modifiable, les rend biocompatibles et permet leur circulation dans l'organisme sans toxicité. Ils sont utilisés dans le domaine médical, mais aussi en cosmétique depuis près de 30 ans.

Leur potentiel de transporteur d'agents thérapeutiques en cancérologie remonte aux années 1970 : Gregoriadis et collaborateurs ont injecté en intraveineux ou en intra-artériel chez trois patients atteints de différents cancers des liposomes chargés avec de l'albumine marquées à l'Iode 131 (^{131}I). Ces liposomes ont été pour la plupart incorporés par le foie, mais aussi dans les tissus tumoraux, et ont pu être observés par microscopie électronique dans les cellules (Gregoriadis et al., 1974). Depuis, beaucoup d'autres molécules ont été piégées dans des liposomes, comme par exemple du Rhénium 188 (^{188}Re) pour de la radiothérapie interne (Phillips et al., 2012) ou de la Doxorubicine (Yang et al., 2012) dans le cadre du traitement des gliomes.

1.1.3. Les nanoparticules lipidiques solides

Les NP lipidiques solides, alternatives aux liposomes et émulsions, sont plus stables dans les systèmes biologiques grâce à une coque solide composée d'une couche de phospholipides entourant un cœur de lipides hydrophobiques solides à température biologique. Elles sont biocompatibles, biodégradables, peu toxiques, et utilisées dans les traitements par voie orale ou par inhalation.

Des NP lipidiques solides cationiques couplées à des siRNA se sont montrées très intéressantes dans le traitement de souris dans lesquelles ont été préalablement implantées en intracrânien des cellules de glioblastome humain U87-MG. Une réduction du volume des tumeurs et une accumulation de ces NP au niveau de la tumeur après une injection intraveineuse a été observée (Jin et al., 2011). Cette étude montre l'intérêt de ce type de nanovecteurs pour la délivrance de siRNA *in vivo* et dans le cerveau en particulier.

1.1.4. Les nanoparticules inorganiques

Les NP inorganiques sont composées d'éléments inorganiques tels que la silice ou des métaux (oxydes, sulfides...) (Trikalitis et al., 2001 ; Zou et al., 2005). Ces NP inorganiques sont très nombreuses et différentes suivant leur taille, leur surface et leur porosité. Elles sont principalement utilisées comme réservoir pour les NP basées sur de la silice, ou comme agent de contraste pour les NP métalliques.

Il existe également des NP regroupant les fonctions de protection d'anticancéreux et d'imagerie IRM : les NP développées par Ling et collaborateurs sont composées d'un noyau superparamagnétique d'oxyde de fer (SPIO) entouré d'une couche d'acide polylactique glycolique (PLGA) /Témozolomide et d'une coque rigide de Tween (Ling et al., 2012). Ces NP, à mi-chemin entre les NP inorganiques et les NP polymériques, ont été testées sur des cellules de gliome de rat C6 et ont montré des effets cytotoxiques. De plus, par leur incorporation dans les cellules, elles peuvent être détectées par IRM.

Les SPIO peuvent également servir de traceur pour des vecteurs adénoviraux en thérapie génique (Yun et al., 2012). Ce couplage, sans modifier les propriétés de transduction du vecteur viral ciblant les cellules de gliome, permet de suivre les particules en IRM *in vivo*.

1.1.5. Les nanoparticules polymériques

Les NP polymériques sont des particules biodégradables et biocompatibles, et représentent actuellement les outils les plus utilisés en nanomédecine. La possibilité de modifier leur surface en y greffant des protéines, le suivi pharmacocinétique contrôlé et leurs propriétés chimiques permettant de relarguer de nombreux agents différents les rendent très attractives. Les composés les plus utilisés sont les gélatines, le chitosan, et les copolymères d'acide polylactique (PLA), d'acide polylactique glycolique (PLGA) ou de polyéthylène glycol (PEG), la plupart approuvés par la Food and Drug Administration.

Il a été montré que les NP polymériques traversent la barrière hémato-encéphalique et délivrent les agents d'intérêt dans les cellules de gliome de par leurs caractéristiques membranaires. Des NP modifiées avec le peptide g7 (heptapeptide glycosylé H2N-Gly-L-Phe-D-Thr-Gly-L-Phe-L-Leu-L-Ser(O-β-D-Glucose)-CONH2) sont capables de traverser cette

barrière chez le rat à des temps très courts après une injection intraveineuse et d'aller se localiser dans toutes les régions du cerveau (Tosi et al., 2007). Cette capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique représente une aide précieuse pour le traitement des gliomes, mais aussi pour d'autres maladies touchant le cerveau.

1.1.6. Les dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules formées à partir de monomères tels que le poly(amidoamine) qui s'associent sous une forme arborescente à partir d'un cœur (Gingras et al., 2007). Les agents piégés dans les dendrimères peuvent soit sortir spontanément par changement du pH par exemple, soit les dendrimères vont se casser pour les libérer de leur cœur, soit les dendrimères seront clivés chimiquement, permettant le relargage de l'agent greffé au préalable sur les dendrimères.

Plusieurs molécules différentes peuvent être greffées en même temps sur un dendrimère. Li et collaborateurs ont ainsi synthétisé un vecteur sensible au pH composé d'un dendrimère poly(amidoamine) (G4), de Doxorubicine, de PEG, et de Transferrine pour augmenter l'entrée dans les cellules tumorales surexprimant le récepteur à la Transferrine, et de Tamoxifène (G4-DOX-PEG-Tf-TAM). Ce vecteur s'est révélé capable de limiter l'élimination rapide par les reins, de s'accumuler dans les tissus tumoraux et d'inhiber la prolifération de cellules de gliome de rat C6 (Li et al., 2012). Ces dendrimères représentent un type de vecteur capable d'empêcher l'effet toxique non spécifique des drogues anticancéreuses.

1.1.7. Les nanocristaux et les nanotubes

Les nanocristaux sont des grains nanométriques de matériaux semi-conducteurs entourés par une fine couche de surfactant. Peu utilisés pour transporter les agents anticancéreux, ils sont surtout connus grâce aux Quantum Dots (QDots) en imagerie à fluorescence. Ces QDots sont des nanocristaux semiconducteurs dont la taille varie entre 5 et 20 nm en moyenne qui, une fois excités par une lampe UV et suivant leur taille, vont émettre une fluorescence à une longueur d'onde précise. Ils peuvent être couplés à de nombreuses

molécules (streptavidine, biotine...) et sont peu sensibles au photoblanchiment, à la différence des molécules fluorescentes classiques.

Les nanotubes de carbone sont des feuillets d'atomes qui s'assemblent spontanément en tube. De nature organique ou inorganique, en simple ou en plusieurs couches, ils ne sont pour l'instant pas utilisés en nanomédecine à cause de problèmes de toxicité cellulaire.

1.2. Les nanocapsules lipidiques

1.2.1. Définition et composition

Les LNC décrites ici ont été inventées par l'équipe INSERM UMR 1066 dirigée par le Pr. Jean-Pierre Benoit. Le brevet initial contient le principe de la formulation avec différents exemples de molécules encapsulées (Brevet de P. Saulnier, J-P. Benoit et N. Anton (FR PCT/FR2008/051043; WO2009/0042141). Ces nanocapsules sont définies comme ayant un cœur lipidique liquide et une écorce lipidique solide, dont la taille est comprise entre 20 et 100 nm, et chargées avec au moins un produit actif pouvant être un agent anticancéreux ou un fluorochrome (**Figure 26**).

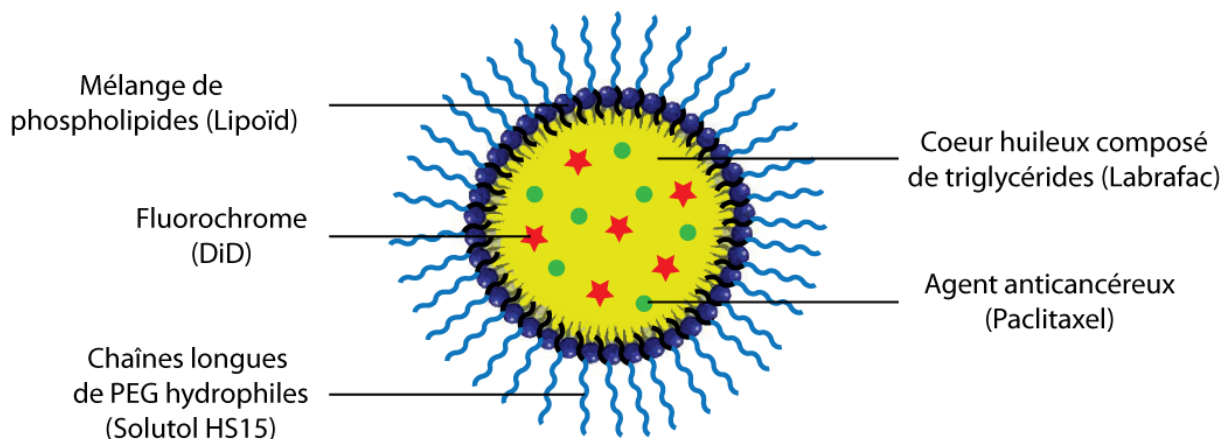


Figure 26 : Composition des nanocapsules lipidiques

Le cœur huileux des LNC est composé de triglycérides à chaînes moyennes sous forme liquide à température physiologique et commercialisés sous le nom de Labrafac WL 1349 (Gattefossé, France).

La coque lipidique solide est composée de lécithine de soja. Ce tensioactif lipophile est un mélange de phospholipides avec environ 69% de phosphatidylcholine et 9% de phosphatidyléthanolamine (Lipoïd S75-3, Lipoïd GmbH, Allemagne), solide à température ambiante.

Le tensioactif hydrophile, thermosensible et non ionique, se place à l'interface phase huileuse/phase aqueuse, afin de stabiliser les gouttelettes lipidiques. Ici, il s'agit d'un 2-hydroxystéarate polyéthylène glycol (PEG-HS) commercialisé sous le nom de Solutol HS15 (BASF, Allemagne) et qui est constitué d'un mélange de PEG 660 libres et de PEG 660 hydroxystéarates.

Enfin, dans le cœur lipidique peuvent être incorporés différents composés lipophiles comme des agents anticancéreux tels que le Paclitaxel ou la Carmustine, ou des marqueurs fluorescents comme le DiD (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3',3'-Tetramethylindo-dicarbocyanine) qui est un fluorochrome proche infrarouge dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 644 nm et 665 nm.

1.2.2. Formulation

Le principe de la formulation consiste à former une microémulsion par inversion de phase en température, à partir d'une émulsion huile dans eau (**Figure 27**). Le procédé décrit ci-dessous est tiré de Heurtault et al., 2002.

Les différents composés sont pesés suivant les quantités présentes dans le **Tableau 5**. Suivant leur composition, trois tailles de LNC peuvent être fabriquées : 20, 50 et 100 nm.

Tableau 5 : Composition des différents types de LNC

Constituants	Quantité en mg		
	LNC 20 nm	LNC 50 nm	LNC 100 nm
Solutol HS15	1934	846	484
Lipoïd 75-3	75	75	75
NaCl	89	89	89
Labrafac WL 1349	846	1028	1209
Eau distillée	2055	2962	3143

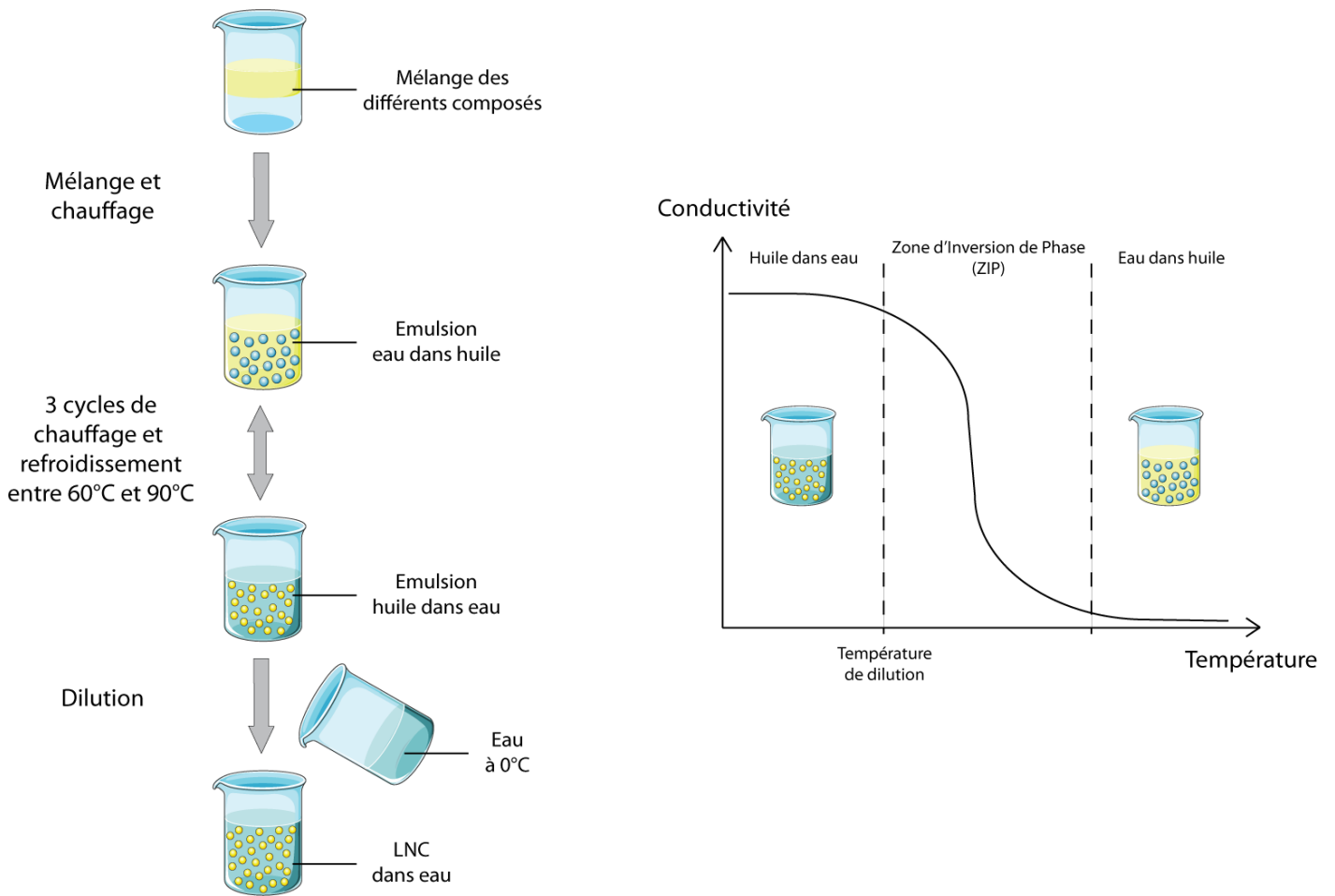


Figure 27 : Préparation des LNC (d'après Heurtault et al., 2002)

Les différents constituants des LNC sont mélangés sous agitation magnétique à température ambiante pendant 5 minutes, puis le mélange est chauffé à 60°C pour permettre une solubilisation totale. Le mélange subit trois cycles de chauffage et refroidissement entre 60°C et 90°C, au cours desquels la zone d'inversion de phase est visible entre 75°C et 78°C. En-dessous de cette température, il se forme une émulsion eau dans huile de couleur claire, presque transparente. Au-dessus de cette zone, l'émulsion inverse (huile dans eau) a un aspect blanchâtre plus visqueux. C'est durant la température d'inversion de phase que se forme la microémulsion attendue, et qui se traduit par une diminution de la conductivité quand la température augmente.

Lors du dernier refroidissement, l'ajout d'un grand volume d'eau à 0°C au moment de la formation de la microémulsion permet la formation des LNC. Celles-ci sont ensuite maintenues sous agitation magnétique jusqu'au refroidissement complet de la préparation.

Une fois le mélange refroidi, différents paramètres sont mesurés afin de vérifier la qualité des LNC : la taille, le caractère monodispersé (fait que toutes les particules aient la même taille), le potentiel de surface (légèrement négatif). Lorsque ces paramètres sont vérifiés, les LNC peuvent se conserver plus de 18 mois à 4°C sans variation dans leur taille ou de leur potentiel de surface.

L'encapsulation de principe actif se fait en solubilisant au préalable l'agent d'intérêt et en le mélangeant au Labrafac. Les fluorochromes tels que le DiD ou le Nile Red sont insensibles à la chaleur et peuvent être incorporés dès le début de la formulation, en protégeant la préparation de la lumière.

1.2.3. Encapsulation d'agents anticancéreux en thérapie des gliomes

L'une des premières études de ces LNC dans le traitement des gliomes a été réalisée en encapsulant de l'Etoposide et en les testant sur des cellules de gliomes de rat C6, F98 et 9L (Lamprecht et Benoit, 2006). L'Etoposide, alcaloïde inhibant l'entrée des cellules en prophase, est un inhibiteur de la topoisomérase II provoquant des cassures de l'ADN. Les LNC chargées d'Etoposide se sont montrées capables d'inhiber la croissance des cellules tumorales et d'inhiber l'activité de la glycoprotéine P (P-gp), responsable de l'efflux des agents anticancéreux et de la résistance multiple aux anticancéreux.

La même année, Garcion et collaborateurs ont montré que les LNC chargées avec du Paclitaxel étaient plus efficaces *in vitro* et *in vivo* que le paclitaxel commercial (Taxol) dans le traitement des gliomes chez le rat. Ils ont également élucidé le mécanisme d'inhibition des pompes d'efflux par les LNC : les LNC interagissent directement avec la P-gp en régulant de façon négative son activité ATPase. Enfin, ils ont montré que les LNC, dans les lignées cellulaires de gliome de rat 9L et F98, entraient par un mécanisme d'endocytose clathrine-indépendant, cavéole-indépendant mais cholestérol-dépendant (Garcion et al., 2006). Peltier et collaborateurs ont également montré que les LNC permettaient une augmentation de la délivrance par voie orale de Paclitaxel dans le sang (Peltier et al., 2006).

Un dérivé organométallique du Tamoxifène, le Ferrociphénol (Fc-diOH), encapsulé dans les LNC a été testé pour ses propriétés antiprolifératives sur une lignée de gliosarcome de rat 9L, en comparaison avec des micelles chargées (Allard et al., 2008a). Les LNC

chargées se sont montrées capables d'incorporer plus de Fc-diOH dans leur cœur que les micelles, d'être mieux incorporées dans les cellules de gliome et d'être moins toxiques pour les cellules saines. Dans un modèle de rat porteur d'une tumeur 9L implantée en sous-cutanée, les LNC chargées ont montré une réduction plus importante de la masse et du volume des tumeurs que les micelles chargées. Le Fc-diOH et deux dérivés ont également été testés sur un modèle orthotopique de gliome 9L, en injection simple ou par Convection-Enhanced Delivery (CED) (Allard et al., 2009), ou suivis par une radiothérapie externe (Allard et al., 2010).

Le Rhénium 188 (^{188}Re) a également été encapsulé dans les LNC sous forme d'un complexe $^{188}\text{Re}(\text{S}_3\text{CPh})_2(\text{S}_2\text{CPh})$ [^{188}Re -SSS] en traitement par radiothérapie interne. Ces ^{188}Re -SSS LNC ont été testées sur un modèle orthotopique de gliome de rat 9L, à des doses de 3, 4, 8, 10 et 12 Gy. Les résultats ont montré que ces ^{188}Re -SSS LNC étaient toxiques pour la dose la plus concentrée (12 Gy), mais que l'une des doses intermédiaires (8 Gy) a montré une bonne tolérance chez l'animal et une augmentation de la médiane de survie de 80% (Allard et al., 2008b).

2. Les peptides de pénétration cellulaire ou CPP

2.1. Définition et découverte

Les peptides de pénétration cellulaire ou CPP (Cell-Penetrating Peptides) sont définis comme étant de courts peptides (moins de 35 Aa), solubles dans l'eau et partiellement hydrophobes et/ou polybasiques, avec une charge nettement positive à pH physiologique par la présence de plusieurs résidus d'arginines et/ou de lysines (Järver et Langel, 2006). Egalement appelés domaines de transduction des protéines (PTD), peptides Trojan ou séquences de translocation membranaire, ces peptides peuvent être internalisés par les cellules à de faibles concentrations (de l'ordre du micromolaire) *in vitro* et *in vivo*, sans provoquer de dommage sur la membrane des cellules. Le but de leur utilisation est de les coupler à différents cargos, tels que des acides nucléiques, des peptides, des protéines, des drogues et autres médicaments qui ne rentreraient pas spontanément dans les cellules, afin d'en améliorer la délivrance ou de faciliter leur ciblage dans l'organisme ou dans un compartiment cellulaire particulier.

La découverte des premiers CPP remonte à la fin des années 1980s, lorsque Frankel et Pabo étudient l'activité de la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine ou VIH et découvrent que cette protéine est capable de traverser la membrane plasmique des cellules (Frankel et Pabo, 1988). En 1991, une équipe française décrit la protéine *Drosophila antennapedia homeodomain* comme étant capable de pénétrer dans les cellules neuronales et d'aller se localiser au niveau nucléaire (Joliot et al., 1991). A partir de la troisième hélice de cette protéine, un peptide de 16 Aa est découvert comme étant la plus petite séquence à garder cette propriété de traverser la membrane cellulaire. Ce peptide, appelé Pénétratine ou pAntp, rentre dans les cellules lorsqu'il est incubé à 4°C, indiquant un mécanisme d'entrée énergie-indépendant n'impliquant pas l'endocytose (Derossi et al., 1994). Une même étude fut réalisée quelques temps après sur la protéine Tat afin d'identifier la plus petite séquence toujours capable d'être internalisée par les cellules (Vivès et al., 1997). Cette séquence inclu les Aa 48 à 60 de la protéine Tat, et ainsi le peptide Tat (ou Tat (48-60)) est devenu l'un des CPP les plus étudiés et les plus utilisés à l'heure actuelle.

Aujourd'hui, il existe d'autres CPP (**Tableau 6**), et leur couplage à des cargos de plus en plus nombreux et de plus en plus variés en font des vecteurs prometteurs pour de futurs modes de délivrance des médicaments.

Leur mode d'internalisation est encore mal connu, et dépend notamment de leur concentration, leur charge, leur taille et du type de cellules (**Figure 28**). Certains rentrent par des processus énergie-indépendant tels que la translocation directe (modèle de Carpet, modèle de Barrel-Staff), d'autres rentrent par des processus d'endocytose incluant la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante et l'endocytose récepteur-dépendante (pour revue récente, Madani et al., 2011).

Tableau 6 : Liste des principaux CPP et leurs caractéristiques (adaptée de Madani et al., 2011)

Peptide	Nombre de résidus	Nombre Arg/Lys	Masse (Daltons)	Hydrophobicité	Séquence	Charge totale	Amphipathicité	Références
R9	9	9/0	1422,8	2,58	RRRRRRRRR	+9	Non-amphipathique	Futaki et al., 2001
Tat (48-60)	13	6/2	1718,1	2,37	GRKKRRQRRRPPQ	+8	Non-amphipathique	Frankel et Pabo, 1988 Vivès et al., 1997
Pénétratine	16	3/4	2245,1	1,52	RQIKIWFQNRRMKWKK	+7	Amphipathique secondaire	Joliot et al., 1991 Derossi et al., 1994
Pen-Arg	16	7/0	2358,8	1,49	RQIRIWFQNRRMRWRR	+7	Amphipathique secondaire	Thorén et al., 2003
pVEC	18	4/2	2208,8	1,1	LLIILRRRIRKQAHHSK	+8	Amphipathique secondaire	Elmquist et al., 2001
M918	22	7/0	2651,4	0,93	MVTVLFRRLRIRACGPPRVV	+7	Non-amphipathique	El-Andalousi et al., 2007a
TP10	21	0/4	2181,8	0,53	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	+4	Amphipathique primaire	Soomets et al., 2000
Crotamine	42	2/9	4883,8	n. r.	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPSSD- FGKMDCRWRWKCKCKKGGG	+10	Amphipathique secondaire	Oguiura et al., 2005 Rodrigues et al., 2012
Maurocalcine	33	4/7	3869,6	n. r.	GDCLPHLKLCKENKDCCSKK- CKRRGTNIEKRCR	+7	Amphipathique primaire	Estève et al., 2005 Boisseau et al., 2006
CADY	20	5/0	2622,2	n. r.	GLWRALWRLRLSLWRLWRA	+5	Amphipathique secondaire	Crombez et al., 2009
MAP	18	0/5	1876,5	n. r.	KLALKLALKALKAAALKLA	+5	Amphipathique secondaire	Oehlke et al., 1998
MPG	27	1/3	2766,3	n. r.	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPFSKRKV	+4	Amphipathique primaire	Morris et al., 1997

n. r. : non renseigné

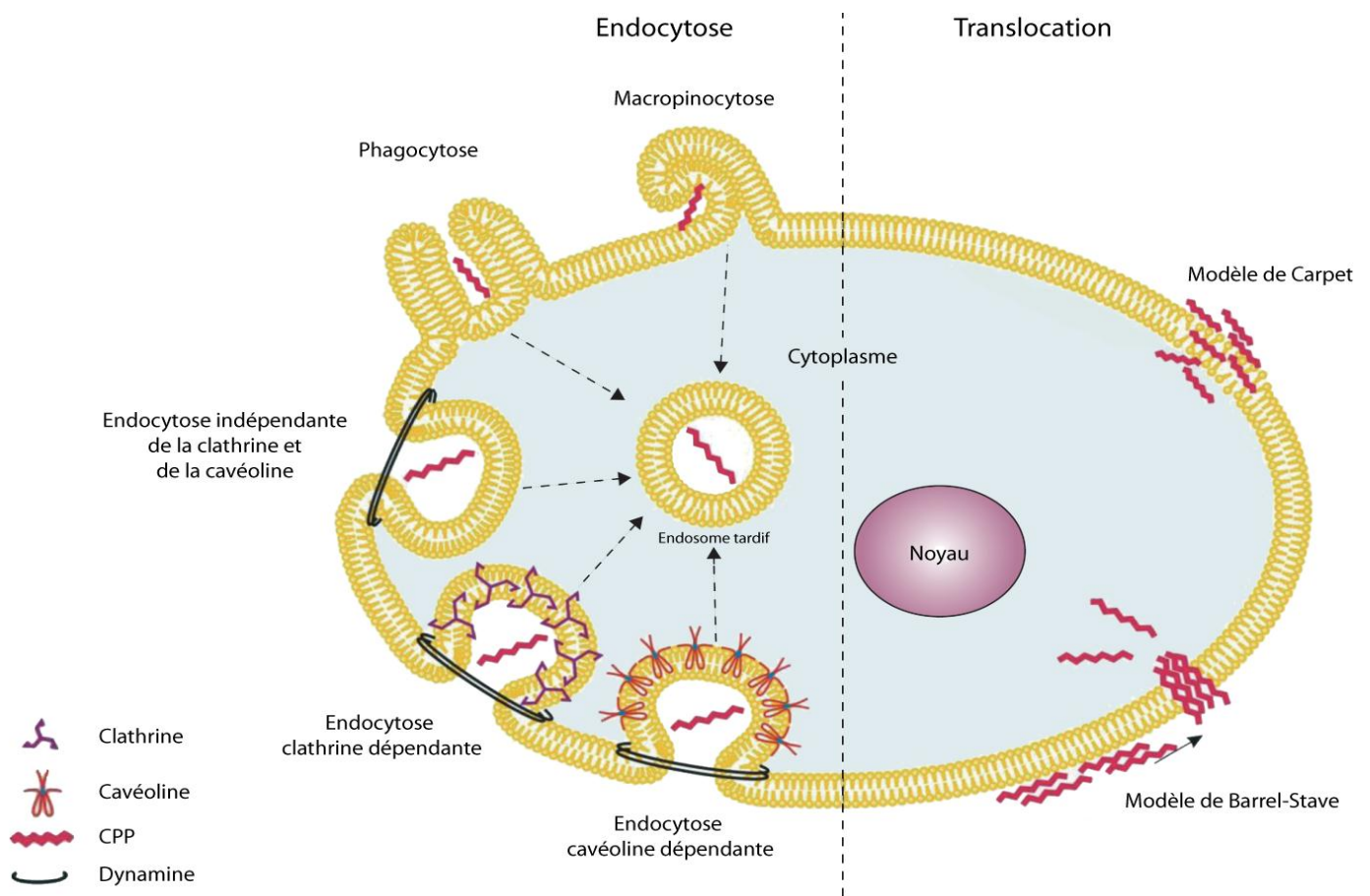


Figure 28 : Les différentes voies d'internalisation des CPP

(adaptée de Poillot et De Waard, 2011)

2.2. Les différentes catégories de Cell-Penetrating Peptide

Les CPP sont classés en différentes catégories, suivant leur origine ou leurs propriétés physiques vis-à-vis des lipides membranaires.

2.2.1. Par rapport à leur origine

Les CPP sont classés en trois catégories distinctes : les peptides dérivés des séquences de protéines, les peptides synthétiques et chimériques, et les peptides naturels. Les peptides dérivés des protéines ont été les premiers à avoir été décrits, avec notamment les peptides Tat (48-60) et la Pénétratine. Ils sont respectivement issus des protéines Trans-Activatrice de Transcription (Tat) du VIH et de la troisième hélice de l'homéodomaine (domaine de fixation à l'ADN) du gène *Antennapedia* de la Drosophile. Les peptides chimériques contiennent un ou

plusieurs motifs provenant de protéines, comme le Transportan et ses analogues TP10, dérivés des peptides mastoparane et galanine et reliés entre-eux par une lysine (Pooga et al., 1998 ; Soomets et al., 2000). Les peptides synthétiques regroupent principalement les familles des polyarginines et des polylysines, qui sont des répétitions plus ou moins importantes des résidus arginines et lysines chargés positivement.

La catégorie des peptides naturels, découverts récemment, est composée principalement de toxines de venins de différentes espèces. Les peptides parmi les mieux décrits sont la crotamine et la maurocalcine. La crotamine est une toxine issue d'un crocodile composée de 42 Aa, découverte par Kerkis et collaborateurs en 2004 comme étant un nouveau CPP (Kerkis et al., 2004), et capable de transporter des plasmides d'ADN dans des cellules de mammifères (Nascimento et al., 2007). Deux peptides issus de cette séquence ont montré les mêmes capacités à se localiser au niveau nucléaire (Ràdis-Baptista et al., 2008). La maurocalcine est une toxine issue du venin d'un scorpion, dont un peptide de 33 Aa est capable de traverser la membrane plasmique (Estève et al., 2005) et de délivrer de la doxorubicine dans des cellules d'adénocarcinome (Aroui et al., 2009).

2.2.2. Par rapport à leurs propriétés physiques

Les CPP peuvent également être classés en amphipathiques primaires, secondaires ou non-amphipathiques, suivant leur interaction avec la membrane plasmique. Un peptide est dit amphipathique s'il possède à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Les amphipathiques primaires contiennent généralement plus de 20 Aa, et regroupent le Transportan et ses dérivés tels que le TP10. Certains de ces amphipathiques primaires sont toxiques, même à faible concentration, comme le TP10. Les amphipathiques secondaires, Pénétratine et pVEC (peptide dérivé de la Vascular-Endothelium-Cadhérine), contiennent moins d'Aa que les primaires, et leur propriété amphipathique est révélée lors de leur interaction avec la membrane de phospholipide, lorsqu'ils forment des hélices α ou des feuilletts β (Ziegler, 2008). Les peptides non-amphipathiques, Tat (48-60) et polyarginines, sont de petite taille, contiennent beaucoup de résidus chargés positivement, et se fixent à la membrane au niveau des lipides anioniques. Les peptides amphipathiques secondaires et non-amphipathiques sont beaucoup moins toxiques que les amphipathiques primaires qui provoquent des cassures de la membrane plasmique lors de leur interaction avec elle (Eiríksdóttir et al., 2010).

2.3. Applications liées aux Cell-Penetrating Peptide

2.3.1. Agents pour l'imagerie cellulaire et médicale

Les CPP étant par définition des vecteurs entrant dans les cellules, les premiers couplages avaient pour but de visualiser cette internalisation et de les localiser dans les cellules. Deux couplages sont principalement étudiés : couplage direct avec une molécule fluorescente type fluorescéine ou FITC (Fluorescein IsoThioCyanate) qui est directement greffée à l'une des extrémités du peptide (Vivès et al., 1997), ou marquage indirect par le greffage d'une molécule de biotine par exemple à l'une des extrémités et révélation avec une molécule de streptavidine couplée à un fluorochrome (Derossi et al., 1994). D'autres fluorochromes sont également utilisés, tels que la rhodamine ou la famille des Alexa Fluor, ou les quantum dots, nanocristaux semiconducteurs fluorescents dont la longueur d'émission est ajustable avec leur taille. Ces derniers ont été testés sur des cultures cellulaires et commencent à être utilisés chez l'animal (Lagerholm, 2007 ; Yukawa et al., 2010). Néanmoins, il a été montré que le couplage aux quantum dots pouvait modifier les propriétés des peptides couplés, notamment le mode d'internalisation par les cellules (Chen et al., 2008).

L'une des applications la plus intéressante dans le domaine de l'imagerie médicale est le couplage avec des particules de fer et la visualisation par IRM. L'une des premières équipes en 1999 à coupler des particules superparamagnétiques d'oxyde de fer (ou SPIO) au peptide Tat-FITC montra que l'entrée dans les lymphocytes murins, les cellules NK humaines et les cellules HeLa est augmentée de plus de 100 fois (Josephson et al., 1999). Des nanoparticules de fer recouvertes de PEG et couplées au peptide Tat marqué au Texas Red ont montré leurs avantages (petite taille, biocompatibilité, solubilité dans l'eau et stabilité) comme agent de contraste pour l'IRM (Nitin et al., 2004). D'autres peptides comme la Pénétratine ou la polyarginine ont également montré ces mêmes propriétés, avec des particules de fer ou de gadolinium (Child et al., 2011 ; Liu et al., 2006), et les études sur leur localisation cellulaire et leur mode d'internalisation ont été effectuées (Nair et al., 2012). Pour l'instant, aucune étude *in vivo* n'a été réalisée avec ces types de vecteurs, mais leur forte capacité à rentrer dans les cellules pourraient faire d'eux des marqueurs pour l'IRM.

L'autre application dans l'imagerie consiste à marquer les CPP avec des éléments radioactifs, comme le technétium (^{99m}Tc) ou le rhénium ($^{186, 188}\text{Re}$). A l'heure actuelle, une seule étude a été réalisée sur la souris avec un peptide dérivé de Tat et couplé au ^{99m}Tc qui a

été incorporé à des cellules souches neurales afin de les suivre *in vivo* (Bartholomä et al., 2008). Les radioéléments sont préférentiellement utilisés en radiothérapie.

2.3.2. Délivrance d'oligonucléotides en thérapie génique

Dans le cadre de la thérapie génique, trois possibilités de traitement sont possibles suivant la maladie : la restauration d'une fonction d'un gène, l'extinction d'un gène devenu toxique et la modification de fonction d'un gène. Les oligonucléotides sont capables d'interagir avec l'ADN ou l'ARN afin de moduler l'expression de certains gènes. On parle alors d'ADN plasmidique pour la restauration (insertion d'un nouveau gène fonctionnel dans le génome), d'ARN interférence, d'hybride ADN/ARN, de double brin d'ADN, de fragments d'ADN ou d'ARN modifiés chimiquement ou de peptide interagissant avec l'ADN (PNA) pour la stratégie d'extinction de gène (pour revue, voir Mäe et Langel, 2006 ; Margus et al., 2012).

De nombreux vecteurs sont actuellement à l'étude pour la délivrance d'oligonucléotides. Les vecteurs viraux posent certains problèmes, comme l'insertion mutagène dans le génome des cellules hôtes ou l'activation de l'immunité humorale contre les virus. Actuellement, deux types de vecteurs sont utilisés, basés sur des lipides cationiques (lipoplexes) et des polymères synthétiques (polyplexes) (Düzgünes et de Ilarduya, 2012 ; Jafari et al, 2012).

La première utilisation des CPP pour la délivrance d'oligonucléotides date de 1997, lorsque le groupe de Divita observe que le peptide MPG forme des complexes avec différents oligonucléotides par des interactions électrostatiques, et que ces complexes sont capables de rentrer dans les cellules avec un fort rendement (Morris et al., 1997). Depuis, de nombreux autres CPP ont été utilisés pour la délivrance d'oligonucléotides, comme les peptides CADY pour la délivrance de la luciférase (Rittner et al., 2002), les membres de la famille des polyarginines (Matsui et al., 2003) ou Tat et ses dérivés pour la régulation négative de l'EGFR et de Akt2 (Michiue et al., 2009).

2.3.3. Utilisation des Cell-Penetrating Peptide en oncologie

2.3.3.1. Activation et extinction de gènes

Les agents anticancéreux actuels montrent peu de spécificité pour leur cible, en touchant aussi bien les cellules saines que les cellules tumorales. Ces agents sont souvent peu transportés dans leur tissu cible, et lorsqu'ils atteignent les cellules tumorales, peuvent en être exclus par les mécanismes de résistance aux drogues (Multi-Drug Resistance ou MDR). Dans ce contexte, la délivrance spécifique de molécules par les CPP avec échappement aux mécanismes de MDR apparaît comme novatrice. Le peptide Tat est actuellement le peptide le plus étudié pour moduler la biologie des cellules tumorales et le traitement des cancers (**Tableau 7**) (Wadia et al., 2005).

2.3.3.2. Couplage à des radioéléments

L'utilisation des CPP en radioimmunothérapie s'est rapidement imposée en plus de l'imagerie classique. Les radionucléotides étudiés à cet effet émettent trois types de rayonnement : alpha avec le Bismuth 213 (^{213}Bi) et l'Astate 211 (^{211}At), beta avec l'Yttrium 90 (^{90}Y) et l'Iode 131 (^{131}I), et les électrons Auger avec l'Iode 125 (^{125}I) et l'Indium 111 (^{111}In). Ils sont souvent couplés à des anticorps ciblant des épitopes tumoraux comme le CD20 (Cluster of Differentiation 20), tels que le Bexxar (anti-CD20 couplé au ^{131}I) et le Zevalin (anti-CD20 couplé au ^{90}Y) dans le traitement des lymphomes. Ces radioimmunonucléotides sont internalisés par les cellules et le radionucléotide peut avoir son action sur l'ADN et détruire les cellules. Plus le temps dans le tissu est important et plus la localisation du radionucléotide est proche du noyau, plus les effets seront importants.

La possibilité d'augmenter la quantité de ces radionucléotides dans les cellules tumorales et de les amener dans le noyau en utilisant des CPP a intéressé plusieurs équipes. Le groupe de Reilly a utilisé une séquence de localisation nucléaire (NLS) de l'antigène large du SV-40 afin de favoriser l'internalisation d'anticorps couplés à l' ^{111}In et dirigés contre le CD33 et HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2) (Costantini et al., 2007 ; Costantini et al., 2010). Les cellules leucémiques exprimant le CD33 et les cellules de cancer du sein surexprimant HER2 se sont montrées très sensibles à ces radionucléotides modifiés, en culture et chez la souris Nude.

Tableau 7 : quelques exemples d'utilisation des CPP dans le traitement des cancers

Voie de signalisation impliquée	Fonctions	Dans les cellules cancéreuses	Stratégie de traitement	Type de cellules et/ou modèle animal	Références
p53, suppresseur de tumeur	Contrôle les dommages sur l'ADN, arrêt des cellules entre G1 et S, apoptose	Gène muté dans la moitié des cancers, avec une perte de fonction	Tat délivre un peptide p53 réactivant la fonction de contrôle de la qualité de l'ADN	Sur des lapins avec des modèles de rétinoblastome et de mélanome uvéal	Harbour et al., 2002
p16INK4, suppresseur de tumeur	Se fixe à Cdk4 ou Cdk6 et arrête les cellules en G0/G1	Gène muté dans un grand nombre de cancers par mutation ou délétion	Tat délivre un peptide p16 se fixant au complexe Cycline D:Cdk4/6 et arrêtant les cellules en G1	Kératinocytes humains HaCaT Lignée cellulaire de mésothélium malin implantée chez la souris Nude	Gius et al., 1999 Frizelle et al., 2008
p21, régulateur du cycle cellulaire	Se fixent et inhibent les complexes Cyclin D:Cdk4/6, Cyclin E:Cdk2 et Cycline A:Cdk2	Gène muté dans un grand nombre de cancers par mutation ou délétion	Couplage d'un fragment de p21 (p10) avec Tat ou Antp pour inhiber la croissance cellulaire	Lignées de glioblastome humain, d'astrocytome, de carcinome du sein, de cancer ovarien	Baker et al., 2007 Bonfanti et al., 1997
p27, régulateur du cycle cellulaire	Se fixent et inhibent les complexes Cyclin D:Cdk4/6, Cyclin E:Cdk2 et Cycline A:Cdk2	Gène muté dans un grand nombre de cancers par mutation ou délétion	Fixation de Tat-p27 à Cdk2 et perte de l'activité kinase de Cdk2	Cellules B lymphoblastiques Cellules Jurkat (leucémie, cellule T)	Parada et al., 2001 Nagahara et al., 1998
Famille Bcl-2 : Bcl-2 et Bcl-XL, anti-apoptotiques ; Bax et Bak, pro-apoptotiques	Inhibition de la mort cellulaire pour les premiers, activation de la mort cellulaire pour les seconds	Surexpression des anti-apoptotiques et/ou inhibition des pro-apoptotiques dans les cancers	Couplage du domain BH3 de Bax et Bak, antagoniste de la fonction anti-apoptotique de Bcl-XL, est couplé à Antp ou à la polyarginine	Cellules HeLa (cancer de l'utérus) Cellules Jurkat	Holinger et al., 1999 Letai et al., 2002
Smac, pro-apoptotique	Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) régulent l'activité des caspases. Durant l'apoptose, le peptide SMAC est relargué de la mitochondrie et se fixe sur les IAP.	Surexpression des IAP conduisant à une chimio- et radiorésistance	Couplage de Tat avec un peptide dérivé de Smac favorise la capacité de TRAIL à réduire la taille des glioblastomes	Lignée de cellules de glioblastome humain U87-MG implantées chez la souris Nude	Fulda et al., 2002
HER-2, oncogène	Récepteur aux facteurs de croissance	Analogue oncogénique de l'EGFR, surexprimé dans les cancers notamment du sein, conduit à un phénotype plus agressif et métastatique	Couplage de Tat avec l'antagoniste de HER-2 (Tat-ESX), retardant la croissance cellulaire et induisant l'apoptose	Cellules HeLa S3 et MCF7 (cancer du sein)	Asada et al., 2002
VHL, suppresseur de tumeur	Fixation à l'IGF-1 et inhibition de cette voie	Inactivation dans de nombreux carcinomes rénaux nécessitant la voie d'activation de l'IGF-1	Couplage de Tat avec un fragment de VHL, inhibant la prolifération et la migration des cellules, l'activité de MAP kinase	Lignée de cellules de carcinome humain implantée la souris Nude	Datta et al., 2001

Le fait que le peptide Tat contienne une NLS dans sa séquence fait de lui un candidat intéressant pour ce genre de traitement. Le couplage de Tat-¹¹¹In avec un anticorps dirigé contre la protéine de réparation de l'ADN double brin γ H2AX a été effectué afin de visualiser et d'augmenter les cassures de l'ADN après la radiochimiothérapie (Cornelissen et al., 2009). Ces premiers essais sont prometteurs pour le développement de la radiothérapie.

2.3.3.3. Greffage à des vecteurs chargés

Nous avons montré précédemment que les micelles, les liposomes, les LNC et autres nanovecteurs peuvent incorporer différents agents anticancéreux et peuvent les délivrer *in vitro* et *in vivo* dans les cellules tumorales (Chapitre 3.1.). Dans cette partie, nous nous focaliserons sur le greffage de CPP à la surface de ce type de vecteurs afin d'en améliorer la distribution dans les tissus cibles et l'entrée dans les cellules. Les études couplant ces deux technologies sont très récentes et peu nombreuses, mais elles montrent de véritables améliorations dans la délivrance d'agents anticancéreux et la diminution d'effets indésirables.

L'une des premières études consistait à co-injecter le peptide iRGD (arginine-glycine-acide aspartique), peptide ciblant les cellules tumorales, avec de la doxorubicine ou de l'Abraxane (paclitaxel couplé à de l'albumine) dans un modèle orthotopique de cancer du sein et un modèle de cancer de la prostate chez la souris (Sugahara et al., 2010). La co-administration du peptide avec la drogue libre a pour effet d'améliorer l'entrée de la drogue dans le tissu tumoral. Le groupe de Ruoslahti a également testé des liposomes chargés avec de la doxorubicine et a observé les mêmes résultats, à savoir un effet anti-tumoral équivalent ou supérieur pour une concentration de drogue trois fois inférieure à la drogue seule, et une diminution de la toxicité (Sugahara et al., 2010).

D'autres études ont montré l'intérêt de coupler des CPP à des vecteurs pouvant délivrer des anticancéreux. Qin et collaborateurs ont montré que des liposomes chargés avec de la doxorubicine et recouverts de peptide Tat étaient capables de s'accumuler dans des cellules de gliome de rat C6, dans des cellules épithéliales bovines BCEC et dans le cerveau de souris (Qin et al., 2011). Chez des rats porteurs de tumeur C6, le traitement avec ces liposomes a montré une amélioration de la médiane de survie des animaux. D'autres peptides Tat modifiés ont été testés ainsi que la polyarginine R8, montrant l'importance des Aa chargés positivement dans la translocation cellulaire (Qin et al., 2012). L'équipe d'Okada a montré

que des agrégats micellaires couplés à un peptide Tat modifié et contenant de la coumarine, administrés par voie intranasale chez des rats porteurs d'un gliome C6, s'accumulaient de façon plus importante dans le cerveau que lors d'une administration intraveineuse et sans peptide Tat greffé à leur surface (Kanazawa et al., 2011). Enfin, le greffage simultané de différents peptides à la surface de NP est également possible, comme l'a montré Agemy et collaborateurs dans le traitement du glioblastome (Agemy et al., 2011). Les NP d'oxyde de fer, peuvent être suivies par IRM et couplées à un peptide pro-apoptotique et à un peptide ciblant les mitochondries, montrent une localisation avec les mitochondries des cellules endothéliales tumorales chez des souris porteuses d'un gliome, ainsi qu'un ralentissement de la croissance de la tumeur.

Chapitre 4 : But des travaux effectués

Les FI sont les éléments du cytosquelette permettant le maintien de la structure cellulaire par leurs interactions avec les autres éléments du cytosquelette. Variant d'un type cellulaire à un autre, les protéines qui les composent sont capables d'interagir avec les MT au niveau de sites spécifiques appelés TBS ou Tubulin-Binding Site, identifiés au laboratoire (Bocquet et al., 2009). A partir de ces séquences, différents peptides ont été synthétisés, dont certains sont particulièrement capables d'inhiber la polymérisation de la tubuline *in vitro*.

Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés de ciblage du peptide Vim-TBS.58-81 sur une lignée de glioblastome humain T98G, en comparaison avec le peptide Tat.48-60, référence comme peptide pénétrant les cellules (CPP). Nous avons voulu connaître le mode d'internalisation de ce peptide dans les cellules par des co-marquages avec des marqueurs d'endocytose (sous-unité B de la toxine cholérique, transferrine) en présence ou non de leurs inhibiteurs (méthyl- β -cyclodextrine). Enfin, nous avons testé les capacités de vectorisation du peptide Vim-TBS.58-81 en comparaison du peptide Tat.48-60, en les couplant à un peptide pro-apoptotique agissant au niveau nucléaire (**1^{er} article : Balzeau et al., 2012**).

Une autre partie des travaux du laboratoire porte sur l'étude du peptide NFL-TBS.48-63, issu de la sous-unité légère des neurofilaments (NFL). Ce peptide, capable de rentrer dans la lignée de glioblastome T98G et de détruire le réseau de microtubules (Bocquet et al., 2009), a été testé sur une autre lignée de gliome humain U87-MG, sur une lignée de gliome de souris GL261 et sur deux lignées de gliome de rat, F98 et 9L, en comparaison avec des astrocytes (humains, murins et de rats) et des neurones (de souris et de rats). L'entrée et les effets sur les microtubules ont été évalués, ainsi que les effets sur la viabilité, la prolifération et la migration des cellules *in vitro*. Le peptide NFL-TBS.48-63 a également été injecté chez un modèle de rat porteur d'un gliome F98, afin de tester *in vivo* ses propriétés anti-prolifératives (**2^{ème} article : Berges et al., 2012a**).

Une étude de la relation structure/fonction du peptide NFL-TBS.40-63 a ensuite été réalisée, afin de déterminer l'importance de chaque acide aminé dans la séquence du peptide. Pour cela, chaque acide aminé a été remplacé par une alanine (criblage « Ala-Scan »). L'internalisation sur les cellules de glioblastome humain T98G de chacun de ces peptides et leurs effets sur le réseau de MT ont été mesurés. Une étude conformationnelle par dichroïsme circulaire sur le peptide NFL-TBS.40-63 ainsi que sur certains peptides issus de l'Ala-Scan a permis de mettre en évidence des structures en feuillets β ou en hélices α suivant les solvants. Ces résultats indiquent que la majorité des acides aminés de la séquence sont essentiels à ses fonctions. A partir de ces résultats, le peptide a été modélisé sous deux formes différentes co-existantes en solution, l'une en feuillet β , l'autre en hélice α (**3^{ème} article : Berges et al., 2012b**).

Enfin, nous avons étudié les propriétés de vectorisation du peptide NFL-TBS.40-63 en le greffant à la surface de nanocapsules lipidiques (LNC), dans le but de les guider préférentiellement vers les cellules tumorales. L'incorporation de ces LNC, contenant un fluorochrome dans leur cœur huileux, a été mesurée *in vitro* sur la lignée de gliome de souris GL261 ainsi que sur des astrocytes de souris. La viabilité des cellules en présence ou non de LNC contenant du Paclitaxel a aussi été mesurée. Enfin, les différentes formulations ont été testées *in vivo* chez des souris C57Bl/6 porteuses d'un gliome GL261, pour évaluer leur localisation tissulaire et leur capacité à ralentir la croissance tumorale (**4^{ème} article : Balzeau et al., en préparation**).

Le même type de LNC contenant du Ferrociphénol, un dérivé du Tamoxifène, et recouvert du peptide NFL-TBS.40-63 ou de l'anticorps murin OX26 ciblant les récepteurs à la transferrine, a été testé sur une lignée de gliosarcome de rat 9L *in vitro*. Chez des rats Fisher porteurs du gliome 9L, ces différentes formulations ont été injectées soit par CED, soit par injection intra-carotidienne, afin d'évaluer le potentiel anti-tumoral de ces formulations et le caractère ciblant du peptide NFL-TBS.40-63 et de l'anticorps OX26 (**5^{ème} article : Laine et al., 2012**).

RESULTATS

1^{er} article

The vimentin-tubulin binding site peptide (Vim-TBS.58-81) crosses the plasma membrane and enters the nuclei of human glioma cells.

Julien Balzeau, Alan C. Peterson and Joel Eyer. *Int J Pharm* (2012) 423(1):77-83.

Les MT et les FI sont deux éléments du cytosquelette, capables d'interagir au niveau de sites spécifiques sur les FI appelés TBS (Tubulin-Binding Site) (Bocquet et al., 2009). Ces sites ont été identifiés sur les différentes protéines constituant les FI et variables suivant le type cellulaire. Ces sites sont régulièrement retrouvés dans la partie N-terminale de ces protéines. Les acides aminés 58 à 81 de la séquence de la vimentine, protéine retrouvée dans les cellules d'origine mésenchymateuse, ont été identifiés comme étant capables de fixer les dimères de tubuline. A partir de ce site, un peptide appelé Vim-TBS.58-81 a été synthétisé et s'est révélé capable de fixer la tubuline *in vitro*.

Le peptide Vim-TBS.58-81 a été testé sur une lignée de glioblastome humain T98G, et s'est montré capable de rentrer dans les cellules et d'aller se localiser au niveau nucléaire, tout comme le peptide Tat.48-60 (**Figure 1A**). L'entrée de ces peptides dans la lignée cellulaire T98G se fait de façon dose-dépendante, avec un maximum de cellules ayant incorporé les peptides dès 15 μ M pour Vim-TBS.58-81 et 2 μ M pour Tat.48-60 (**Figure 1B**).

Le mode d'internalisation de ces peptides a été étudié par cytométrie en flux et microscopie confocale. Lorsque les cellules sont incubées à 4°C, les mouvements de la membrane plasmique sont fortement diminués, inhibant l'entrée des peptides (**Figure 2A**). De même, lorsque les cellules sont pré-incubées avec une solution de déplétion d'ATP, l'entrée des deux peptides est inhibée, indiquant un processus énergie-dépendant (**Figure 2B**). Ces résultats nous ont orientés vers un processus d'endocytose caractérisant l'entrée du peptide Vim-TBS.58-81.

Une analyse par microscopie confocale des cellules T98G traitées avec le peptide Vim-TBS.58-81 couplé à la carboxyfluorescéine et avec la sous-unité B de la toxine cholérique, marqueur d'endocytose au niveau des rafts lipidiques et des cavéoles, couplée à un Alexa Fluor 555 nm a montré une co-localisation entre les deux molécules. En présence de l'inhibiteur spécifique de cette voie d'endocytose, leur entrée a été inhibée de façon

spécifique (**Figure 3**), indiquant que le peptide Vim-TBS.58-81 rentre par un processus d'endocytose au niveau des radeaux lipidiques et des cavéoles.

Enfin, la capacité à cibler le noyau a été étudiée par le couplage des différents peptides avec un autre peptide pro-apoptotique, P10, fragment de la protéine p21/WAF1. Ce peptide, une fois dans le noyau, est capable d'inhiber la prolifération des cellules. Le but de ces expériences était de savoir si le peptide Vim-TBS.58-81 était capable de guider le peptide P10 jusque dans le noyau sans affecter sa fonction pro-apoptotique. Les images de microscopie à fluorescence ont montré que le peptide de fusion Vim-TBS.58-81-P10 était capable d'aller se localiser dans le noyau des cellules T98G, alors que le peptide de fusion Tat.48-60-P10 se localisait uniquement dans le cytoplasme des cellules (**Figure 4A**). Après 72 heures de traitement, une diminution de la prolifération a été observée pour les cellules traitées avec le peptide Vim-TBS.58-81-P10 par rapport au contrôle, indiquant que la fonction pro-apoptotique de P10 n'a pas été altérée par le couplage (**Figure 4B**).

Ces résultats présentent un nouveau peptide pénétrant les cellules (CPP), issu de la protéine vimentine, capable de rentrer dans les cellules T98G et d'aller se localiser dans leur noyau. Ce peptide, Vim-TBS.58-81, présente une alternative au peptide Tat.48-60, très étudié actuellement pour la délivrance de différentes molécules (peptides, oligonucléotides...) dans les noyaux de cellules de gliomes.



The vimentin-tubulin binding site peptide (Vim-TBS.58-81) crosses the plasma membrane and enters the nuclei of human glioma cells

Julien Balzeau^a, Alan Peterson^b, Joel Eyer^{a,*}

^a Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, UPRES-EA3143, Université d'Angers, Bâtiment IBS-IRIS, Centre Hospitalier Universitaire, 49033 Angers, France

^b Laboratory of Developmental Biology, McGill University, Royal Victoria Hospital, H5-35, 687 Pine Av. W, H3A1A1 Montreal, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2011

Received in revised form 22 April 2011

Accepted 28 April 2011

Available online 7 May 2011

Keywords:

Cell-penetrating peptide

Nuclear localization

Vimentin

Tubulin-binding site

Glioblastoma

ABSTRACT

Cell-penetrating peptides (CPPs) can translocate through the plasma membrane and localize in different cell compartments providing a promising delivery system for peptides, proteins, nucleic acids, and other products. Here we describe features of a novel cell-penetrating peptide derived from the intermediate filament protein vimentin, called Vim-TBS.58-81. We show that it enters cells from a glioblastoma line via endocytosis where it distributes throughout the cytoplasm and nucleus. Moreover, when coupled to the pro-apoptogenic peptide P10, it localizes to the nucleus inhibiting cell proliferation. Thus, the Vim-TBS.58-81 peptide represents an effective vector for delivery of peptides and potentially a broad range of cargos to the nucleus.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The first cell-penetrating peptide (CPP) was described more than 20 years ago launching the concept of protein transduction domains. Frankel and Pabo (1988) showed that the transactivating Tat protein of HIV-1 can cross the plasma membrane and activate a viral promoter. Thereafter, the group of Lebleu identified Tat amino acids 48–60 as the minimal sequence with capacity to enter cells (Vives et al., 1997). The Tat.48-60 peptide was shown later to translocate through the plasma membrane and localize to the nuclei of glioma cells like U251, T98G (glioblastoma, grade IV) and U373 (astrocytoma, grade III) (Baker et al., 2007; Darbinian et al., 2001; Lo and Wang, 2008).

Peptides able to enter neurons and localize to nuclei also have been described including penetratin, corresponding to the third helix of Antennapedia homeodomain (Derossi et al., 1994). To deliver oligonucleotides to the nucleus, Morris et al. (1997) used the artificial CPP, MPG that contains a hydrophobic domain derived from the fusion sequence of HIV gp41 and a hydrophilic domain derived from the nuclear localization sequence of SV40 T-antigen. Futaki et al. (2001) demonstrated that chimeric cationic peptides, composed of several arginines (called polyArg: 8 or 9 Arg residues) also were able to deliver different molecules into cells. Such CPPs have been used to transport a variety of cargos including oligonucleotides (Astria-Fisher et al., 2002), liposomes (Torchilin et al., 2003), complete proteins (Snyder and Dowdy, 2005) and protein fragments (Niesner et al., 2002) into different cellular compartments.

We demonstrated previously that intermediate filaments have the capacity to bind unpolymerized tubulin at discrete *tubulin-binding sites* (TBSs). Peptides corresponding to some of these TBS, like the NFL derived NFL-TBS.40-63 peptide, are able to enter glioma cells where they disrupt the microtubule network and induce apoptosis (Bocquet et al., 2009). In this report we describe the properties of another TBS peptide, Vim-TBS.58-81, derived from the intermediate filament, vimentin. Vim-TBS.58-81 enters T98G human glioblastoma cells and distributes to both the cytoplasmic and the nuclear compartments. However, it does not affect the microtubule network. Using well-established cell biology techniques (Richard et al., 2003), we show that Vim-TBS.58-81 enters cells by an energy dependant process. Additionally, we ligated

Abbreviations: ATP, adenosine tri-phosphate; BSA, bovine serum albumin; CF, carboxyfluorescein; CPP, cell penetrating peptides; Ctx-B, cholera toxin subunit B; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagles medium; DMSO, dimethylsulfoxide; FACS, fluorescence activated cell sorting; HIV, human immunodeficiency virus; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 tetrazolium; M β CD, methyl- β -cyclodextrin; NFL, neurofilament light subunit; PBS, phosphate buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PFA, paraformaldehyde; PI, propidium iodide; PTD, protein transduction domain; TAT, trans-activator of transcription; TBS, tubulin-binding site.

* Corresponding author at: Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, UPRES-EA3143, Bâtiment PBH-IRIS, CHU, 49033 Angers, France. Tel.: +33 2 44 68 84 88; fax: +33 2 44 68 84 89.

E-mail address: joel.eyer@univ-angers.fr (J. Eyer).

the Vim-TBS.58-81 peptide to the P10 peptide, a pro-apoptogenic fragment of p21/WAF1 protein (Baker et al., 2007; Mutoh et al., 1999; Warbrick et al., 1995), and show that it crosses the plasma membrane and localizes to the nucleus where P10 maintains its pro-apoptogenic activity. In contrast, when the P10 peptide was ligated to the Tat.48-60 peptide, entry to the nucleus was strongly reduced and its pro-apoptogenic activity was attenuated. These results demonstrate that Vim-TBS.58-81 can be a useful vector capable of maintaining the desirable properties of certain molecular cargos.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Labeled peptides were synthesized by Millegen (Toulouse). Human glioma T98G cells were obtained from ATCC (Manassa, VA, USA). Cells were cultured in 60 mm dishes at 37 °C under 5% CO₂ in DMEM (Lonza, France) supplemented with 10% fetal calf serum, 5% L-glutamine (Lonza, France) and 5% penicillin/streptomycin (Lonza, France) and passaged every 2–3 days.

2.2. Immunocytochemistry and fluorescence microscopy

Cells were plated on coverslips one night before experiment, and cultured in medium containing biotinylated peptides for 6 h. After washing in PBS, the cells were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde (PFA in PBS), and washed three times in PBS. The cells were

Table 1

Name and sequence of synthesized biotin and carboxyfluorescein-peptides.

Peptide	Sequence
Vim-TBS.58-81	Biot-GGAYVTRSSAVRLRSSVPGVRLQLQ-CONH ₂
CF-Vim-TBS.58-81	CF-GGAYVTRSSAVRLRSSVPGVRLQLQ-CONH ₂
Tat.48-60	Biot-GRKKRRQRRRPPQ-CONH ₂
CF-Tat.48-60	CF-GRKKRRQRRRPPQ-CONH ₂
P10	Biot-RQTSMTDFYHSKRRLIFS-CONH ₂
Vim-TBS.58-81-P10	Biot-GGAYVTRSSAVRLRSSVPGVRLQLQRQTSMTDFYHSKRRLIFS-CONH ₂
Tat.48-60-P10	Biot-GRKKRRQRRRPPQRQTSMTDFYHSKRRLIFS-CONH ₂

then incubated for 10 min in a 0.5% Triton X-100 permeabilization solution, and washed three times in PBS. Cells were incubated in a blocking solution of 5% BSA in PBS for 15 min followed by mouse anti- β -tubulin antibody (Sigma) at 1/200 overnight. Tubulin and biotinylated peptides were localized using respectively Alexa 568 nm anti-mouse antibody or streptavidin Alexa 488 nm (Molecular Probes) at 1/200 for 1 h, followed by washing in PBS. The preparations were counterstained with 3 μ M 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) for 5 min, washed twice with PBS and coverslips were mounted with an antifading solution. The cell staining was visualized using a Leica DMI6000 inverted microscope and images were acquired with a CoolSNAP HQ2 camera and analyzed with Metamorph 7.1.7.0. software. A minimum of 200 cells were

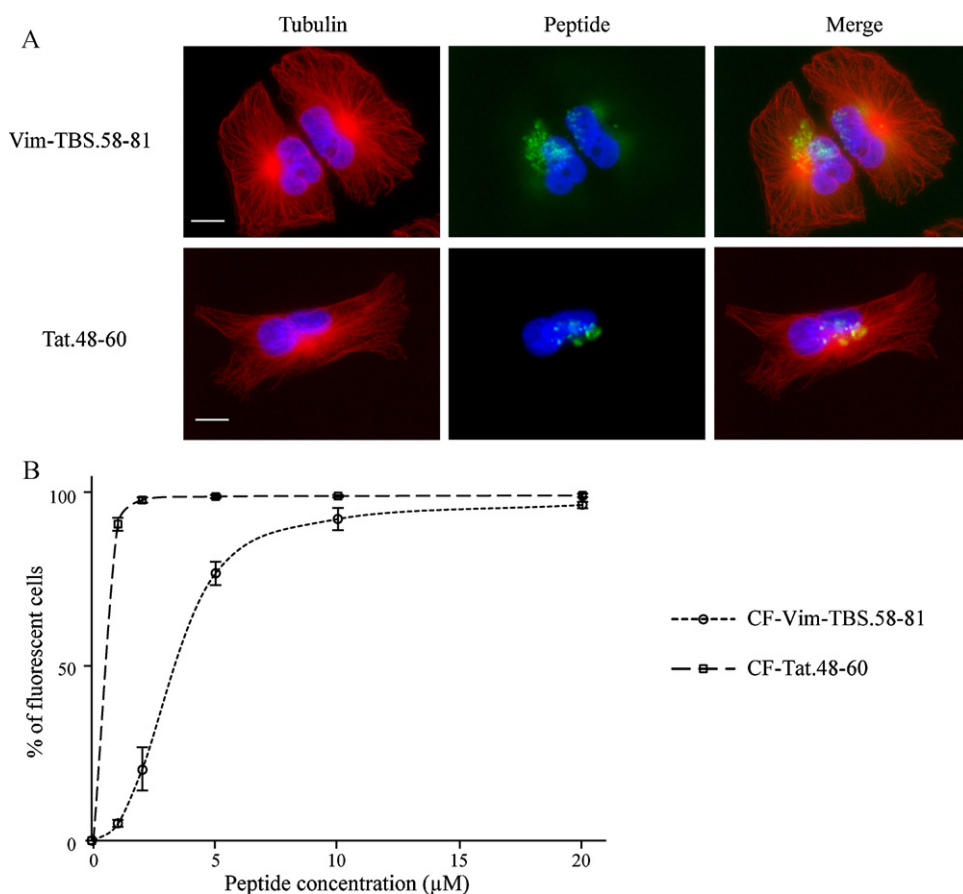


Fig. 1. Cytoplasmic and nuclear localization of Vim-TBS.58-81 and Tat.48-60 peptides in T98G cells. (A) Fluorescent microscopy of T98G cells incubated for 6 h at 37 °C in the presence of biotinylated Vim-TBS.58-81 (50 μ M) or Tat.48-60 (20 μ M). Localization of biotinylated peptides was revealed with streptavidin Alexa 488 (green fluorescence). The microtubule network was revealed using anti-tubulin immunocytochemistry (red fluorescence). Nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence). Images were obtained using a Leica DMR 6000 inverted microscope and analyzed using MetaMorph software. Scale bar = 20 μ m. (B) T98G cells were incubated for 1 h with different concentrations of carboxyfluorescein-tagged Vim-TBS.58-81 or Tat.48-60 peptides and fluorescence measured using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

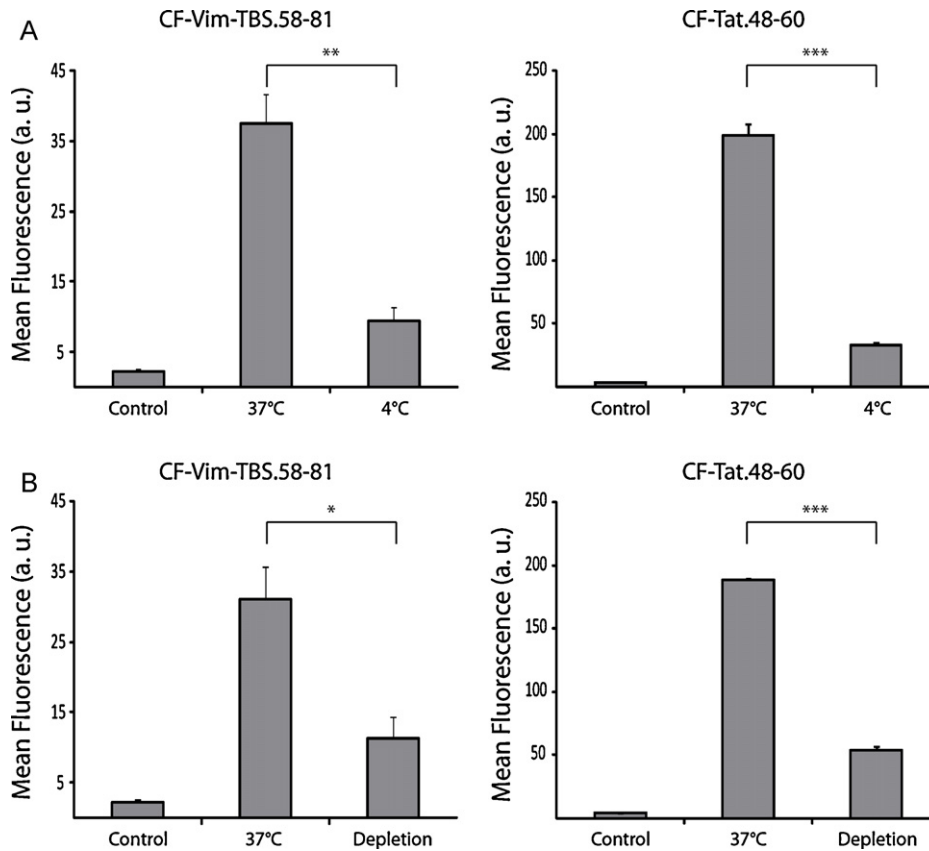


Fig. 2. Uptake of both Vim-TBS.58-81 and Tat.48-60 peptides by T98G cells is temperature and energy-dependant. (A) Incorporation of carboxyfluorescein-tagged Vim-TBS.58-81 (50 μ M) or carboxyfluorescein-tagged Tat.48-60 (10 μ M) following incubation for 1 h at 4 °C or 37 °C. The mean fluorescence and standard deviations are the results of three independent experiments. (B) Depletion of cellular ATP inhibits uptake of Vim-TBS.58-81 and Tat.48-60. Flow cytometric analysis of cells incubated with CF-Vim-TBS.58-81 (50 μ M) or CF-Tat.48-60 (10 μ M) for 30 min at 37 °C, with or without ATP depletion via a 30 min pre-incubation in 10 mM sodium azide and 6 mM deoxyglucose. Average fluorescence intensities and standard deviations are the results of three independent experiments. Statistically significant differences were evaluated by Student's *t*-test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

scored for peptide incorporation, and experiments were repeated three times.

2.3. Peptide uptake analysis by flow cytometry

Cells were plated in 6 well plates (4–5 $\times 10^5$ cells/well), and after 24 h treated with carboxyfluorescein-peptides at different concentrations for 1 h at 37 °C. Subsequently, cells were washed two times with PBS. To dissociate cells and to release peptide attached to membrane, they were then treated with Trypsin-EDTA 1 \times (Sigma) for 15 min. After two washes and centrifugation for 5 min at 2000 $\times g$, cells were re-suspended in 350 μ L of PBS containing 5 μ L propidium iodide (1 mg/mL, Sigma) and subjected to FACS analysis (FACSCalibur, Becton Dickinson). Twenty thousand events per sample were analyzed and experiments were repeated three times. Cells stained with propidium iodide were excluded from analysis.

To investigate the entry mechanism, cells were depleted of intracellular ATP by incubating for 30 min with 6 mM 2-deoxy-D-glucose and 10 mM sodium azide for 30 min prior to incubation with the peptide. In another set of experiments, we attempted to alter plasma membrane rigidity and reduce endocytosis by incubating cells at 4 °C starting 1 h prior to incubation with the peptide.

2.4. Study of the colocalization of Vim-TBS.58-81 with cholera toxin or transferrin by confocal microscopy

Cholera toxin subunit B conjugated to AlexaFluor 555 nm (Ctx-AlexaFluor555; Molecular Probes) (10 μ g/mL) associates with lipid

rafts and is internalized by caveolae. Transferrin from human serum conjugated to AlexaFluor 568 nm (Transferrin-AlexaFluor568; Molecular Probes) (25 μ g/mL) associates with transferrin receptor and is internalized from clathrin-coated invaginations. To determine if Vim-TBS.58-81 colocalizes with the cholera toxin subunit B or transferrin during cell entry, cells were seeded on coverslips and co-incubated in media for 1 h with CF-Vim-TBS.58-81 peptide (50 μ M) and Ctx-AlexaFluor555 (10 μ g/mL), or with CF-Vim-TBS.58-81 peptide (50 μ M) and Transferrin-AlexaFluor568 (25 μ g/mL). After washing in PBS, the cells were fixed for 10 min in 2% paraformaldehyde (PFA in PBS), and washed three times in PBS before mounting with an antifading solution. The stained cells were visualized using a Zeiss LSM 700 confocal microscope, and images were analyzed with the Zen 2009 software.

For specific caveolar endocytosis inhibition experiment, methyl- β -cyclodextrin (M β CD) is used to disrupt lipid rafts by removing cholesterol from membranes. Cells were pretreated 30 min with M β CD (10 μ g/mL in serum free medium) before treatment with the CF-Vim-TBS.58-81 peptide and Ctx-AlexaFluor555.

2.5. Analysis of cell proliferation

The effects of the P10 peptide fused or not to the Vim-TBS.58-81 peptide (Vim-TBS.58-81-P10) or to the Tat.48-60 peptide (Tat.48-60-P10) on the growth rate of T98G glioma cells were determined by using the MTS proliferation assay (Promega). 500 cells were seeded in 96-well plates, incubated at 37 °C for 24 h, and treated with either vehicle (PBS) or the indicated concentrations of the compounds for 72 h. Media and compounds were replaced daily.

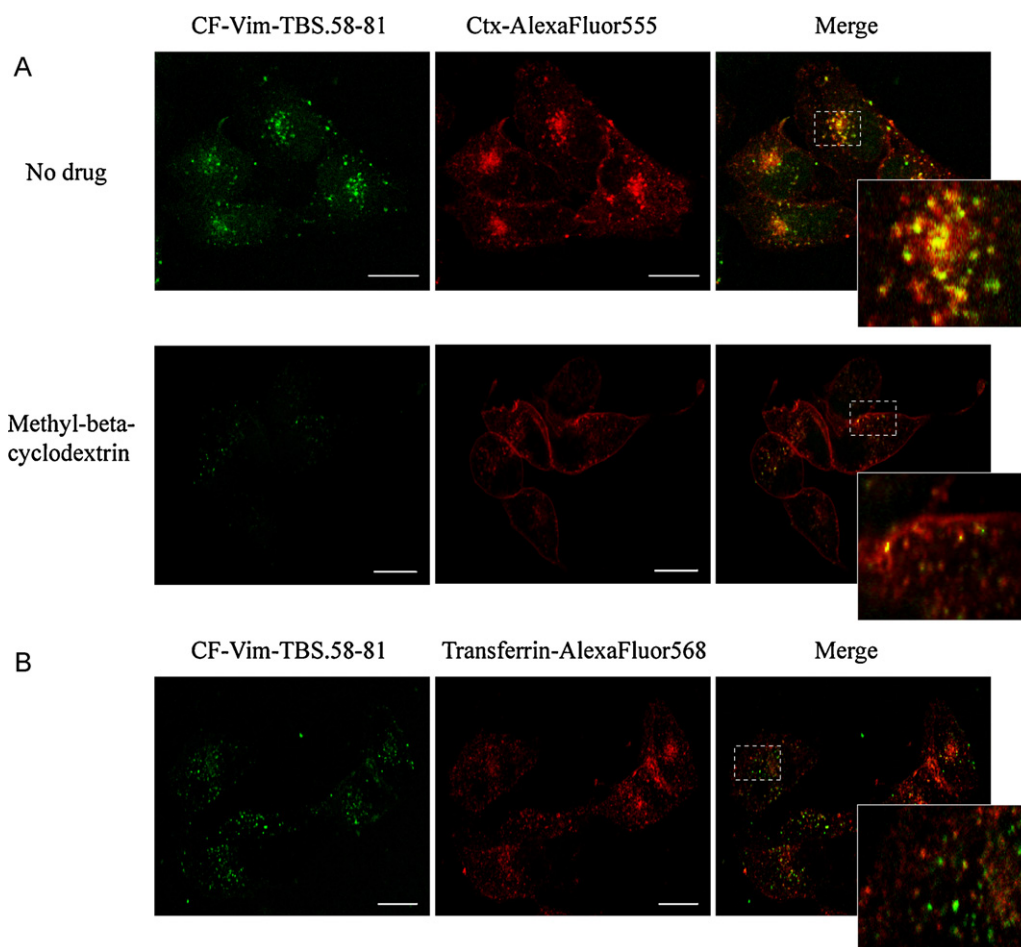


Fig. 3. Internalization of Vim-TBS.58-81 occurs by lipid raft-dependant endocytosis. (A) Confocal microscopy of T98G cells incubated with CF-Vim-TBS.58-81 (50 μ M) and AlexaFluor 555-labeled cholera toxin B (Ctx-AlexaFluor555, 10 μ g/mL) for 1 h, with or without methyl-beta-cyclodextrin (M β CD, 10 mg/mL). (B) Confocal microscopy of T98G cells incubated with CF-Vim-TBS.58-81 (50 μ M) and AlexaFluor 568-labeled transferrin (Transferrin-AlexaFluor586, 25 μ g/mL) for 1 h. Cells were fixed and analyzed by Zeiss LSM700 confocal microscope, using Zen 2009 software. Scale bar = 20 μ m.

Peptides were prepared in DMEM, and Paclitaxel was dissolved in DMSO at a concentration of 2 mM and further diluted into DMEM. MTS produce color change upon bioreduction with accumulation measured at 490 nm proportional to the number of living cells in culture (Bartrop et al., 1991; Cory et al., 1991). Each condition was repeated three times and the results averaged.

The peptides used in this study are shown in Table 1. Biotinylated-peptides were used for fluorescence microscopy and MTS/PMS assays while carboxyfluorescein-labeled peptides were used for FACS analysis and confocal microscopy.

3. Results

3.1. Vim-TBS.58-81 and Tat.48-60 peptides distribute to the cytoplasm and nuclei of T98G cells

We demonstrated previously that the NFL derived NFL-TBS.40-63 peptide is internalized by T98G cells where it remains in the cytoplasm and disrupts the microtubule cytoskeleton (Bocquet et al., 2009). Here, to determine if a tubulin binding peptide derived from another intermediate filament has the same properties, we evaluated Vim-TBS.58-81. Both NFL-TBS.40-63 and Vim-TBS.58-81 were readily detectable in T98G cells by fluorescence microscopy, following a 6 h incubation. In contrast to the cytoplasmic distribution and microtubule disruption caused by NFL-TBS.40-63 internalization, Vim-TBS.58-81 was found both in the cytoplasm

and the nucleus and had no obvious effect on the microtubule network (Fig. 1A).

To evaluate the dynamics of internalization and intracellular distribution, we compared Vim-TBS.58-81 with Tat.48-60, a peptide known to enter T98G cells and to localize to nuclei (Darbinian et al., 2001; Lo and Wang, 2008). A FACS based dose-dependant uptake study revealed that both Vim-TBS.58-81 and Tat. 48-60 uptakes followed a sigmoidal curve. Similarly, at 10 μ M peptide concentration, more than 92% of the cells incorporated the Vim peptide while 99% incorporated Tat.48-60 (Fig. 1B).

3.2. The uptake of Vim-TBS.58-81 and Tat.48-60 peptides is temperature and energy-dependent

To investigate the mechanism of peptide entry, the uptake of labeled peptides under different temperature and energy conditions was assessed using flow cytometry. At reduced temperature (4 $^{\circ}$ C vs. 37 $^{\circ}$ C), where numerous properties of the plasma membrane are affected, the proportion of cells labeled following a 1 h incubation with carboxyfluorescein-labeled Vim-TBS.58-81 or Tat.48-60 was reduced to 25% and 16% respectively (Fig. 2A).

As the temperature dependent decrease could result from changes in membrane properties, reduced availability of energy or a combination of both, we next evaluated the consequences of depleting the cellular ATP pool in cells maintained at 37 $^{\circ}$ C. Cells were treated for 30 min with sodium azide and deoxyglucose prior

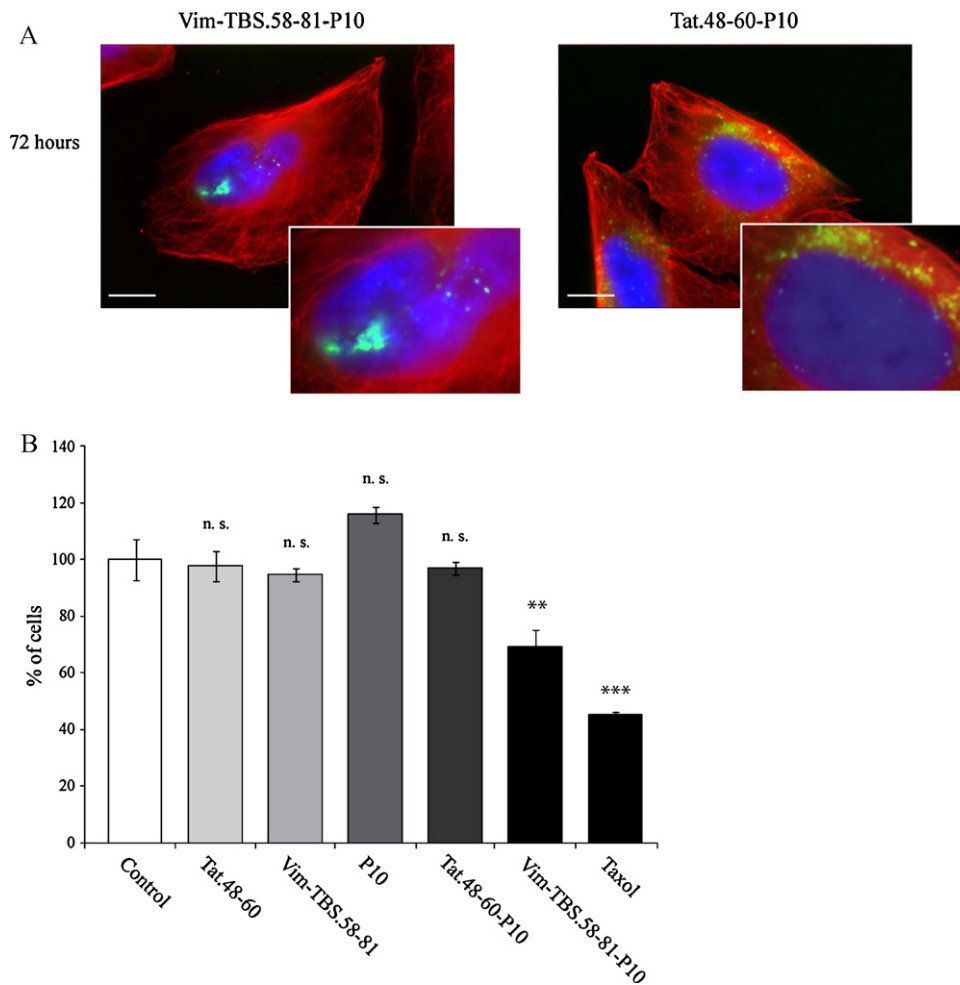


Fig. 4. In vitro effects of Vim-TBS.58-81-P10 and Tat.48-60-P10 peptides on the T98G population present at 72 h. (A) Fluorescent confocal microscopy of fixed T98G cells incubated with Vim-TBS.58-81-P10 or Tat.48-60-P10 (100 μ M) for 72 h at 37 °C. Scale bar = 20 μ m. (B) Effects of peptides on viability of T98G cells. Cells were treated with different peptides (100 μ M) or Taxol (40 nM) for 72 h. Taxol was used as positive control. Statistically significant differences compared to control were evaluated by Student's *t*-test (n. s.: not significant; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

to peptide exposure (Fig. 2B). Such ATP depletion reduced peptide uptake to 37% and 28% for Vim-TBS.58-81 and Tat.48-60 respectively consistent with an uptake process that is heavily energy dependent.

3.3. Vim-TBS.58-81 internalization occurs through the caveolar endocytic pathway

The Tat.48-60 peptide was shown previously to associate with lipid rafts and to be internalized through the caveolar endocytic pathway in numerous cell lines including HeLa, Cos-1 and CHO (Ferrari et al., 2003; Fittipaldi et al., 2003). This strategy of internalization can be inhibited by cholesterol depletion using methyl- β -cyclodextrin, a drug that extracts cholesterol from cell membranes (Yancey et al., 1996). Moreover, cholera toxin B interacts with the ganglioside GM1 present in plasma membrane and can be used as a marker of lipid rafts and caveoli (Heyning, 1974). Transferrin is internalized from clathrin-coated invaginations that can detach to form clathrin-coated vesicles and endosomes (Hanover et al., 1984; Marsh et al., 1995). Here, using immunocytochemistry and confocal microscopy, we show that CF-Vim-TBS.58-81 co-localizes with Ctx-AlexaFluor555 in treated T98G cells (Fig. 3A), and not with transferrin (Fig. 3B). Moreover, uptake of Vim-TBS.58-81 was strongly inhibited by treatment with M β CD (Fig. 3A). Both results are consistent with a lipid raft based

endocytotic pathway supporting Vim-TBS.58-81 entry into T98G cells.

3.4. Vim-TBS.58-81-P10 prevents normal expansion of T98G cell population

p21/WAF1 is a cyclin-dependant kinase inhibitor. P10 is a peptide mimetic that can bind to PCNA and also inhibit kinase activity (Mutoh et al., 1999; Warbrick et al., 1995). When U251 human glioblastoma cells are exposed to a fusion peptide consisting of Tat.48-60 and P10, they internalize the peptide where it localizes to the nucleus and exerts cytotoxic effects (Baker et al., 2007). In contrast, unlike the predominantly nuclear accumulation of Tat.48-60-P10 in U251 cells, the fusion peptide accumulates primarily in cytoplasm of the T98G cells.

To explore the capacity of Vim-TBS.58-81 to transport the P10 peptide to the nucleus, we evaluated the capacity of T98G cells to accumulate and compartmentalize Vim-TBS.58-81-P10. Following incubation with Vim-TBS.58-81-P10 or Tat.48-60-P10 peptides for 72 h, internalization of both fusion peptides was observed and consistent with the distribution of Vim-TBS.58-81 alone Vim-TBS.58-81-P10 accumulated preferentially in the nuclei of T98G cells (Fig. 4A).

Following the demonstration that both Tat.48-60-P10 and Vim-TBS.58-81-P10 are internalized by T98G cells, we next evaluated

the expansion of peptide treated T98G cell populations using the MTS/PMS cell proliferation assay. Evaluation was performed following incubation in media containing peptides for 72 h. Exposure of T98G cells to 100 μ M of Vim-TBS.58-81, Tat.48-60, P10 or Tat.48-60-P10 had no effect on the population size after 72 h of incubation (Fig. 4B). In contrast, exposure to 100 μ M of the Vim-TBS.58-81-P10 fusion peptide induced a significant failure of the cell population to expand. As a positive control for the assay, other cultures were treated with 40 nM Taxol, a treatment known to inhibit cell proliferation.

4. Discussion

In this study, we investigated the features of the tubulin binding peptide (Vim-TBS.58-81) derived from the intermediate filament protein vimentin (Bocquet et al., 2009). Like other TBS peptides derived from the diverse family of intermediate filament proteins, it is internalized by T98G glioblastoma cells. Once internalized, it translocates to the nuclear compartment through an unknown mechanism and its interactions, if any, with endogenous nuclear components remain to be illuminated. However, both neurofilaments and vimentin contact nuclear pores (Metuzals and Mushynsk, 1974; Traub et al., 1983, 1985) and have been shown to interact with RNA and DNA (Traub et al., 1983, 1985). The amino acids 1–95 sequence of vimentin, that overlap the Vim-TBS.58-81 peptide, has been shown to bind DNA through electrostatic interactions or a stacking/intercalation mechanism (Shoeman et al., 1999). Regardless of the mechanism used, the nuclear localizing capacity of Vim-TBS.58-81 suggests that it may have utility as a novel vector capable of delivering a variety of cargo molecules into the nuclei of diverse cell types.

The mechanisms through which CPPs are internalized remain somewhat controversial and many parameters including both the composition and secondary structure of the peptide may be involved (Heitz et al., 2009).

Consistent with its global positive charge, Vim-TBS.58-81 initially associates with the plasma membrane (data not shown). As a strong decrease in its intra-cellular accumulation was observed when cells were incubated at 4°C or when their ATP pool was depleted, an energy-dependant mechanism of internalization is suggested. Further, confocal microscopy revealed that cholera toxin B, a well-known marker of lipid rafts that also tracks caveolar endocytosis, co-localized with Vim-TBS.58-81 during internalization. Thus, our collective observations suggest that a major route of Vim-TBS.58-81 entry is through the energy dependent but clathrin independent endocytic pathway.

Finally, we show that a fusion between Vim-TBS.58-81 and the pro-apoptogenic P10 peptide accumulates and distributes in glioblastoma cells on the schedule predicted by internalization of Vim-TBS.58-81 alone. Moreover, internalization of Vim-TBS.58-81-P10 prevents normal proliferation of T98G cells. Interaction between P10 and PCNA interfere with DNA polymerase delta by competition for the same binding site, thus inhibiting DNA replication (Flores-Rozas et al., 1994; Maga and Hubscher, 2003). It is noteworthy that the Tat.48-60-P10 fusion peptide remains largely in the cytoplasm of T98G cells and has minimal or no effect on their proliferation. The different consequences of the 2 fusion peptides could result from the differences observed in their sub-cellular localizations or from difference in fusion peptide properties caused by the significantly different charge properties of Vim-TBS.58-81 and Tat.48-60. Regardless of the underlying mechanism, the results of this investigation suggest that Vim-TBS.58-81 may provide an effective vector for peptide delivery into cells that are resistant to the Tat peptide delivery system.

Acknowledgements

This study was supported by grants from ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), AFM (Association Française contre les Myopathies), and INCa (Institut National du Cancer) to J. Eyer. J. Balzeau was supported by la Region des Pays de la Loire. We thank Emilie Lauret (INSERM U694) for her help with confocal microscopy.

References

- Astriab-Fisher, A., Sergueev, D., Fisher, M., Ramsay Shaw, B., Juliano, R.L., 2002. Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and Antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm. Res.* 19, 744–754.
- Baker, R.D., Howl, J., Nicholl, I.D., 2007. A synchological cell penetrating peptide mimic of p21(WAF1/CIP1) is pro-apoptogenic. *Peptides* 28, 731–740.
- Barltrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H., Cory, J.G., 1991. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1, 611.
- Bocquet, A., Berges, R., Frank, R., Robert, P., Peterson, A.C., Eyer, J., 2009. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J. Neurosci.* 29, 11043–11054.
- Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., Cory, J.G., 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3, 207–212.
- Darbinian, N., Gallia, G.L., King, J., Del Valle, L., Johnson, E.M., Khalili, K., 2001. Growth inhibition of glioblastoma cells by human Pur alpha. *J. Cell. Physiol.* 189, 334–340.
- Derossi, D., Joliet, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A., 1994. The 3rd helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological-membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–10450.
- Ferrari, A., Pellegrini, V., Arcangeli, C., Fittipaldi, A., Giacca, M., Beltram, F., 2003. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol. Ther.* 8, 284–294.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., Giacca, M., 2003. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 34141–34149.
- Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F.B., Pan, Z.Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M., Hurwitz, J., 1994. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8655–8659.
- Frankel, A.D., Pabo, C.O., 1988. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189–1193.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y., 2001. Arginine-rich peptides—an abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276, 5836–5840.
- Hanover, J.A., Willingham, M.C., Pastan, I., 1984. Kinetics of transit of transferrin and epidermal growth-factor through clathrin-coated membranes. *Cell* 39, 283–293.
- Heitz, F., Morris, M.C., Divita, G., 2009. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* 157, 195–206.
- Heyningen, S.V., 1974. Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science* 183, 656–657.
- Lo, S.L., Wang, S., 2008. An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials* 29, 2408–2414.
- Maga, G., Hubscher, U., 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* 116, 3051–3060.
- Marsh, E.W., Leopold, P.L., Jones, N.L., Maxfield, F.R., 1995. Oligomerized transferrin receptors are selectively retained by a luminal sorting signal in a long-lived endocytic recycling compartment. *J. Cell Biol.* 129, 1509–1522.
- Metuzals, J., Mushynsk, W., 1974. Electron-microscope and experimental investigations of neurofilamentous network in Deiters neurons—relationship with cell-surface and nuclear-pores. *J. Cell Biol.* 61, 701–722.
- Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., Divita, G., 1997. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acid Res.* 25, 2730–2736.
- Mutoh, M., Lung, F.D., Long, Y.Q., Roller, P.P., Sikorski, R.S., O'Connor, P.M., 1999. A p21(Waf1/Cip1) carboxyl-terminal peptide exhibited cyclin-dependent kinase-inhibitory activity and cytotoxicity when introduced into human cells. *Cancer Res.* 59, 3480–3488.
- Niesner, U., Halin, C., Lozzi, L., Günther, M., Neri, P., Wunderli-Allenspach, H., Zardi, L., Neri, D., 2002. Quantitation of the tumor-targeting properties of antibody fragments conjugated to cell-permeating HIV-1 TAT peptides. *Bioconjug. Chem.* 13, 729–736.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., Lebleu, B., 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585–590.

- Shoeman, R.L., Hartig, R., Traub, P., 1999. Characterization of the nucleic acid binding region of the intermediate filament protein vimentin by fluorescence polarization. *Biochemistry* 38, 16802–16809.
- Snyder, E.L., Dowdy, S.F., 2005. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 43–51.
- Torchilin, V.P., Levchenko, T.S., Rammohan, R., Volodina, N., Papahadjopoulos-Sternberg, B., D'Souza, G.G., 2003. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide–liposome–DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1972–1977.
- Traub, P., Nelson, W.J., Kuhn, S., Vorgias, C.E., 1983. The interaction in vitro of the intermediate filament protein vimentin with naturally-occurring RNAs and DNAs. *J. Biol. Chem.* 258, 1456–1466.
- Traub, P., Vorgias, C.E., Nelson, W.J., 1985. Interaction in vitro of the neurofilament triplet proteins from porcine spinal-cord with natural RNA and DNA. *Mol. Biol. Rep.* 10, 129–136.
- Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B., 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010–16017.
- Warbrick, E., Lane, D.P., Glover, D.M., Cox, L.S., 1995. A small peptide inhibitor of DNA-replication defines the site of interaction between the cyclin-dependant kinase inhibitor p21(WAF1) and proliferating cell nuclear antigen. *Curr. Biol.* 5, 275–282.
- Yancey, P.G., Rodriqueza, W.V., Kilsdonk, E.P.C., Stoudt, G.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1996. Cellular cholesterol effect mediated by cyclodextrins—demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* 271, 16026–16034.

A tubulin-binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis.

Raphael Berges, Julien Balzeau, Alan C. Peterson and Joel Eyer. *Mol Ther* (2012) 20(7):1367-77.

Les précédents travaux du laboratoire ont montré que les FI interagissent avec la tubuline libre au niveau de séquences appelées TBS (Tubulin-Binding Site). L'une de ces séquences, retrouvée sur la partie N-terminale de la sous-unité légère des neurofilament (NFL) a donné un peptide appelé NFL-TBS.40-63. Ce peptide a montré une capacité à inhiber complètement la polymérisation de la tubuline *in vitro*, à rentrer dans les cellules de glioblastome humain T98G, à dégrader leur réseau de MT et diminuer leur viabilité (Bocquet et al., 2009). Les tumeurs cérébrales ayant un pronostic souvent défavorable malgré les traitements actuels combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules capables d'améliorer le traitement des patients. Le but de cette étude est d'analyser les propriétés antiprolifératives du peptide NFL-TBS.40-63 sur différentes lignées de gliome de rat, de souris et humaines, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Par analyse en microscopie à fluorescence, nous avons observé que le peptide NFL-TBS.40-63 est capable de rentrer dans les cellules de gliome de rat F98 et de détruire le réseau de MT, mais n'a pas d'effet sur les astrocytes et les neurones de rats (**Figures 1 et 2A**). A 10 μ M, pour 80% des cellules ayant incorporé le peptide, le réseau de MT apparaît détruit sous forme d'agrégats de tubuline (**Figure 2B**). Un peptide contrôle SCR (scramble, même composition en acides aminés mais ordre différent) pénètre de façon moins importante dans les cellules F98 et 9L et n'a pas d'effet significatif sur les MT.

L'analyse quantitative de l'incorporation du peptide dans les cellules par cytométrie en flux montre une incorporation plus importante dans les cellules de gliome de rat F98 et 9L que dans les astrocytes et les neurones (**Figure 2C**). Ainsi, dès 20 μ M, 100% des cellules 9L et 70% des cellules F98 ont incorporé le peptide NFL-TBS.40-63, alors que seulement 35% des astrocytes ont intégré le peptide à 100 μ M. Des résultats similaires ont été observés pour les lignées humaines T98G et U87-MG et murine GL261 (**Figure supplémentaire 1**).

Le mode d'internalisation du peptide NFL-TBS.40-63 a également été étudié en incubant les différents types cellulaires à 4°C (**Figure 2D**) ou en présence d'une solution de déplétion d'ATP (**Figure 2E**). Pour les 5 lignées de gliome testées, l'incorporation du peptide NFL-TBS.40-63 diminue, indiquant un processus d'endocytose énergie-dépendant.

Des tests de viabilité cellulaire (**Figures 3A et 3B**), montrent une augmentation de la mortalité cellulaire après 72 heures pour les cellules de gliome de rat, et aucun effet sur les astrocytes. La concentration de peptide nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50% (IC50) a été mesurée à 17,3 μM pour les cellules F98 et à 23,2 μM pour les cellules 9L (**Figure 3C**). Il a été montré que le peptide NFL-TBS.40-63 inhibe la synthèse d'ADN chez les cellules tumorales par mesure de l'incorporation de BrdU dans les noyaux (**Figure 3D**). Ces résultats *in vitro* ont également été observés pour les lignées T98G, U87-MG et GL261, en comparaison avec les astrocytes humains et murins (**Figure supplémentaire 2**). Enfin, la migration des cellules F98 en présence ou non du peptide a été évaluée, démontrant une inhibition de la migration des cellules à des concentrations non cytotoxique, dès 5 μM (**Figure 3E**).

Les effets du peptide NFL-TBS.40-63 *in vivo* ont été évalués sur un modèle de rat Fischer porteur d'un gliome F98 implanté par stéréotaxie dans le striatum (**Figure 29**).

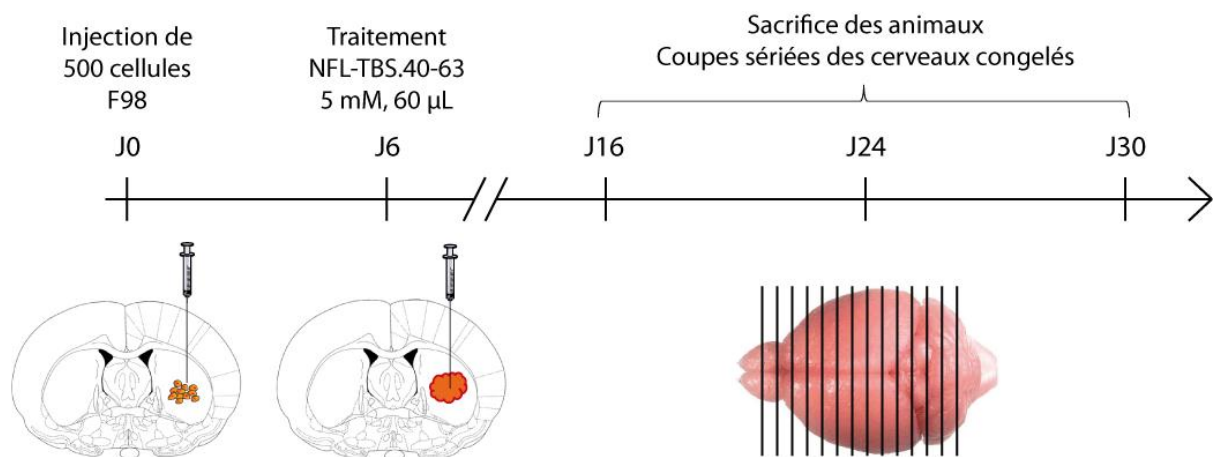


Figure 29 : Chronogramme de l'expérimentation sur rat Fischer

Six jours après l'injection de 500 cellules F98, les animaux ont été traités par CED avec le peptide NFL-TBS.40-63 (5 mM, 60 μL) ou avec de l'eau. 16, 24 ou 30 jours après injection, les animaux ont été sacrifiés, les cerveaux prélevés et analysés pour des études

morphométriques et des marquages immunohistologiques. L'analyse immunohistochimique a montré que le peptide était toujours visible 24 jours après son injection, et se localisait principalement dans le tissu tumoral et très peu dans le tissu sain avoisinant (**Figure 4**). D'autre part, injecté dans des cerveaux sains, le peptide est rapidement éliminé et ne provoque pas d'effet (**Figure supplémentaire 3**). Les analyses morphométriques ont montré qu'une injection unique de peptide NFL-TBS.40-63 ralentissait le développement de la tumeur (72% aux jours 16 et 24, 43% au jour 30 après implantation) (**Figures 5A et 5B**). Ces résultats sont en concordance avec les images d'IRM réalisées pendant l'expérimentation et montrant des tumeurs de taille inférieure chez les animaux traités avec le peptide NFL-TBS.40-63 (**Figure 5C**), ainsi qu'avec les courbes de poids des animaux présentant une amélioration physiologique (**Figure 5D**).

L'ensemble de ces résultats montre que le peptide NFL-TBS.40-63 présente un intérêt dans le traitement des gliomes. Les effets cytotoxiques observés chez les lignées tumorales *in vitro* et *in vivo*, l'absence d'effet sur les cellules saines et l'amélioration des conditions de vie des rats après traitement ouvrent des perspectives intéressantes pour le traitement de ce cancer.

A Tubulin Binding Peptide Targets Glioma Cells Disrupting Their Microtubules, Blocking Migration, and Inducing Apoptosis

Raphael Berges¹, Julien Balzeau¹, Alan C Peterson² and Joel Eyer¹

¹Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; ²Laboratory of Developmental Biology, McGill University, Royal Victoria Hospital, Montreal, Canada

Despite aggressive treatment regimes, glioma remains a largely fatal disease. Current treatment limitations are attributed to the precarious locations within the brain where such tumors grow, their highly infiltrative nature precluding complete resection and lack of specificity among agents capable of attenuating their growth. Here, we show that *in vitro*, glioma cells of diverse origins internalize a peptide encompassing a tubulin-binding site (TBS) on the neurofilament light protein. The internalized peptide disrupts the microtubule network, inhibits migration and proliferation, and leads to apoptosis. Using an intracerebral transplant model, we show that most, if not all, of these responses to peptide exposure also occur *in vivo*. Notably, a single intratumor injection significantly attenuates tumor growth, while neither peptide uptake nor downstream consequences are observed elsewhere in the host nervous system. Such preferential uptake suggests that the peptide may have potential as a primary or supplementary glioblastoma treatment modality by exploiting its autonomous microtubule-disrupting activity or engaging its capacity to selectively target glioma cells with other cell-disrupting cargos.

Received 5 November 2011; accepted 14 February 2012; advance online publication 10 April 2012. doi:10.1038/mt.2012.45

INTRODUCTION

Malignant glioma is the most prevalent primary tumor of the central nervous system. Despite aggressive therapies including combinations of surgery, radiotherapy, and chemotherapy, median post-diagnostic survival is ~1 year.^{1,2} The highly infiltrative nature of many gliomas and the lack of specific anti-glioblastoma agents are among the factors limiting the effectiveness of current therapies.

In an effort to identify novel therapeutic targets, large-scale genomic, transcriptomic, and proteomic analyses have been applied to glioblastoma and typically reveal upregulated expression of several tubulin isoforms.^{3,4} Tubulin-binding compounds are a historically important class of anticancer drugs achieving their effects by promoting excessive microtubule stability, as seen for the taxane family,^{5–8} or by inducing microtubule depolymerization, as seen for the *Vinca* alkaloids.⁹ By modulating microtubule

dynamics, these compounds disrupt cell motility, arrest mitosis, and promote apoptosis.^{10,11} Despite the potential of such microtubule-targeting drugs as chemotherapeutic agents, multiple cellular strategies diminish their long-term effectiveness including upregulation of transmembrane efflux pumps and upregulated expression of tubulin isotypes less affected by such tubulin-binding compounds.^{12–14} Another property affecting their clinical application is high toxicity resulting from their lack of specificity for cancer cells.^{11,15–19} Consequently, identifying microtubule-interacting agents that demonstrate higher specificity for tumor cells continues to be a proximal objective in the search for more effective cancer treatments.

Previously, we demonstrated that intermediate filament proteins contain short motifs that bind unpolymerized tubulin and that 24-amino acid peptides encompassing these tubulin-binding sites (TBS) maintain tubulin-binding capacity. We also demonstrated that a TBS derived from the neurofilament light subunit (neurofilament light (NFL)-TBS.40-63) inhibited tubulin polymerization *in vitro*. Moreover, this TBS containing peptide was internalized by human T98G glioblastoma cells *in vitro* where it led to disruption of their microtubule network and reduced their viability.²⁰ Here, we compared diverse glioma cell lines with various normal cell types for their capacity to internalize NFL-TBS.40-63 *in vitro*. Although other cell penetrating peptides can be internalized by many cell types, the diverse central nervous system cell types examined here had limited capacity to internalize NFL-TBS.40-63 and were unaffected by *in vitro* peptide exposure. In contrast, a markedly enhanced ability to internalize the peptide was a prominent feature shared among multiple glioma cell lines, and such internalization was accompanied by major disruptions in their microtubule networks, reduced motility, inhibition of proliferation and apoptosis. Based on these observations, we explored the possibility that infusion of the peptide into gliomas generated in a transplant model would have therapeutic benefit. Following a single intratumor infusion of peptide, faithful glioma targeting specificity was accompanied with pronounced antitumor activity and therapeutic benefit.

RESULTS

We first investigated if peptide uptake *in vitro* demonstrated cell type specificity and characterized the cellular consequences

Correspondence: Joël Eyer, Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, UPRES-EA3143, INSERM, CHU, 49033 Angers, France.
E-mail: joel.eyer@univ-angers.fr

precipitated by peptide internalization. We next evaluated the *in vivo* response of intracranial transplanted glioma cells and normal brain to peptide exposure.

The NFL-TBS.40-63 peptide is internalized by malignant glioma cells from diverse origins

We showed previously that cells of the T98G human glioblastoma line internalize the NFL-TBS.40-63 peptide causing their microtubule network to be destroyed, tubulin aggregates to form around the nucleus, and their cell shape to become spherical. However, when such treated cells have grown in close apposition to each other, they experience a similar destruction in their microtubule networks but their shapes are less affected (Figure 1).

The relative peptide internalizing capacity of F98 and 9L glioma cells was evaluated following a 6-hour incubation in media containing 10 $\mu\text{mol/l}$ of biotin-labeled NFL-TBS.40-63 peptide, or vehicle alone. Cultures were processed for immunofluorescence and the proportion of labeled cells determined by evaluating 200 cells in each of several 40 \times fields (Figure 1). In both F98 and 9L cultures, more than half of the cells revealed a clearly detectable fluorescent signal ($53.5 \pm 1.5\%$ for F98 and $58.2 \pm 9\%$ for 9L) while cells exposed to vehicle alone did not fluoresce (Figure 2a). Similar results were obtained with human U87 and mouse GL261 glioma cells (Supplementary Figure S1) indicating that glioma cell lines arising from different species and from different primary tumors share a capacity to internalize the NFL-TBS.40-63 peptide.

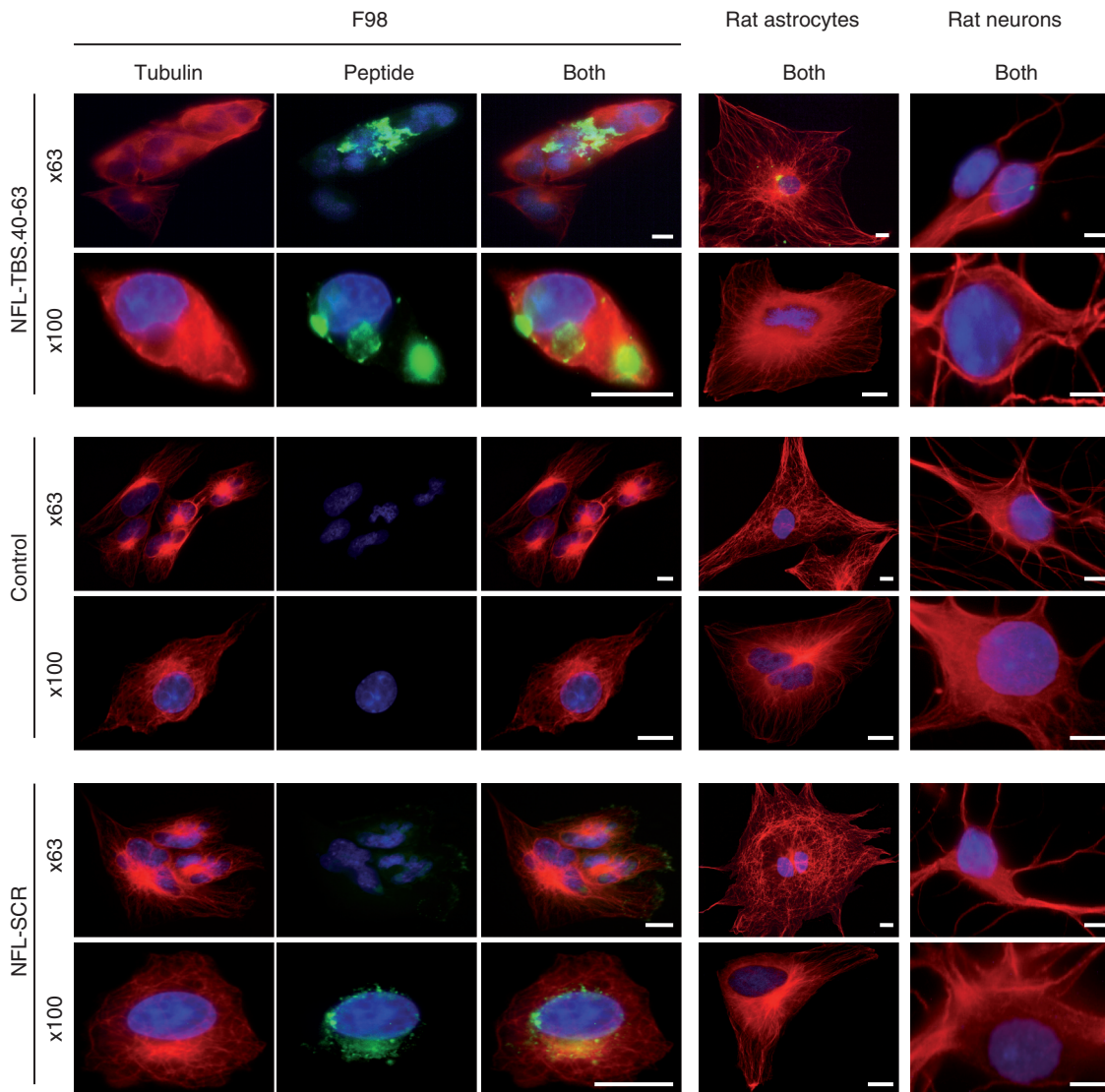


Figure 1 Effects of the NFL-TBS.40-63 peptide on the microtubule cytoskeleton of rat glioma cells and primary astrocytes and neurons. Rat F98 glioma cells and rat primary astrocytes or neurons were grown in the presence of NFL-TBS.40-63 or NFL-SCR peptides (10 $\mu\text{mol/l}$) for 6 hours. Microtubules were detected using an antitubulin antibody (red), and the biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide was detected using Alexa-labeled avidin (green). Cells were examined with a confocal microscope and numerous fluorescent aggregates, corresponding to the biotinylated peptide typically were observed. Glioma cells containing NFL-TBS.40-63 lack a normal microtubule network and typically assume a spherical shape. Except for rare cells demonstrating one or two relatively weakly labeled aggregates, primary rat astrocytes or neurons cultured under similar conditions remained unlabelled and their microtubule networks appeared unaltered. Incubation with the scrambled NFL-SCR peptide did not alter microtubule organization in astrocytes, neurons or glioma cells. White bars, 10 μm . NFL, neurofilament light; SCR, scrambled; TBS, tubulin-binding site.

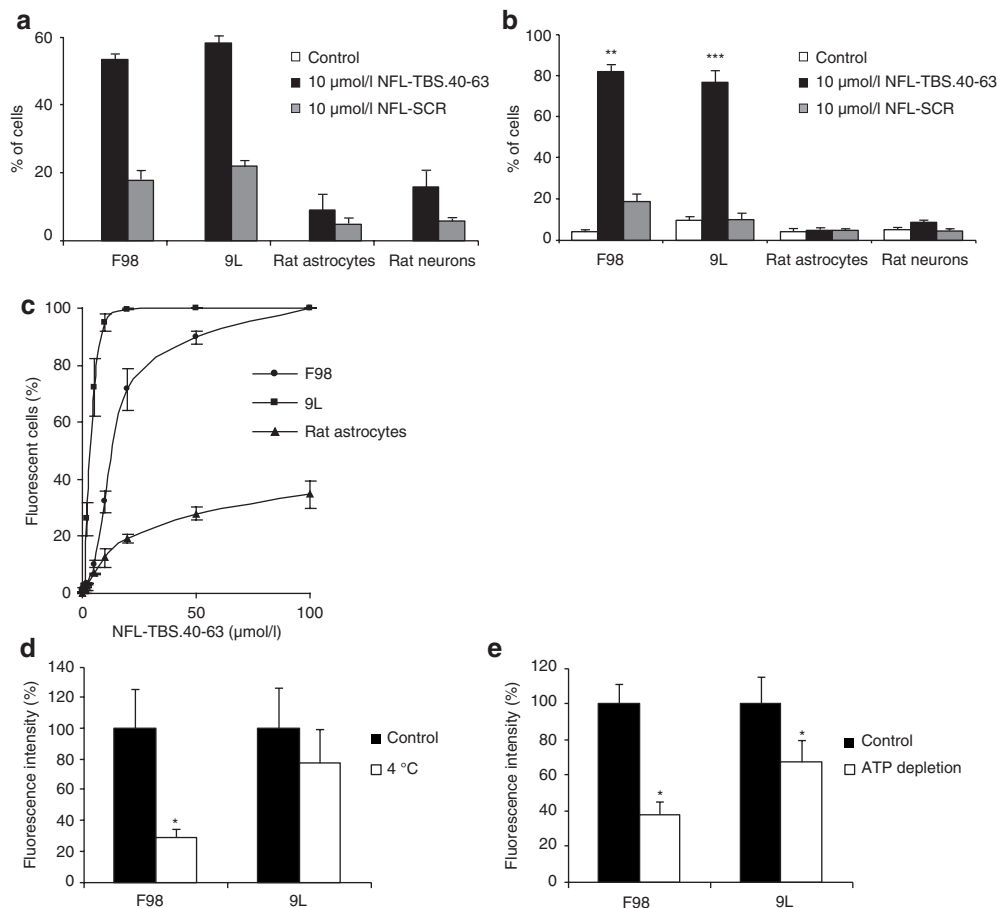


Figure 2 Internalization of the NFL-TBS.40-63 peptide by different rat cell lines and effects on their microtubule networks. **(a,b)** Rat F98 and 9L glioma cells, as well as primary astrocytes or neurons, were treated with 10 μmol NFL-TBS.40-63 or NFL-SCR peptide for 6 hours. The number of cells positive for peptide staining **(a)** and those with disrupted microtubules were counted **(b)**. More than 50% of the cells in both glioma lines contained peptide and displayed a disorganized microtubule cytoskeleton while a much reduced number of primary rat astrocytes and neurons contained peptide or displayed disorganized microtubules. **(c)** Rat glioma cells or astrocytes were incubated for 1 hour at 37°C with carboxyfluorescein-labeled NFL-TBS.40-63 at concentrations of 1, 5, 10, 20, 50, and 100 $\mu\text{mol/l}$. Cellular uptake was assessed by FACS analysis and the percent of fluorescent cells determined. Glioma cells demonstrated a marked preferential uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide at all concentrations. **(d,e)** Uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide is energy and temperature-dependant. Glioma cells were incubated for 30 minutes at 37°C in the presence of 20 $\mu\text{mol/l}$ fluorescein-tagged peptide. Intracellular ATP pools were either unmanipulated (black columns) or depleted by preincubation for 30 minutes with 10 mmol/l sodium azide and 6 mmol/l deoxyglucose (white columns). **(d)** Glioma cells were incubated for 1 hour at 37°C (black columns) or at 4°C (white columns) in the presence of 20 $\mu\text{mol/l}$ fluorescein-tagged NFL-TBS.40-63 peptide. **(e)** Both ATP depletion and reduced temperature significantly attenuated, but did not abolish peptide uptake. Asterisks indicate significant level versus control * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$. FACS, fluorescence-activated cell sorting; NFL, neurofilament light; SCR, scrambled; TBS, tubulin-binding site.

To determine if the peptide internalizing capacity of glioma cells differed from normal central nervous system cells, we established primary cultures of rat astrocytes and neurons and exposed them to peptide under identical conditions. Although such cells could internalize the peptide, the proportion demonstrating a detectable signal was significantly less than that observed with gliomas (9 ± 4.6 % of astrocytes and 17.9 ± 5.9 % of neurons) (Figure 2a). Additionally, the intensity of the fluorescent signal emitted from labeled glioma cells was higher than that from labeled primary cells. Notably, many fluorescent aggregates were typical of labeled glioma cells while only one or two were observed in the rare primary cells that demonstrated fluorescence (Figure 1). Thus, compared to glial and neuronal primary cell cultures established from rat, five glioma cell lines originating from three different species demonstrated markedly more intense labeling in a larger proportion of cells. Thus, enhanced peptide internalization

and/or retention are properties widely shared among glioma cells from diverse origins.

To determine if unlabelled cells in the above fluorescence assay had accumulated peptide below detectable levels, we next evaluated peptide incorporation using the more sensitive fluorescence-activated cell sorting (FACS) technique. Cells were incubated for 1 hour with media containing increasing concentrations of carboxyfluorescein-tagged peptide. To discriminate between potentially nonspecific membrane-bound versus internalized fluorochrome, peptide-treated cells were incubated with trypsin prior to FACS analysis.²¹ At 10 $\mu\text{mol/l}$ of carboxyfluorescein-tagged peptide, 95.4 ± 3.3 % of 9L and 32.7 ± 4.3 % of F98 cells internalized the peptide, while at 20 $\mu\text{mol/l}$ most glioma cells internalized the peptide (100 ± 0.3 % of 9L and 72.1 ± 6.9 % of F98 glioma cells). In contrast, a markedly lower proportion of primary astrocytes were positive at all concentrations of peptide evaluated (Figure 2c). Neurons were

not amenable to FACS analysis because of their adherent properties. Thus, even at a five times higher concentration than for immunocytochemistry, these FACS results show that the peptide preferentially penetrates in glioma cells than in primary cells.

We next sought to gain insight into the mechanism supporting preferential uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide by rat F98 and 9L glioma cells. To achieve this, we first evaluated the relative contributions of the two well-characterized mechanisms through which cells are known to internalize peptide, endocytosis and direct translocation. To test the endocytosis pathway, F98 and 9L cells were exposed to peptide and incubated at 4°C or in an ATP-depleted state achieved through preincubation with sodium azide and deoxyglucose. Under both conditions, significantly reduced uptake was observed indicating that peptide internalization occurs through an energy-dependant mechanism implicating endocytosis (Figure 2d,e). Nonetheless, under these experimental conditions, uptake was not abolished suggesting that direct translocation of the peptide also occur. Similar results were obtained with human (T98G and U87) and mouse (GL261) glioma cells (Supplementary Figure S1).

We showed previously that TBS containing peptides interfere with normal tubulin dynamics.²⁰ To investigate the effects of internalized NFL-TBS.40-63 further, we treated cultured cells with peptide or vehicle alone and evaluated intracellular tubulin distribution, cell shape, migration, and viability *in vitro*. While F98 and 9L cells, either untreated or treated with vehicle alone, were large, flat, and filled with a dense network of microtubules, cells that internalized detectable levels of NFL-TBS.40-63 typically became spherical, lost their pronounced microtubule network, and developed large aggregates (Figure 1a). As previously shown, some of these aggregates co-label for tubulin and the peptide.²⁰ Obvious microtubular perturbations were observed in 82 ± 3 % of the F98 cells and 76.7 ± 5.8 % of the 9L cells that accumulated detectable peptide. In contrast, only 4.7 ± 0.6 % of astrocytes and 8.5 ± 1.5 % of neurons with detectable peptide demonstrated any obvious microtubular disruptions (Figure 2b). A similarly low incidence of microtubule disruption was observed in glioma cells, primary astrocytes, and neurons following culture in media containing the same concentration of the randomly scrambled NFL-TBS.40-63 peptide designated NFL-SCR. Similar results were obtained with the human T98G and U87 and mouse GL261 glioma cell lines (Supplementary Figure S1a,b).

NFL-TBS.40-63 peptide specifically reduces viability, proliferation, and migration of malignant glioma cells

To evaluate cell viability following peptide treatment, F98 and 9L glioma cells and astrocytes were incubated for 72 hours in media containing vehicle alone, NFL-TBS.40-63 or NFL-SCR at 100 µmol/l. Following exposure to media containing the NFL-TBS.40-63 peptide, an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay revealed that F98 and 9L cells had viability reduced by 60.8 ± 2.8 % and 30.0 ± 4.4 %, respectively. In contrast, exposure to vehicle alone or to NFL-SCR had no measurable effect in either cell type (Figure 3a).

Cell viability was evaluated next using a trypan blue dye exclusion assay in which only nonviable cells with damaged membranes label. As observed with the MTS assay, exposure to the NFL-

TBS.40-63 peptide reduced viability of F98 and 9L gliomas while similarly treated astrocytes were unaffected (Figure 3b).

To evaluate the effect of peptide concentration on viability, we conducted a dose-response study in which cells were exposed to peptide for 72 hours (Figure 3c). The peptide concentration required to reduce viability 50% (IC₅₀) was 17.3 µmol/l for F98 and 23.2 µmol/l for 9L cells. Similar results were obtained with mouse GL261 and human T98G and U87 cell lines (Supplementary Figure S2). In contrast, primary rat astrocytes were unaffected at all concentrations of peptide tested.

We next investigated the effect of peptide exposure on cell proliferation. Treatment of glioma cells with 100 µmol/l of NFL-TBS.40-63 peptide for 72 hours reduced 5-bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in both F98 and 9L cultures by 78.2 ± 3.0 % and 34.8 ± 2.6 %, respectively (Figure 3d). Similar results were obtained with both human and mouse cells (Supplementary Figure S2). In contrast, exposing primary rat astrocytes to a similar peptide concentration had no effect on BrdU incorporation. Similarly, exposure to the NFL-SCR peptide had no effect on either glioma cells or astrocytes.

To determine if the toxic effect of the peptide is mediated through an apoptotic mechanism, as observed for other microtubule-binding drugs, F98, 9L glioma cells and astrocytes were incubated for 72 hours with 100 µmol/l of the peptide or vehicle alone, stained with propidium iodide (PI) and labeled for annexin V. Viable cells with intact membranes exclude PI, while in cells undergoing apoptosis, phospholipid phosphatidylserine (PS) translocates from the inner to the outer membrane leaflet and thus can be labeled with annexin V. FACS analysis revealed that the percentage of peptide-treated F98 cells demonstrating early (annexin V) and late (PI) apoptotic markers was, respectively, 2.3 and 3.4 times higher than in vehicle-treated cultures. Similarly, 9L cells displayed a 7.1-fold increase in the number of cells with the early apoptotic markers and a 2.3-fold increase with the late apoptotic markers. Consistent results were observed with all human and mouse glioma cell lines (data not shown) demonstrating that the toxic effect of the peptide is mediated through apoptosis. In contrast, astrocytes were far less affected by the NFL-TBS.40-63 peptide showing only a 0.1- and 0.5-fold increase, of early and late apoptotic markers, respectively.

As glioblastomas are highly invasive and the tubulin cytoskeleton plays a critical role in multiple aspects of cell movement, we next investigated if NFL-TBS.40-63 peptide exposure affected the capacity of F98 cells to migrate. Cultures were exposed to peptide concentrations of 1, 5, and 10 µmol/l, and the capacity of cells to migrate was assessed using a Transwell assay (Figure 3e). Although a small change in migratory activity was induced by exposure to 1 µmol/l peptide, inhibition ~50% and 60% was observed on exposure to peptide at 5 µmol/l and 10 µmol/l, respectively. Similarly, inhibition of U87-MG human glioma cell migration began at low peptide concentration (5 µmol/l) and was higher at a peptide concentration of 10 µmol/l (Supplementary Figure S2e). As rat 9L glioma cells show limited migratory capacity under normal culture conditions,^{22,23} they were not similarly evaluated. Notably, chronic exposure of F98 or U87 cells to 5 µmol/l peptide concentration does not lead to obvious disruption of their tubulin cytoskeleton nor cytotoxicity. Thus, apparently subtle peptide-induced perturbations of tubulin cytoskeletal function can significantly attenuate the migratory capacity of glioma cells.

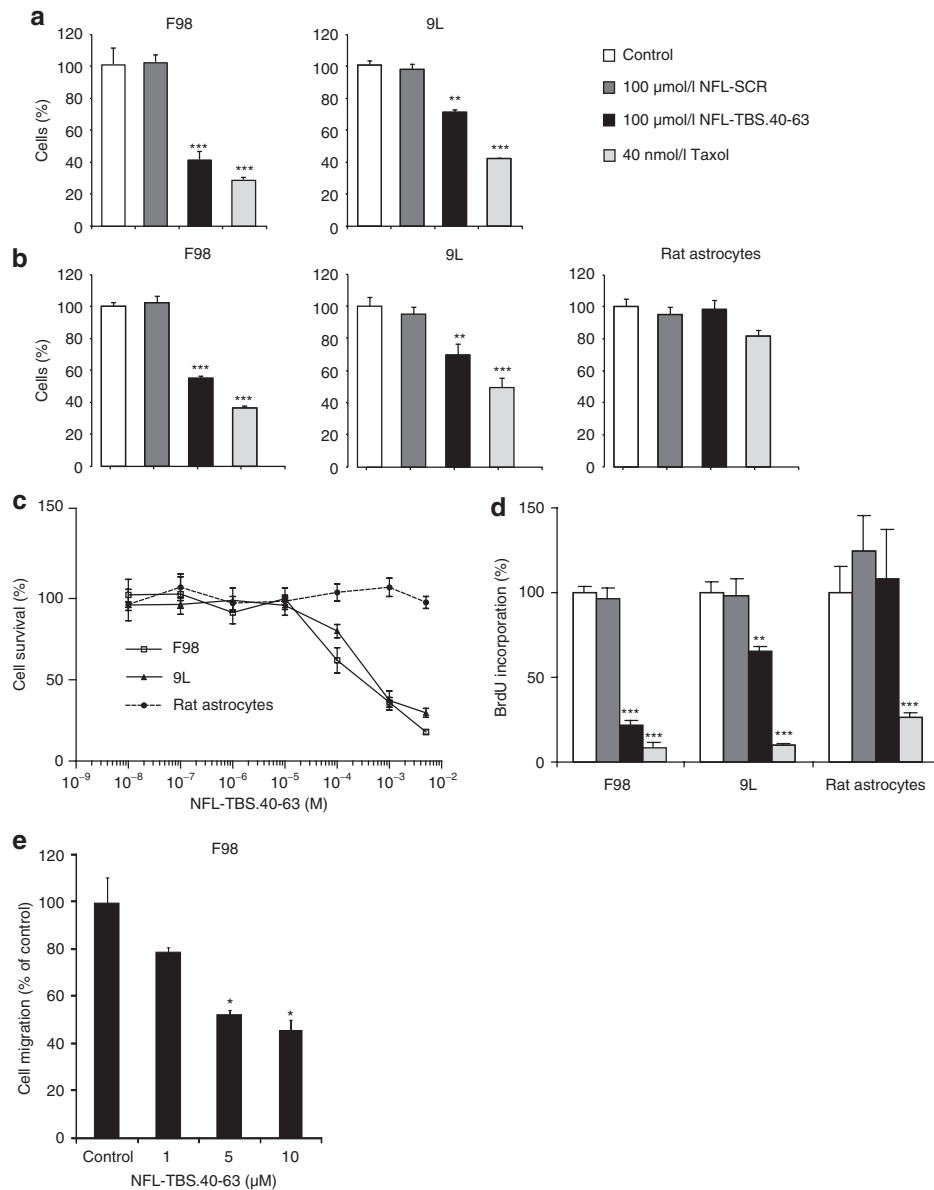


Figure 3 *In vitro* effects of NFL-TBS.40-63 peptide on viability, proliferation, and migration of rat malignant glioma cell lines and primary astrocytes. **(a)** The NFL-TBS.40-63 peptide reduces the viability of rat F98 and 9L glioma cells. Cells were exposed for 72 hours to the NFL-TBS.40-63 peptide (100 $\mu\text{mol/l}$), NFL-SCR (100 $\mu\text{mol/l}$), or, as a positive control, Taxol (40 nmol/l). The MTS cytotoxicity assay reveals an increase in cell death in those cells treated with the NFL-TBS.40-63 peptide, or taxol, while NFL-SCR had no similar effect. **(b)** A trypan blue exclusion assay revealed a similar reduction in the viability of rat F98 and 9L glioma cells incubated with the NFL-TBS.40-63 peptide. Results are expressed as percent of viable cells in treated relative to control cultures. **(c)** Viability of rat astrocytes, F98, and 9L glioma cells after 72 hours of exposure to different concentrations of NFL-TBS.40-63. The concentration of peptide necessary to reduce viability, evaluated using the MTS cytotoxicity assay, to 50% (IC_{50}) was 17.3 $\mu\text{mol/l}$ for F98 and 23.2 $\mu\text{mol/l}$ for 9L cells. In contrast, peptide exposure at even the highest concentration had no major effect on astrocyte viability. **(d)** The NFL-TBS.40-63 peptide inhibits DNA synthesis in rat F98 or 9L glioma cells but not in astrocytes. Cells were treated as above and incubated with BrdU (1 mg/ml) for 4 hours. Results are expressed as percent of cells incorporating BrdU in treated versus control cultures. The NFL-TBS.40-63 peptide reduced DNA synthesis in both glioma cell lines but not in astrocytes while NFL-SCR treatment had no effect in any cell type. **(e)** Migration of F98 glioma cells following 15 hours of exposure to different concentrations of NFL-TBS.40-63 peptide. In a transwell migration assay, peptide treatment caused significant inhibition first recognized at the noncytotoxic concentration of 5 $\mu\text{mol/l}$. Asterisks indicate significant level versus control $^{**}P < 0.005$; $^{***}P < 0.001$. BrdU, 5-bromodeoxyuridine; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; NFL, neurofilament light; SCR, scrambled; TBS, tubulin-binding site.

The NFL-TBS.40-63 peptide is internalized by glioma cells and inhibits their proliferation in a transplant model

We next used a transplant preparation in which F98 glioma cells were transplanted by stereotaxy to the striatum of rats. Six days following

transplantation, animals were injected at the original transplant site with vehicle alone or 60 μl of NFL-TBS.40-63 peptide (5 mmol/l) to determine if peptide could be internalized by tumor cells *in vivo*. At post-transplant days 16, 24, or 30 (*i.e.*, post-peptide administration days 10, 18, and 24), animals were killed and serial coronal brain

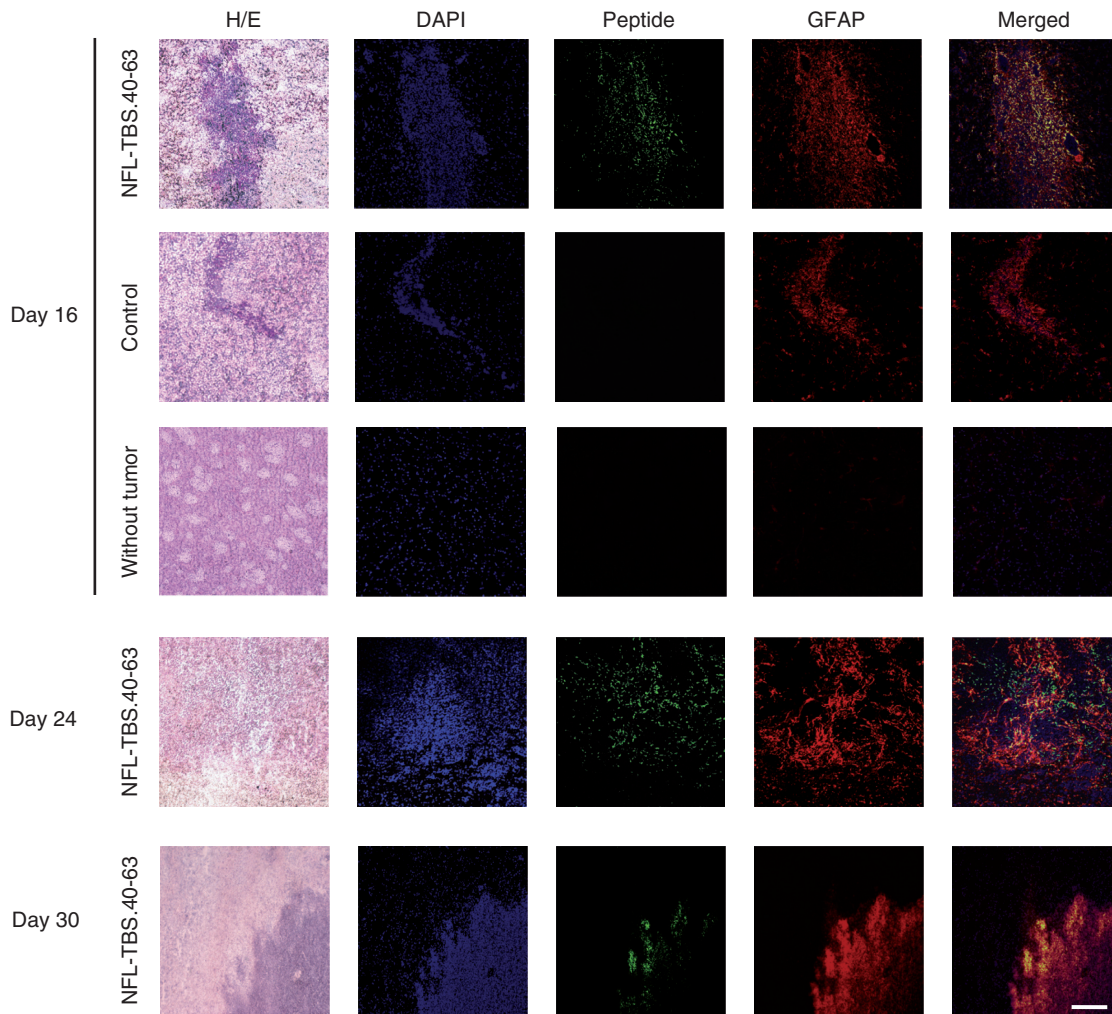


Figure 4 In the brain, the NFL-TBS.40-63 peptide is selectively internalized by glioma cells. F98 glioma cells were transplanted to the striatum by stereotaxic injection. Six days later, 60 μm of NFL-TBS.40-63 peptide or PBS were injected at the same stereotaxic coordinates. Normal rats (without tumor) were injected with the peptide according to the same procedure. Animals were killed at 16, 24, and 30 days following tumor transplantation. Coronal brain sections were immunolabeled for glial fibrillary acidic protein (GFAP) (red), to identify glioma cells, and with Alexa-Fluo labeled Avidin to reveal the NFL-TBS.40-63 peptide (green). To evaluate tumor-related changes in cellularity, sections also were stained with DAPI and hematoxylin and eosin (H/E). At all post-transplant times examined, NFL-TBS.40-63 peptide was detected only in GFAP⁺ glioma cells, demonstrating its selective uptake. In brains without transplanted glioma cells, the injected peptide was undetectable from the earliest postinjection age examined (10 days). *White bars, 100 μm .* DAPI, 4'-diaminido-2-phenylindole; NFL, neurofilament light; SCR, scrambled; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, tubulin-binding site.

sections were analyzed by immunofluorescence for the presence of the NFL-TBS.40-63 peptide (**Figure 4**).

Glioma cells were recognized by intense glial fibrillary acidic protein (GFAP) labeling and, at the multiple post-peptide injection ages examined, most appeared to co-label for peptide. In contrast, no fluorescence nor observable lesion was detectable in the brains of peptide-injected rats that did not first receive a glioma cell transplant (**Supplementary Figure S3**). These observations indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide can be internalized by glioma cells growing *in vivo*. They also suggest that the peptide is eliminated from the injection site in normal brains, and possibly from normal brain regions in tumor-bearing rats.

To determine if the NFL-TBS.40-63 peptide inhibited tumor growth *in vivo*, serial brain sections were stained with hematoxylin and eosin, and the size of the tumor was evaluated by morphometry. Relative to tumors treated with vehicle alone, those treated with

NFL-TBS.40-63 were significantly smaller; volume of peptide-treated tumors was reduced at post-transplant days 16 by $71.7 \pm 18.9\%$, day 24 by $72.0 \pm 21.2\%$, and day 30 by $42.8 \pm 11.3\%$ (**Figure 5a,b**).

Tumor size also was evaluated using magnetic resonance imagery (MRI) where intense signals emanating from the right striatum were detected (**Figure 5c**). Consistent with morphometry, MRI analysis at post-transplant day 24 demonstrated that peptide-treated animals had tumor volumes reduced by 63.5% compared to those treated with vehicle alone (**Figure 5b**). Recorded tumor volumes of $0.093 \pm 0.03 \text{ cm}^3$ for peptide-treated and $0.25 \pm 0.06 \text{ cm}^3$ for vehicle treated animals are slightly larger than those determined by morphometry, and this difference is attributed to an overestimation of tumor size by MRI that also recognizes peritumor edema.²⁴

The clinical condition of the rats was monitored daily and while weight loss was experienced by all tumor-bearing animals,

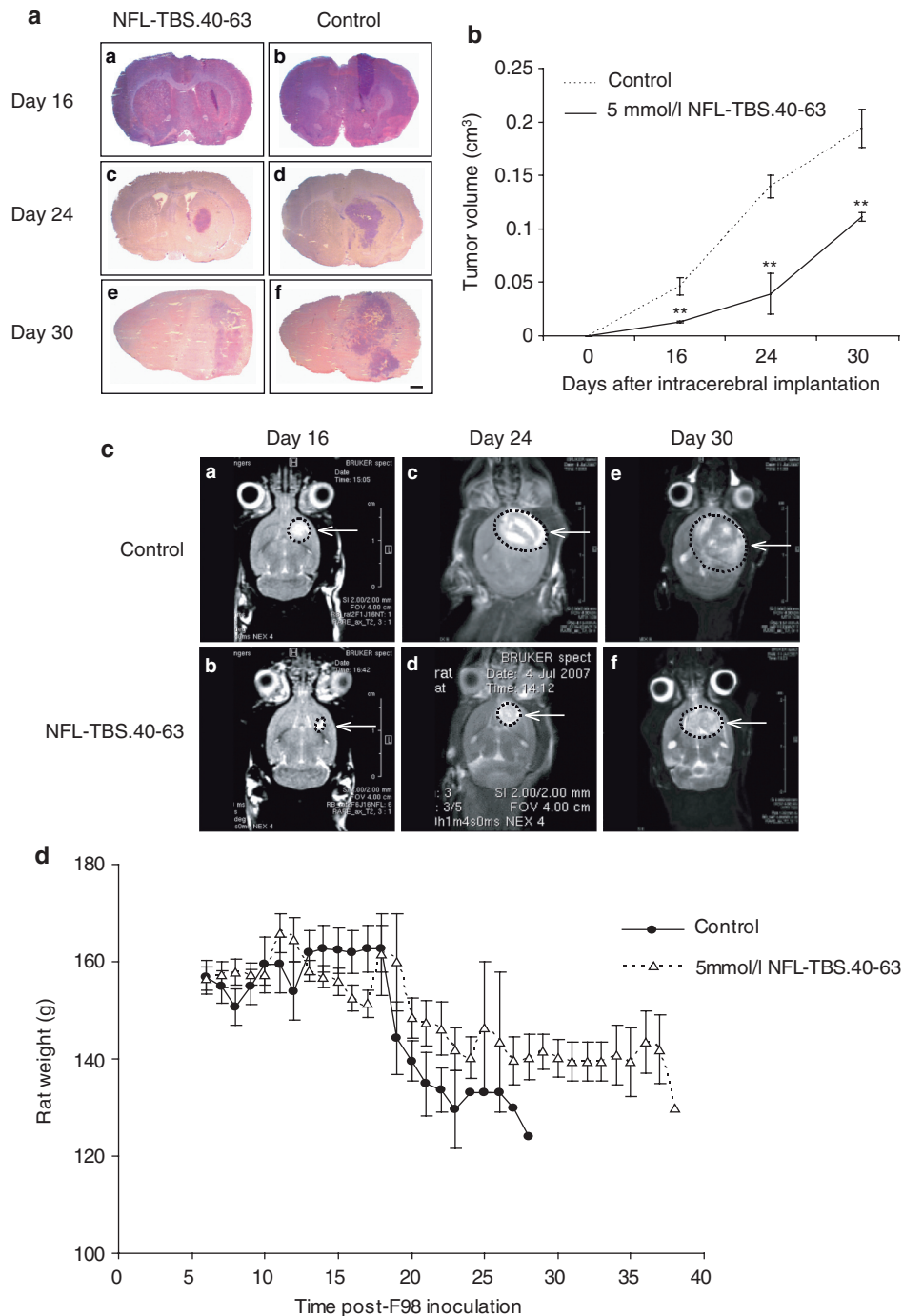


Figure 5 Intracerebral administration of the NFL-TBS.40-63 peptide reduces tumor growth. **(a)** Typical coronal sections of brains stained with hematoxylin and eosin (H/E) from rats treated with the NFL-TBS.40-63 peptide (A, C, E) or saline (B, D, F). Brains were recovered at 16 (A, B), 24 (C, D), and 30 days (E, F) following glioma cell transplantation. *Black bars*, 1 mm. **(b)** Tumor volumes in NFL-TBS.40-63-treated and control animals (mean \pm SEM of three animals per treatment group at each post-transplant age). Tumor volume was determined by histomorphometry on serial sections. Compared to controls, tumor volume in rats treated with the NFL-TBS.40-63 peptide is reduced by 72% at 16 and 24 days post-transplantation, and by 42.8% at 30 days post-transplantation. Asterisks indicate significant level versus control $**P < 0.005$. **(c)**: T2-weighted axial magnetic resonance images of rat brains treated with NFL-TBS.40-63 peptide (A, C, E) or vehicle (B, D, F), at days 16, 24, or 30. MRI evaluation revealed a similar reduction in tumor volume following NFL-TBS.40-63 peptide treatment. **(d)** Mean weights of glioma-bearing animals following peptide or vehicle treatment. MRI, magnetic resonance imagery; NFL, neurofilament light; TBS, tubulin-binding site.

those treated with NFL-TBS.40-63 peptide lost significantly less (Figure 5d). As seen with all parameters evaluated *in vitro*, treatment with NFL-SCR had no effect and relative weight loss was similar to untreated rats (data not shown). Consistent with the

absence of obvious lesions in rats exposed to peptide alone, no weight loss or clinical signs were observed when nontransplanted rats were injected with the NFL-TBS.40-63 peptide (data not shown). Thus, a single intracerebral injection of peptide, at a

concentration that significantly attenuates glioma growth, is tolerated by the normal brain.

DISCUSSION

The NFL-TBS.40-63 peptide is derived from the neurofilament light protein and encompasses a TBS. Of all TBS containing peptides so far examined, NFL-TBS.40-63 demonstrates the highest capacity to inhibit microtubule formation in an *in vitro* polymerization assay. Our previous studies also showed that this peptide is internalized by T98G glioblastoma cells where it disrupts their microtubule cytoskeleton and inhibits proliferation.²⁰ In this investigation, we evaluated the potential glioma specificity of internalization and downstream consequences by comparing the antimetabolic and toxic effects of peptide exposure on primary astrocytes and neurons and on multiple malignant gliomas derived from different species. We show that the NFL-TBS.40-63 peptide is internalized more efficiently *in vitro* by glioma cells than by either primary astrocytes or neurons and that this difference is not species specific. Moreover, once internalized by glioma cells, the peptide strongly affected their microtubule network, attenuated proliferation, and led to apoptosis, a cell death mechanism shared by multiple cancer cells when treated with antimetabolic drugs.²⁵ While the mechanism that leads to disruption of the microtubule cytoskeleton remains to be investigated, physical associations between tubulin and the peptide are suggested by the results of the *in vitro* tubulin polymerization assay and their frequent co-localization when cells containing peptide are observed by confocal microscopy.²⁰ Also, it is thought that glioblastoma motility relies on microtubules, and consistent with this notion, noncytotoxic concentrations of Taxol and Vinca alkaloids can impede their migration.^{26,27} Similarly, a noncytotoxic concentration of the NFL-TBS.40-63 peptide was found to attenuate glioblastoma migration.

Based on the observations that levels of peptide accumulation could be saturated and uptake was attenuated, but not abolished, at reduced temperature (4°C) or after ATP depletion, peptide internalization appears to involve both endocytosis and direct translocation. As neither the scrambled peptide (NFL-SCR) nor its D-amino acid analogue were internalized,²⁰ the uptake mechanism appears to display peptide specificity. Also, human prostate, epithelial carcinoma and mouse immortalized fibroblast NIH-3T3, accumulated the NFL-TBS.40-63 peptide to lower levels that had little effect on their microtubule cytoskeletons (**Supplementary Figure S4**). In further demonstration of peptide-specific properties, a peptide encompassing a vimentin TBS, while readily internalized by glioblastoma cells, had no effect on their microtubule network or proliferation.²⁸ These combined observations illuminate numerous mechanisms through which significant specificity affecting both targeting and downstream activities are realized.

The preferential uptake of peptide by glioma cells demonstrated *in vitro* also was observed when the peptide was injected into the brains of glioma-bearing animals. Further, the peptide was cleared entirely from the brains of normal animals. Several mechanisms could account for this selectivity including expression by glioma cells of a cell surface receptor recognizing the peptide or different membrane properties associated with rapid proliferation. Persistence of strong fluorescent signals in glioma cells in animals killed up

to 24 days following peptide administration suggests that, subsequent to peptide internalization, peptide concentration was not diluted by rapid proliferation. While apoptosis is the common end to most cells treated with microtubule-disrupting agents, including glioma cells treated with the peptide *in vitro* (shown here), glioma cells internalizing the peptide *in vivo* appear capable of long-term survival albeit with their proliferative, and presumably migratory, capacities attenuated. The mechanisms conferring such differences are currently unknown but must reflect major differences between the two dimensional microenvironment *in vitro* and that provided *in vivo* within a tumor growing in the brain.

In addition to the NFL-TBS.40-63 peptide investigated here, other peptides identified in phage-display peptide libraries have been shown to target malignant glioma cells.²⁹⁻³² In an effort to exploit the therapeutic potential of such tropism, several of these have been ligated to anticancer drugs.³¹ However, such conjugation has the potential to alter biological activity and limit their application as vectors. In contrast, the autonomous tubulin-binding capacity of the unaltered NFL-TBS.40-63 peptide attenuates glioma cell movement and confers antimetabolic activity. In support of its potential therapeutic potential, we demonstrate here that a single injection of the peptide into a transplanted F98 glioma markedly attenuates glioma growth and disease course. These results, combined with the observation that a therapeutically effective dose was well tolerated by normal brain tissue, lead to the suggestion that the peptide may have utility as a primary or supplemental treatment modality for a malignant glioma.

MATERIALS AND METHODS

Synthetic peptides. Biotinylated or carboxyfluorescein-labeled peptides corresponding to the TBS of NFL (NFL-TBS.40-63: YSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS) and similarly labeled scrambled peptides (NFL-SCR: SLGSPSSSVRASYSRRSYVYSSS) were synthesized (more than 95% purity) by Millegen (Toulouse, France) and dissolved in water at a concentration of 1 or 5 mmol/l.

Cell culture. Rat F98 and 9L glioma cell lines, as well as human T98G and U87-MG glioma cell lines, were obtained from ATCC (Manassas, VA). Mouse GL261 glioma cell lines were kindly provided by Dr Paul R Walker (Geneva University Hospital). They were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) media with glucose and L-glutamine (Lonza, Levallois-Perret, France), containing 10% fetal calf serum (Lonza), 1% penicillin/streptomycin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in humidified incubator gassed with 5% CO₂ (37°C) until reaching 80–90% confluence. Normal human astrocytes were obtained from Lonza (Reference CC-2565 NHA-Astrocytes AGM, Levallois-Perret, France) and grown in AGM Astrocyte Growth Medium (Lonza) in humidified incubator gassed with 5% CO₂ (37°C) until reaching 70–80% confluence.

Rat primary astrocytes and mouse primary astrocytes were obtained from cultures of cerebral cortex as originally described.³³ Briefly, the cerebral cortex was dissected from newborns, and cells were recovered after tissue homogenization, trypsinization, and centrifugation. They were grown during 3 weeks in DMEM media with glucose and L-glutamine (Lonza), containing 10% fetal calf serum (Lonza), 1% penicillin/streptomycin (Sigma) in humidified incubator gassed with 5% CO₂ (37°C).

Hippocampal neuronal cultures were prepared from newborn rat or mouse brains according to the methods of Ray *et al.* and Kaech and Banker.^{34,35} Briefly, the hippocampi of animals younger than 2 days were recovered, minced, and digested in 0.01% trypsin for 1 hour at 37°C. Dissociated cells were plated on coverslips precoated with 5 µg/ml

poly-L-lysine and 7 µg/ml collagen at densities of 2×10^5 /ml and incubated at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere. Twenty-four hours later, the plating solution was replaced by B-27 neurobasal medium, and the second day cytosine arabinoside (20 µmol/l) was added to eliminate non-neural cells. Experiments were performed 7 days after plating.

Analysis of cell viability and proliferation. The effects of peptides on the viability of glioma cells or astrocytes were evaluated by the MTS cytotoxicity assay and by counting directly the number of cells. For the MTS assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), 500 cells were seeded in 96-well plates, incubated at 37°C for 24 hours followed by incubation with peptides (100 µmol/l), Taxol (40 nmol/l) or vehicle (DMEM) for 72 hours. Media and peptides were replaced daily. Peptides were prepared in DMEM, and Taxol (Paclitaxel; Sigma) was dissolved in dimethylsulfoxide at a concentration of 2 mmol/l and further diluted into DMEM (40 nmol/l). Viability was also determined by trypan blue staining. For manual counts, cells were treated with 0.25% trypsin/0.53 mmol/l EDTA, centrifuged, and counted with a hemacytometer following addition of trypan blue dye. At each time, 3–6 wells per treatment were counted.

To assess cell proliferation, we used BrdU immunohistochemistry. Cells were plated on coverslips and cultured in media containing biotinylated peptides (100 µmol/l) for 72 hours, and incubated during 4 hours in the presence of 1 mg/ml BrdU (Sigma). Cells were then washed in phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 3% paraformaldehyde for 10 minutes, and permeabilized with 1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. Cells were acidified to denature the DNA (2 N HCl, 10 minutes), neutralized (0.1 mol/l sodium borate, 10 minutes) and then rinsed extensively in PBS. After blocking with 10% NGS (10 minutes), the cells were labeled with monoclonal anti-BrdU antibody (1/400) followed by Alexa 568 nm anti-mouse antibody (1/200). Nuclei were stained with 4'-diaminido-2-phenylindole (Sigma). The stained cells were observed with a Leica DMI6000 inverted microscope. Images were acquired with a CoolSNAP-HQ2 camera and analyzed with Metamorph 7.1.7.0 software. Minimums of 200 cells were scored for BrdU incorporation, and experiments were repeated at least three times.

Flow cytometry. To evaluate the internalization of fluorescein-labeled NFL-TBS.40-63 peptide by FACS, glioma cells or astrocytes were seeded in 35-mm dishes and cultured for 1 hour at 37°C in media containing fluorescein-labeled NFL-TBS.40-63 peptide at increasing concentrations or with vehicle (PBS). Cells were trypsinized, washed twice in cold PBS before incubation with trypsin (1 mg/ml) during 15 minutes at 37°C. To investigate the energy-dependant uptake mechanism, cells were incubated at 4°C with 20 µmol/l fluorescein-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (after 15 minutes of 4°C preincubation), or with 10 mmol/l sodium azide in the presence of 6 mmol/l 2-deoxy-D-glucose for 1 hour to deplete cellular ATP before addition of 20 µmol/l fluorescence-labeled NFL-TBS.40-63 peptide. Cells were then washed once, resuspended in 500 µl containing 50 µg/ml PI (Sigma), and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer. Experiment on each cell type was repeated three times; 20,000 events per sample were analyzed in each experiment.

To detect possible apoptotic processes, cells were seeded in 35-mm dishes and cultured in media containing biotinylated peptides (100 µmol/l) or PBS alone for 72 hours. Paclitaxel (40 nmol/l) was used as a positive control to induce apoptosis.³⁶ Cells were then trypsinized, washed in cold PBS, and stained with annexin V-FITC (BD Pharmingen, Le Pont-De-Claix, France) in annexin buffer for 15 minutes at room temperature. Finally, they were counterstained with 50 µg/ml PI (Sigma) and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer. Experiment on each cell type was repeated three times; 20,000 events per sample were analyzed in each experiment.

Immunocytochemistry. Cells were plated on coverslips and cultured in media containing biotinylated peptides (10 µmol/l) for 6 hours. Following PBS washing, the cells were fixed for 10 minutes in 4% paraformaldehyde

and washed three times in PBS. They were then incubated for 10 minutes in a 0.5% triton X-100 permeabilization solution and washed three times in PBS before incubation in a blocking solution (5% bovine serum albumin) for 15 minutes. Glioma cells and astrocytes were incubated overnight at 4°C with mouse anti-β-tubulin antibody (Sigma) 1/200, and neurons with mouse anti-βIII-tubulin antibody 1/200. Tubulin and biotinylated peptides were localized using, respectively, Alexa 568 nm anti-mouse antibody and streptavidin Alexa 488 nm (Molecular Probes) 1/200 for 1 hour, followed by washing in PBS. The preparations were counterstained with 3 µmol/l 4'-diaminido-2-phenylindole (Sigma) for 5 minutes and washed twice with PBS. Coverslips were mounted with an antifading solution.

Observations were carried out with an Olympus confocal microscope (BX50) using Fluoview.3.1. Software or a Leica DMI6000 inverted microscope. Images were acquired with a CoolSNAP-HQ2 camera and analyzed with Metamorph 7.1.7.0 software. We counted cells positive for peptide staining and cells with destroyed microtubule network. To evaluate the number of cells containing the peptide, several fields of the slide were analyzed with a ×40 or a ×63 objective and using a fluorescent microscope. Experiments on each cell type were repeated at least three times, and minimums of 200 cells per slide were analyzed for each experiment.

Transwell migration assay. Cells were seeded on the upper side of 8-µm-pore-size transwell migration chamber (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) at a concentration of 5×10^4 cells/well in 200 µl of DMEM-free medium. The lower chamber was filled with 700 µl of DMEM medium with 10% fetal bovine serum. After 15 hours of treatment, cells on the top-side of the filter were removed by scrubbing twice with a tipped swab, then cells on the lower side were fixed with 1% glutaraldehyde (VWR, Strasbourg, France) for 10 minutes and stained with 1% crystal-violet solution in 20% methanol for 10 minutes. After washing and drying, pictures of the cells were taken using a Leica Macroscope equipped with a Leica DFC420-C (Leica Microsystems, Berlin, Germany). Five fields per condition were imaged, and transmigrated cells were counted. Results were expressed as percent of transmigrated cells compared with no treatment condition. At least three independent experiments were performed for each condition.

Animal studies. Nine- to 10-week-old Female syngeneic Fisher 344 rats were obtained from Charles River Laboratories France (L'Arbresle, France). The animals were housed in a temperature and humidity-controlled room with 12-hour on-off light cycles, and given free access to food and water.

Intracerebral tumor transplantation. All experimental procedures and animal care were carried out in conformity with the guidelines of the French Government and approved by the Regional Committee for Ethics on Animal Experiments. Rat F98 cells at 70% confluency were trypsinized, counted with a hemacytometer, and checked for viability by trypan blue exclusion. Cells were washed twice in DMEM, and a final suspension of 5×10^4 cells/ml in DMEM was obtained. Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine 10% (0.8 µl/g) and xylazine 2% (0.5 µl/g). Using a stereotaxic frame (David Kopf instruments, Tujunga, CA), a sagittal incision was made through the skin to expose the cranium, and a small dental drill was used to make a burr hole in the skull 1 mm anterior and 2 mm lateral to the bregma. A volume of 10 µl of DMEM alone or containing 500 tumor cells was injected at a flow rate of 2 µl/minute using a 10-µl Hamilton syringe (Hamilton glass syringe 700 series RN) with a 32-G needle (Hamilton, VWR), at a depth of 4 mm deep from the outer border of the cranium into the striatum of the rat. The needle was left in place for an additional 5 minutes to avoid expulsion of the suspension from the brain, and then slowly withdrawn (0.5 mm/minute).

Convection-enhanced delivery procedure. Six days following glioma implantation, 60 µl of peptide or vehicle were injected at the same coordinates using a 10-µl Hamilton syringe with a 32-G needle. This syringe was connected to a 100-µl Hamilton 22-G syringe containing the peptide (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) through a cannula (CoEx™ PE/

PVC tubing, Harvard Apparatus). Slow-infusion convection-enhanced delivery was performed with an osmotic pump (Harvard Apparatus) at a rate of 0.5 µl/minute for 2 hours to achieve a total volume of 60 µl. After infusion, the needle was removed and the wound sutured.

Following intracerebral tumor cell implantation (day 0), rats were randomized into four groups. Six days postimplantation (day 6), the rats were treated by convection-enhanced delivery as follows: group 1: controls (60 µl of vehicle; $n = 10$); group 2: 60 µl of 1 mmol/l NFL-TBS.40-63 peptide ($n = 7$); group 3: 60 µl of 1 mmol/l NFL-SCR peptide ($n = 7$); group 4: 60 µl of 5 mmol/l NFL-TBS.40-63 peptide ($n = 7$).

The animals were monitored each day for weight loss, ataxia, and periorbital hemorrhage.³⁷ Animals were killed when affected by hemiplegia or 20% weight loss. Animals were killed at post-tumor transplant day 16, 23, and 30 ($n = 3$ /group) and brains removed, frozen in isopentane cooled to -30°C and stored at -80°C .

Tumor volume evaluation. Frozen brains were serially sectioned using a Leica cryostat, and 20-µm sections were hematoxylin and eosin-stained for histomorphology and measures of the tumor volume. Images of hematoxylin and eosin-stained sections were captured with a Leica Z16APO microscope using the Leica Application Suite 2.8.1 Software. The tumor area was manually outlined and measured using Image J software. Knowing the thickness and the number of sections, we calculated the total volume of each tumor. Tumor volumes were measured for three animals per group.

For immunohistochemistry, 12-µm sections were fixed with cold methanol during 10 minutes, washed three times in PBS, before blocking at room temperature for 1 hour with PBS 5% bovine serum albumin. Sections were incubated with mouse anti-GFAP antibody (Sigma) diluted 1/200 in PBS 5% bovine serum albumin overnight, and then rinsed with PBS (3 × 5 minutes). Staining of intermediate filaments such as GFAP, vimentin or synemin can be used as markers for rat or human glioma cells.^{38,39} GFAP and biotinylated peptides were localized using, respectively, anti-mouse antibody Alexa 568 nm and streptavidin Alexa 488 nm (Molecular Probes, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), diluted 1/200 in PBS 5% bovine serum albumin for 90 minutes, followed by washing in PBS. The preparations were counterstained with 3 µmol/l 4'-diaminido-2-phenylindole (Sigma) for 5 minutes and washed twice with PBS. Slides were mounted with an antifading solution and observed with a Leica DMR fluorescence microscope and the Leica IM500 software.

MRI was performed with a Bruker Avance DRX 300 (Bruker, Wissembourg, France) apparatus equipped with a vertical superwide-bore magnet of 7T. Qualitative T2-weighted images were obtained using rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) sequence (TR = 2,000 ms; mean echo time (T_{em}) = 31.7 ms; RARE factor = 8; FOV = 3 × 3 cm; matrix 128 × 128; nine contiguous slices of 1 mm, eight acquisitions). ¹H-magnetic resonance spectroscopy was performed using a PRESS sequence with water suppression and cardiac triggering (Bruker). ¹H spectra were acquired with the following parameters: TR/TE = 1,500/11 ms; NEX = 128; voxel size 27 µl (3 × 3 × 3 mm), where TR is time of repetition, TE is time of echo, and NEX is number of excitations. The Bruker Paravision 2.1 Software (Bruker) was used to calculate tumor volumes by manual contour analysis on the MRI images. The total tumor volume was calculated as the summed area on all slices, multiplied by the slice thickness (2 mm).

Statistical analysis. Data are presented as mean ± SEM (bars). Cell counting, cellular viability data, and tumor volumes were analyzed by Student's *t* test using Prism version 3.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Asterisks indicate significant level versus control * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. NFL-TBS.40-63 peptide internalization and microtubule network disruption in glioma and primary cells from human or mouse.

Figure S2. *In vitro* effects of NFL-TBS.40-63 peptide on viability, proliferation and migration of human and mouse glioma cells and astrocytes.

Figure S3. The NFL-TBS.40-63 peptide has no effect on normal brain.

Figure S4. Internalization of the NFL-TBS.40-63 peptide by LNCaP, HeLa and NIH-3T3 cell lines, effects on their microtubule networks and proliferation.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques de l'Université d'Angers for assistance in confocal microscopy, C. Guillet and the Service Commun de Cytométrie et d'Analyse Nucleotidique de l'Université d'Angers, F. Franconi and the Service Commun d'Analyses Spectroscopiques de l'Université d'Angers. We are grateful to E. Garcion for advice in cell culture (INSERM, Angers, France), S. Jouaneton for help with tumor volume evaluation, and H. Friedman for comments on the manuscript. This investigation was supported by the Association Française contre la Myopathie (AFM), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Fonds Européens de Développement Régional (FEDER), Institut National du Cancer (INCA), and Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutiques (CIMATH) to J.E.R.B. and J.B. were supported by la Région des Pays de la Loire.

REFERENCES

- Westphal, M, Hilt, DC, Bortey, E, Delavault, P, Olivares, R, Warnke, PC *et al.* (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology* **5**: 79–88.
- Stupp, R, Mason, WP, van den Bent, MJ, Weller, M, Fisher, B, Taphoorn, MJ *et al.*; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 987–996.
- Katsetos, CD, Dráberová, E, Smejkalová, B, Reddy, G, Bertrand, L, de Chadarévian, JP *et al.* (2007). Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells. *Neurochem Res* **32**: 1387–1398.
- Collet, B, Guitton, N, Saikali, S, Avril, T, Pineau, C, Hamlat, A *et al.* (2011). Differential analysis of glioblastoma multiforme proteome by a 2D-DIGE approach. *Proteome Sci* **9**: 16.
- Rowinsky, EK (1997). The development and clinical utility of the taxane class of antimitotic tubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med* **48**: 353–374.
- Schiller, JH (1998). Role of taxanes in lung-cancer chemotherapy. *Cancer Invest* **16**: 471–477.
- Schrijvers, D and Vermorken, JB (1998). Update on the taxoids and other new agents in head and neck cancer therapy. *Curr Opin Oncol* **10**: 233–241.
- Wiseman, LR and Spencer, CM (1998). Paclitaxel. An update of its use in the treatment of metastatic breast cancer and ovarian and other gynaecological cancers. *Drugs Aging* **12**: 305–334.
- Budman, DR (1997). Vinorelbine (Navelbine): a third-generation vinca alkaloid. *Cancer Invest* **15**: 475–490.
- Jordan, MA and Wilson, L (1998). Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 123–130.
- Mollinedo, F and Gajate, C (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* **8**: 413–450.
- Dumontet, C and Sikic, BI (1999). Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol* **17**: 1061–1070.
- Giannakakou, P, Sackett, DL, Kang, YK, Zhan, Z, Buters, JT, Fojo, T *et al.* (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* **272**: 17118–17125.
- Kavallaris, M, Tait, AS, Walsh, BJ, He, L, Horwitz, SB, Norris, MD *et al.* (2001). Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res* **61**: 5803–5809.
- Holland, JF, Scharlau, C, Gailani, S, Krant, MJ, Olson, KB, Horton, J *et al.* (1973). Vincristine treatment of advanced cancer: a cooperative study of 392 cases. *Cancer Res* **33**: 1258–1264.
- Hussain, M, Wozniak, AJ and Edelman, MB (1993). Neurotoxicity of antineoplastic agents. *Crit Rev Oncol Hematol* **14**: 61–75.
- Martin, V (1993). Overview of paclitaxel (TAXOL). *Semin Oncol Nurs* **9**(4 Suppl 2): 2–5.
- Cavaletti, G, Cavaletti, E, Montaguti, P, Oggioni, N, De Negri, O and Tredici, G (1997). Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Neurotoxicology* **18**: 137–145.
- Windebank, AJ (1999). Chemotherapeutic neuropathy. *Curr Opin Neurol* **12**: 565–571.
- Bocquet, A, Berges, R, Frank, R, Robert, P, Peterson, AC and Eyer, J (2009). Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci* **29**: 11043–11054.
- Richard, JP, Melikov, K, Vives, E, Ramos, C, Verbeure, B, Gait, MJ *et al.* (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* **278**: 585–590.
- Stijiljkovic, M, Piperski, V, Dacevic, M, Rakic, L, Ruzdijic, S and Kanazir, S (2003). Characterization of 9L glioma model of the Wistar rat. *J Neurooncol* **63**: 1–7.

23. Van Meir, EG (2009). CNS cancer: models, markers, prognostic factors, targets, and therapeutic approaches.
24. Els, T, Eis, M, Hoehn-Berlage, M and Hossmann, KA (1995). Diffusion-weighted MR imaging of experimental brain tumors in rats. *MAGMA* **3**: 13–20.
25. Wang, TH, Wang, HS and Soong, YK (2000). Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* **88**: 2619–2628.
26. Terzis, A-J, Thorsen, F, Heesel, O, Visted, T, Bjerkvig, R, Dahl, O *et al.* (1997) Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to paclitaxel (Taxol) in vitro. *Br J Cancer* **75**: 1744–1752.
27. Panopoulos, A, Howell, M, Fotedar, R and Margolis, RL (2011). Glioblastoma motility occurs in the absence of actin polymer. *Mol Biol Cell* **22**: 2212–2220.
28. Balzeau, J, Peterson, A and Eyer, J (2012). The vimentin-tubulin binding site peptide (Vim-TBS.58-81) crosses the plasma membrane and enters the nuclei of human glioma cells. *Int J Pharm* **423**: 77–83.
29. Shadidi, M and Sioud, M (2003). Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. *Drug Resist Updat* **6**: 363–371.
30. Shadidi, M and Sioud, M (2003). Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *FASEB J* **17**: 256–258.
31. Ho, IA, Lam, PY and Hui, KM (2004). Identification and characterization of novel human glioma-specific peptides to potentiate tumor-specific gene delivery. *Hum Gene Ther* **15**: 719–732.
32. Wu, C, Lo, SL, Boulaire, J, Hong, ML, Beh, HM, Leung, DS *et al.* (2008). A peptide-based carrier for intracellular delivery of proteins into malignant glial cells in vitro. *J Control Release* **130**: 140–145.
33. McCarthy, KD and de Vellis, J (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* **85**: 890–902.
34. Ray, J, Peterson, DA, Schinstine, M and Gage, FH (1993). Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3602–3606.
35. Kaech, S and Banker, G (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* **1**: 2406–2415.
36. Terzis, AJ, Thorsen, F, Heese, O, Visted, T, Bjerkvig, R, Dahl, O *et al.* (1997). Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to paclitaxel (Taxol) in vitro. *Br J Cancer* **75**: 1744–1752.
37. Redgate, ES, Deutsch, M and Boggs, SS (1991). Time of death of CNS tumor-bearing rats can be reliably predicted by body weight-loss patterns. *Lab Anim Sci* **41**: 269–273.
38. Jing, R, Pizzolato, G, Robson, RM, Gabbiani, G and Skalli, O (2005). Intermediate filament protein synemin is present in human reactive and malignant astrocytes and associates with ruffled membranes in astrocytoma cells. *Glia* **50**: 107–120.
39. Mathieu, D, Lecomte, R, Tsanaclis, AM, Larouche, A and Fortin, D (2007). Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can J Neurol Sci* **34**: 296–306.

3^{ème} article

Structure-function analysis of the glioma targeting NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site on the light neurofilament subunit.

Raphael Berges, Julien Balzeau, Masayuki Takahashi, Chantal Prevost and Joel Eyer. *PLoS One* 7(11):e49436. doi: 10.1371/journal.pone.0049436.

Après l'étude des effets du peptide NFL-TBS.40-63 *in vitro* sur des cultures de cellules et *in vivo* chez des rats porteurs de gliome, nous nous sommes intéressés à la relation structure/fonction du peptide, afin d'identifier les acides aminés importants dans la séquence, leur rôle dans les propriétés d'inhibition de la polymérisation de la tubuline et de déstabilisation du réseau de MT sur les cellules de glioblastome humain T98G. Un premier criblage par la technique d'« Alanine scan » a été réalisé, consistant à changer chaque acide aminé par une alanine, puis chacun de ces peptides a été testé pour ses propriétés d'internalisation dans les cellules de gliome et de perturbation du réseau de MT. Certains acides aminés ont ensuite été remplacés par d'autres ayant des propriétés identiques, ou par des acides aminés phosphorylés. Une étude par dichroïsme circulaire a été effectuée sur certains de ces peptides pour déterminer d'éventuelles structures secondaires impliquées dans les fonctions du peptide. Enfin, à partir de ces résultats, une modélisation tridimensionnelle du peptide NFL-TBS.40-63 a été réalisée.

Afin d'étudier l'implication de chaque acide aminé dans l'internalisation et les effets du peptide NFL-TBS.40-63 sur les cellules de glioblastome T98G, chacun d'eux a été remplacé par une alanine, acide aminé le plus simple. Par marquages immunocytologiques des peptides, nous avons montré que chaque substitution de l'acide aminé original par une alanine diminuait l'internalisation dans les cellules, à l'exception des substitutions Ala6Ala, Ser21A1a et Ser24Ala (**Figure 1**). De plus, chaque substitution diminue la capacité du peptide résultant à perturber le réseau de MT par rapport au peptide original.

Pour les substitutions Tyr1Ala, Leu12Ala, Val14Ala et Arg16Ala, l'inhibition de l'incorporation est totale, impliquant un rôle majeur de ces acides aminés dans les fonctions du peptide. Afin de confirmer cette hypothèse, chacun de ces acides aminés a été remplacé par un acide aminé ayant une fonction chimique similaire : la tyrosine par la phénylalanine, la leucine par la valine, la valine par la leucine et l'arginine par la lysine. Les analyses

d'immunofluorescence montrent que ces substitutions permettent une restauration des propriétés d'internalisation et de perturbation des MT, ce qui indique l'importance de ces fonctions chimiques (**Figure 2**).

Les neurofilaments sont connus pour être des protéines phosphorylées, et ces phosphorylations sont essentielles à leur biologie, notamment pour leur assemblage ou le transport axonal. Yates et collaborateurs ont montré que la modification des sérines 2, 55 et 57 de NFL altérait le transport axonal (Yates *et al.*, 2009). Les sérines 55 et 57 se retrouvant dans la séquence du peptide NFL-TBS.40-63 aux positions 17 et 19, nous avons remplacé les sérines 17 et/ou 19 par des sérines phosphorylées ou par des acides aspartiques, capables de mimer une phosphorylation (**Figure 3**). Les différents peptides obtenus ont été testés de la même manière que précédemment, et ont montré une diminution de leur incorporation par les cellules T98G et des effets sur le réseau de MT. Ces résultats indiquent l'importance du statut de phosphorylation de ces deux sérines dans les propriétés du peptide NFL-TBS.40-63.

Une étude par dichroïsme circulaire a été réalisée afin de savoir si le peptide NFL-TBS.40-63 et plusieurs peptides issus de l'Alanine scan possèdent une éventuelle structure secondaire. Le peptide original présente un spectre avec une bande négative autour de 220 nm qui se recentre à 218 nm après ajout de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) ou de Fluorure de Potassium (KF) (**Figure 4A**). Ce spectre est caractéristique d'une structure secondaire de type hélice α ou feuillet β . En parallèle, l'analyse d'un peptide scrambled (SCR), où la composition en acides aminés est identique au peptide original, mais où leur ordre est aléatoire, et d'un peptide SBT, donc la séquence est l'inverse du peptide original, ne montre pas ce pic à 218 nm, indiquant que l'ordre des acides aminés dans la séquence de NFL-TBS.40-63 est essentiel à la formation de la structure secondaire. Cette structure secondaire pour le peptide original a montré une déstabilisation irréversible lors d'une élévation de la température (**Figure 4B**).

L'étude par dichroïsme circulaire sur les peptides issus de l'Alanine scan (**Figure 5**) a montré que :

- Les substitutions des acides aminés 21 à 24 ne modifient pas le spectre de dichroïsme circulaire par rapport à l'original dans le SDS ou le tampon KF. La substitution Gly23Ala présente un spectre moins marqué que le peptide original, en corrélation avec sa faible capacité à entrer dans les cellules. Ces peptides présentent une structure principalement en feuillet β antiparallèle dans le tampon KF, un mélange d'hélice α et de feuillet β dans le SDS, mais une structure désordonnée dans l'eau.

- Les substitutions au niveau des acides aminés 2 à 20 modifient le spectre des peptides dans l'eau, avec une bande positive à 200 nm, une bande négative à 210 nm, et une autre bande positive centrée à 228 nm. Ces signaux sont caractéristiques d'un autre type de feuillet β décrit par Yang et collaborateurs (Yang et al., 1986), et ne sont pas modifiés par l'ajout de SDS ou de tampon KF, ni par élévation de la température. Ces résultats indiquent que leur structure est très stable. La plupart de ces peptides présente une faible capacité à entrer dans les cellules, hormis le peptide Ser10Ala, qui peut être expliquée par la structure trop stable de ces peptides.

- Enfin, la substitution Tyr1Ala, qui inhibe toute entrée dans les cellules, présente un spectre caractéristique d'une absence de structure secondaire ou « random coil ». Cette tyrosine est donc essentielle dans la structure secondaire du peptide original.

Les peptides possédant les substitutions Tyr1Phe, Leu12Val et Arg16Lys présentent des spectres similaires au peptide original dans le tampon KF, mais la substitution Val14Leu présente une structure moins ordonnée que le peptide original. Ces résultats indiquent que les propriétés physico-chimiques de ces acides aminés sont importantes dans le maintien de sa forme active.

Les spectres des peptides avec les sérines phosphorylées aux positions 17 et 19 présentent des structures en feuillets β déstabilisées, en concordance avec la diminution de leur incorporation par les cellules, avec une augmentation de la forme « random coil ».

A partir de tous ces résultats, deux repliements différents ont été prédits à partir du programme PEP-FOLD pour le peptide NFL-TBS.40-63. Dans le premier, le peptide présente une structure en feuillet β antiparallèle, où les résidus 1 à 5 interagissent avec les résidus 14 à 18 (**Figure 6A**). Dans le second, une hélice α prédomine dans la partie centrale de la structure (**Figure 6B**). Ces résultats sont en faveur d'une structure secondaire particulière impliquée dans l'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 dans les cellules, et nécessaire à son action anti-microtubulaire.

Structure-Function Analysis of the Glioma Targeting NFL-TBS.40-63 Peptide Corresponding to the Tubulin-Binding Site on the Light Neurofilament Subunit

Raphael Berges, Julien Balzeau, Masayuki Takahashi^{‡a}, Chantal Prevost^{‡b}, Joel Eyer*

Laboratoire de Neurobiologie & Transgénèse, UPRES EA 3143, INSERM, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Abstract

We previously reported that a 24 amino acid peptide (NFL-TBS.40-63) corresponding to the tubulin-binding site located on the light neurofilament subunit, selectively enters in glioblastoma cells where it disrupts their microtubule network and inhibits their proliferation. Here, we analyzed the structure-function relationships using an alanine-scanning strategy, in order to identify residues essential for these biological activities. We showed that the majority of modified peptides present a decreased or total loss to penetrate in these cells, or to alter microtubules. Correspondingly, circular dichroism measurements showed that this peptide forms either β -sheet or α -helix structures according to the solvent and that alanine substitution modified or destabilized the structure, in relation with changes in the biological activities. Moreover, substitution of serine residues by phosphoserine or aspartic acid concomitantly decreased the cell penetrating activity and the structure stability. These results indicate the importance of structure for the activities, including selectivity to glioblastoma cells of this peptide, and its regulation by phosphorylation.

Citation: Berges R, Balzeau J, Takahashi M, Prevost C, Eyer J (2012) Structure-Function Analysis of the Glioma Targeting NFL-TBS.40-63 Peptide Corresponding to the Tubulin-Binding Site on the Light Neurofilament Subunit. PLoS ONE 7(11): e49436. doi:10.1371/journal.pone.0049436

Editor: Svetlana Kotliarova, NIH/NCI, United States of America

Received: April 17, 2012; **Accepted:** October 8, 2012; **Published:** November 9, 2012

Copyright: © 2012 Berges et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This investigation was supported by grants to J. Eyer from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Association Française sur la Myopathie (AFM), Fonds Européen de Développement Regional (FEDER) and Institut National du Cancer (INCA), and grants to J. Eyer and M. Takahashi from the Région des Pays de la Loire (CIMAT and CIMATH-2). R. Berges and J. Balzeau were supported by the Région des Pays de la Loire (CIMATH). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: joel.eyer@inserm.fr

^{‡a} Current address: Unité de Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation UMR 6204, CNRS and Université de Nantes, 44322 Nantes Cedex 3, France

^{‡b} Current address: Laboratoire de Biochimie Théorique. CNRS UPR 9080, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité. Institut de Biologie Physico-Chimique. 13 Rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris Cedex, France

Introduction

Neurofilaments (NFs) are the major component of the cytoskeleton in mature neurons. They are composed of three polypeptide subunits of light (NFL, 61 kDa in humans), medium (NFM, 90 kDa), and heavy (NFH, 110 kDa) molecular weight [1]. Each subunit contains a central α -helical rod domain of ~310 residues, flanked by a N-terminal head domain and a non- α -helical C-terminal domain. NFL subunits constitute the core of the filament on which NFM and NFH are anchored through coiled-coil interactions. The C-terminal domains of NFM and NFH form side arms that project from the filament [2]. These domains have been shown to be involved in the rate of NF transport, the radial growth of axons and the regulation of inter-filament affinity [3–8]. They also bind microtubules (MTs), either directly [9–11] or using Microtubule-Associated Proteins (MAPs) as linkers between NFs and MTs [12]. The association with MTs depends on the phosphorylation state of the C-terminal domain: dephosphorylation of this domain by alkaline phosphatase promotes the NF/MT interaction while phosphorylation by the tau protein kinase II dissociates NFs from MTs.

We recently showed that NFs also contain sites in their N-terminal domains able to bind un-polymerized tubulin. Peptides corresponding to these motifs (named TBS for **T**ubulin-**B**inding

Sites) inhibit the *in vitro* polymerization of MT. Moreover, a 24-amino acid (AA) peptide corresponding to the second tubulin-binding site located on the NFL subunit (NFL-TBS.40-63) penetrates selectively in T98G human glioblastoma cells where it destroys the MT network and consequently inhibits cell viability [13,14]. Considering these properties, this peptide represents an interesting candidate for malignant glioma treatment.

Here, we further analyzed the structure-function of NFL-TBS.40-63 using an alanine scan strategy to clarify the cell entering mechanism. The peptides in which each AA was sequentially replaced by alanine were tested for their ability to penetrate into T98G human glioblastoma cells and to disrupt the MT cytoskeleton. In order to detect possible changes in secondary structure the different peptides were also analyzed by circular dichroism (CD) spectroscopy. Finally, since the NFL-TBS.40-63 peptide contains two phosphorylation sites at serines 17 and 19 (which correspond to serines 55 or 57 of the NFL sequence), and considering the effects of the phosphorylation status of these sites on the axonal transport [15], we investigated the properties of modified NFL-TBS.40-63 containing phosphorylated-serine 17 or 19, or aspartic acid substitutions of serines 17 or 19 to mimic permanent phosphorylation.

Results and Discussion

We previously reported the specific uptake of NFL-TBS.40-63 peptide by T98G human glioblastoma cells and its effects on their MT network, while it has no major effect on astrocytes, neurons and other cell types like HeLa cells, prostate carcinoma cells, or mouse immortalized fibroblast 3T3 cells [13,14]. As illustrated in **Figure 1A** the NFL-TBS.40-63 peptide typically enters in glioblastoma cells and disturbs the MT network. It also enters in SW13 cells without affecting the MT network (**Figure 1B**). As SW13 cells do not contain intermediate filaments, these results, as well as those previously published [13,14], suggest that intermediate filaments (IF) are not directly involved in the activities of the NFL-TBS.40-63 peptide. Here, we further investigated the structure-activity of this peptide to understand its capacity to penetrate in glioblastoma cells and to alter their MT cytoskeleton.

Revealing the importance of each amino acid by the alanine scanning strategy

In order to evaluate the role of each AA of the NFL-TBS.40-63 peptide in its incorporation into glioblastoma cells and its anti-microtubule activity, we sequentially replaced each AA by alanine, a small and neutral AA (**Table 1**), and human glioblastoma T98G cells were incubated with 10 μ M of peptide during 6 hours. Cells containing the biotinylated peptide were detected using Alexa-labeled avidin (green fluorescence) and those displaying a normal or a destroyed MT network were detected with an anti-tubulin antibody (red fluorescence) (**Figure 1A–B**). Then, we counted a minimum of 200 cells per slide containing or not the peptide, and with a normal or destroyed microtubule network (**Figure 1C**). As illustrated on **Figure 1A** glioblastoma cells contain a rich MT network. The normal NFL-TBS.40-63 enters in these cells where it destroys the MT network. On the opposite, the peptide with a Val14Ala replacement fails to enter in cells and does not affect the MT network. The NFL-TBS.40-63 peptide also enters in SW13 cells, which do not have intermediate filaments, but does not affect their MT network (**Figure 1B**).

A change in activity due to the replacement of an AA may reflect the loss of a specific contact with an interacting molecule [16], like a protein or a lipid molecule, or it can be due to structural modifications of the peptide resulting from the sequence modification [17]. It should be noted that small peptides like NFL-TBS.40-63 generally exist in solution as a mixture of different conformations or sub-states, whose population can vary with changes in the environment or limited sequence modification.

From immuno-cytochemical results and their quantification (**Figure 1A and C**), it appears that most of the AA substitutions by alanine reduced the cell penetration activity of the peptide, except for Ser21Ala and Ser24Ala. Moreover, most substitutions of the AA with alanine decreased the capacity of the peptide to alter the MT network when compared to the original NFL-TBS.40-63 peptide (**Figure 1C, Table 1**). However, replacement of Ser21 by alanine did not affect the uptake of the peptide but reduced its capacity to alter the MT network.

Alanine substitutions at position 1, 12, 14 and 16 abolished the penetration of the peptide into cells. To confirm the crucial role played by these AA, they were replaced by functionally equivalent AA (Tyr1Phe, Leu12Val, Val14Leu and Arg16Lys) (**Figure 2, Table 1**). With the exception of Arg16Lys, which displayed a lower activity, such substitutions restored the wild type activity of the peptide, confirming the crucial role of these residues.

Internalization of the NFL-TBS.40-63 peptide by glioblastoma cells may result from either its intrinsic capacity to cross the cell membrane through endocytosis, or its capacity to interact with a

cell receptor. In the first case, the peptide would belong to the class of cell penetrating peptides (CPP). These peptides have been investigated for the last ten years for their high potential in cell delivery engineering, especially with a therapeutic objective. Cell penetrating peptides are generally defined as short (less than 30 AA) cationic peptides, which are able to penetrate cell membranes [18]. In general, CPP uptake involves an initial rapid electrostatic interaction of positively charged residues with the plasma membrane before their intracellular delivery, but the exact mechanism is still unclear [19]. Notably, the positive charge itself is not sufficient for internalization. Futaki et al. showed that an octamer of arginine (Arg)₈ was successfully internalized, whereas (Arg)₁₆ had no translocation property [20].

The NFL-TBS.40-63 peptide displays some of the CPP characteristics including its short sequence (24 AA) and its net positive charge at physiological pH (PI = 10.3). However, contrary to the known CPPs, which are composed mostly of arginines and lysines, the NFL-TBS.40-63 peptide contains only 2 arginine residues and no lysine. In addition, we showed previously that scrambled peptides (including NFL-SCR), or a peptide with the same AA composition but in a reversed sequence (NFL-SBT), do not penetrate in cells (**Table 2**). As such peptides have similar positive charge, these results indicate that the positive charge of the NFL-TBS.40-63 sequence alone is not sufficient to account for its cell-penetrating ability [13]. Moreover, the exact sequence is crucial to preserve the properties of this peptide, which may reveal a preferred and specific conformation.

The properties of the NFL-TBS.40-63 peptide are affected by their phosphorylation status

Neurofilaments are known phospho-proteins, and multiple aspects of their biology, including assembly and axonal transport, are regulated by their phosphorylation status. In particular, aberrant NF phosphorylation is a pathological hallmark of several human neurodegenerative disorders [21]. Phosphorylation sites located along the N-terminal domains, especially those of NFL and NFM, are essential for their assembly, their axonal transport or their interactions with MTs [22–30]. In particular, modifications of serines 2, 55 and 57 of NFL (i.e. replacement of serine by aspartic acid) alter the axonal transport of NFs [15]. As they are present in the NFL-TBS.40-63 peptide sequence (serine 17 and 19), we analyzed the possible consequence of the phosphorylation of these AA on the internalization of the peptide into glioma cells and on the anti-microtubular activity. Replacement of serines 17 and 19 with aspartic acid to mimic permanent phosphorylation was also examined.

Immunocytochemical studies revealed that all the phosphorylated peptides (Ser17SerP, Ser19SerP, Ser17,19SerP), as well as peptides in which Ser was replaced with Asp (Ser17Asp, Ser19Asp, Ser17,19Asp), showed a decreased internalization, when compared to the original NFL-TBS.40-63 peptide (**Figure 3, Table 2**). Moreover, the MT network integrity was not altered when glioma cells were treated with these peptides. These results indicate that the phosphorylation status of serine 17 and 19 is crucial for both the internalization and the effects of the NFL-TBS.40-63 peptide on glioma cells. Phosphorylation clearly opposes these effects.

Analysis of the folding and stability of the NFL-TBS.40-63 peptide by circular dichroism

To investigate whether the alteration of the activity of the peptide following changes of its sequence or its phosphorylation level may be correlated to a change in its folding and stability, we

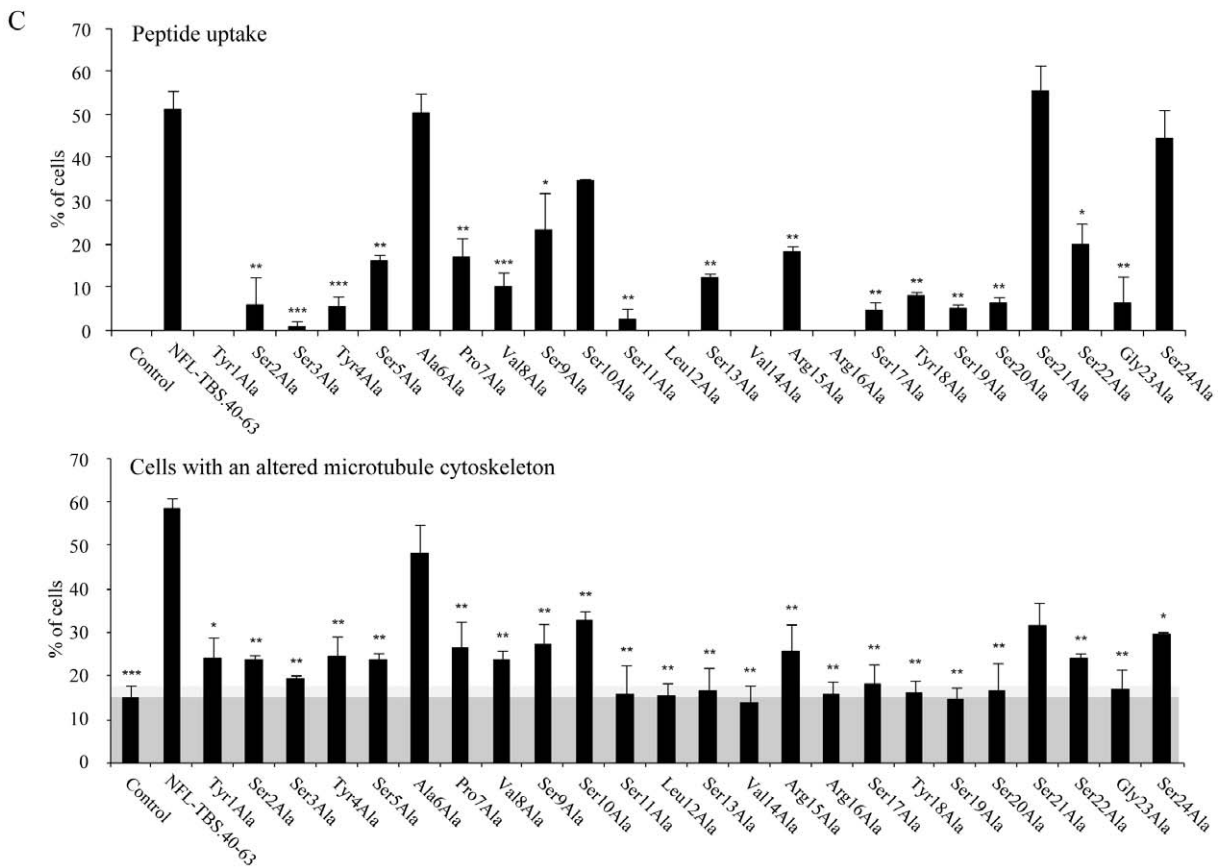
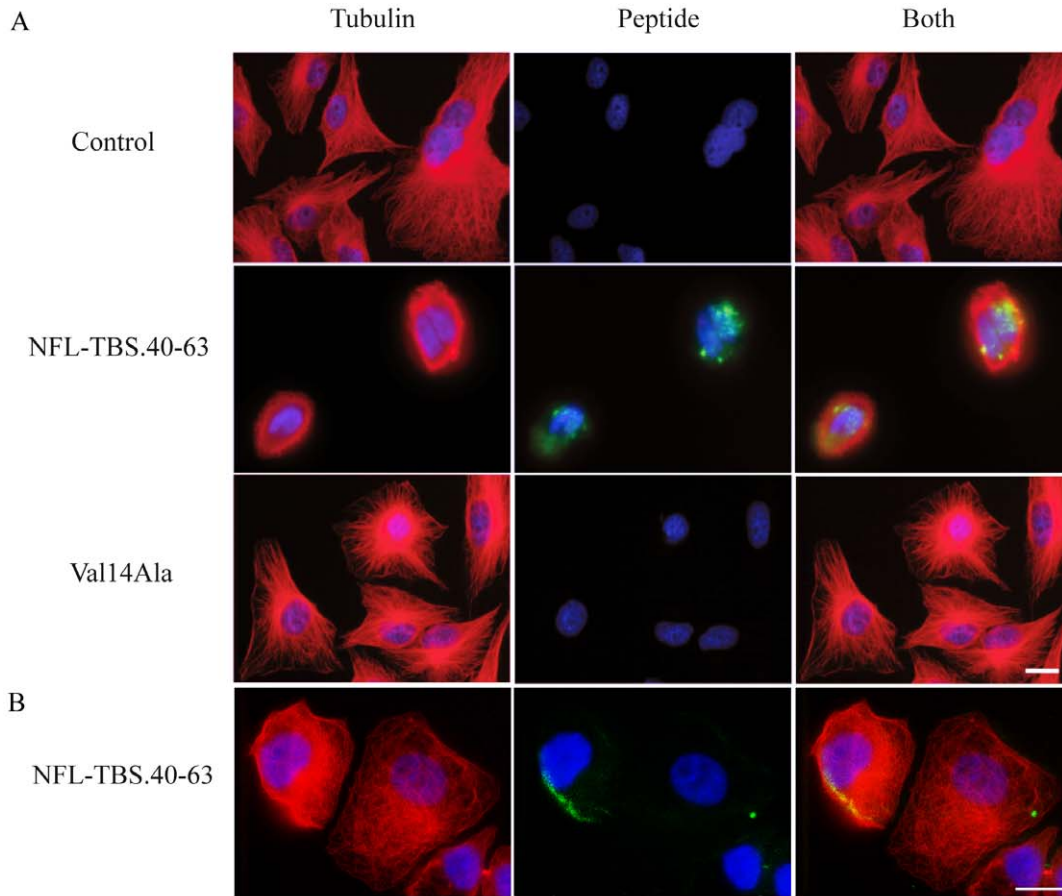


Figure 1. Internalization and effects on glioblastoma T98G cells of the wild type peptide NFL-TBS.40-63 and peptides from the alanine scan. (A): Human glioblastoma T98G cells were incubated in the presence of different peptides at 10 μ M during 6 hours. MTs were detected by immunostaining using an anti-tubulin antibody (red), and biotinylated peptides were detected using Alexa-labeled avidin (green). While the original NFL-TBS.40-63 peptide is able to penetrate in these cells, the replacement of valine-14 by alanine typically abolished this property. *White bars, 20 μ m.* (B) Human adrenal carcinoma SW13 cells were incubated in the presence of NFL-TBS.40-63 peptide (10 μ M, 6 hours). MTs appear in red, peptide in green, nuclei in blue. *White bars, 20 μ m.* (C): We quantified by microscopy the percentage of T98G cells containing the peptide and those with a destroyed MT network. Experiments were triplicated and a minimum of 200 cells was examined in each experiment. Data are presented as mean and S.E.M. (bars). Asterisks indicate significant level versus control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. As glioblastoma cells are known to have multiple mutations and abnormalities, the shaded area corresponds to the percentage of cells where MTs are disorganized even in the absence of peptide.

doi:10.1371/journal.pone.0049436.g001

analyzed the structure of peptides by circular dichroism (CD) measurements. The CD signal in the far UV region (below 250 nm) is related to the secondary structure of proteins [31,32]. The CD spectra are usually measured in three solvents: (1) 10 mM potassium phosphate with 200 mM KF, pH 7.4, (2) 2 mM Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and (3) pure water. KF/phosphate buffer is similar in ionic strength and pH to the buffer used for cell

treatment with peptide. The actual cell treatment buffer cannot be used for the CD measurements because of its high UV absorption in the far UV region. SDS mimics hydrophobic environment at low concentrations (2 mM) where micelle formation should not occur [33]. The peptide structure in the presence of SDS could thus indicate a potential conformation of the peptide when in contact with the membrane or the partner protein. The CD was

Table 1. Sequences of the peptides used in the Ala-scanning investigation and the modified peptides.

Peptide	Sequence	Molecular weight (g/mol)	PI	Average hydrophilicity	Peptide incorporation (% of MT cells)	Disintegration (% of cells)
NFL-TBS.40-63	Biotin-YSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2712.4	10.3	-0.1	51.2 \pm 4.2	58.4 \pm 2.3
<i>Alanine scan</i>						
Tyr1Ala	Biotin- A SSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2620.1	11.2	0	0	24.1 \pm 4.6
Ser2Ala	Biotin- Y ASSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	5.9 \pm 6.4	23.5 \pm 1.1
Ser3Ala	Biotin- YSA YSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	0.8 \pm 1.2	19.1 \pm 0.9
Tyr4Ala	Biotin-YSS S APVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2620.4	11.2	0	5.3 \pm 2.4	24.4 \pm 4.6
Ser5Ala	Biotin-YSS Y APVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	16.0 \pm 1.4	23.6 \pm 1.6
Ala6Ala	Biotin-YSSYS A PVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2712.4	10.3	-0.1	50.3 \pm 4.6	48.1 \pm 6.6
Pro7Ala	Biotin-YSSYS A VSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2686.4	10.3	-0.1	16.7 \pm 4.6	26.6 \pm 5.9
Val8Ala	Biotin-YSSYS A PSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2684.4	10.3	-0.1	9.9 \pm 3.4	23.6 \pm 2.1
Ser9Ala	Biotin-YSSYS A PVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	23.3 \pm 8.4	27.1 \pm 4.8
Ser10Ala	Biotin-YSSYS A PV S ALSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	34.5 \pm 0	32.9 \pm 1.9
Ser11Ala	Biotin-YSSYS A PV S ALSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	2.5 \pm 2.5	15.9 \pm 6.5
Leu12Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S AVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2670.4	10.3	0	0	15.5 \pm 2.8
Ser13Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S LAVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	12.2 \pm 0.8	16.6 \pm 5.2
Val14Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L A RRSYSSSSGS-CONH ₂	2684.4	10.3	-0.1	0	13.8 \pm 3.9
Arg15Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L V ARSYSSSSGS-CONH ₂	2627.3	9.7	-0.2	18.1 \pm 1.3	25.5 \pm 6.3
Arg16Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L V RA S YSSSSGS-CONH ₂	2627.3	9.7	-0.2	0	15.6 \pm 3.0
Ser17Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L S VRR A YSSSSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	4.6 \pm 1.8	18.1 \pm 4.4
Tyr18Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L S VRR S A S SSGS-CONH ₂	2620.4	11.2	0	7.9 \pm 0.9	16.0 \pm 2.8
Ser19Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L S VRR S A SSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	5.2 \pm 0.7	14.5 \pm 2.7
Ser20Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L S VRR S A SSGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	6.4 \pm 1.2	16.4 \pm 6.4
Ser21Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L S VRR S S A SGS-CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	55.4 \pm 5.9	31.6 \pm 5.1
Ser22Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L S VRR S S A GS-CONH ₂	2796.4	10.3	-0.1	19.7 \pm 5.0	24.1 \pm 1.0
Gly23Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L S VRR S S S A S-CONH ₂	2726.4	10.3	-0.1	6.2 \pm 6.2	16.9 \pm 4.5
Ser24Ala	Biotin-YSSYS A PVSS S L S VRR S S S S A -CONH ₂	2696.4	10.3	-0.1	44.3 \pm 6.7	29.4 \pm 0.6
<i>Substitutions with functionally equivalent amino acids</i>						
Tyr1Phe	Biotin- F SSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2696.4	11.2	-0.1	56.3 \pm 2.8	41.2 \pm 4.0
Leu12Val	Biotin-YSSYS A PVSS S V SVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2698.4	10.3	-0.1	58.6 \pm 5.0	43.8 \pm 1.7
Val14Leu	Biotin-YSSYS A PVSS S L L RRSYSSSSGS-CONH ₂	2726.4	10.3	-0.1	44.2 \pm 2.2	39.2 \pm 2.4
Arg16Lys	Biotin-YSSYS A PVSS S L S V R KSYSSSSGS-CONH ₂	2684.4	10.1	-0.1	32.9 \pm 1.3	36.9 \pm 0.9

doi:10.1371/journal.pone.0049436.t001

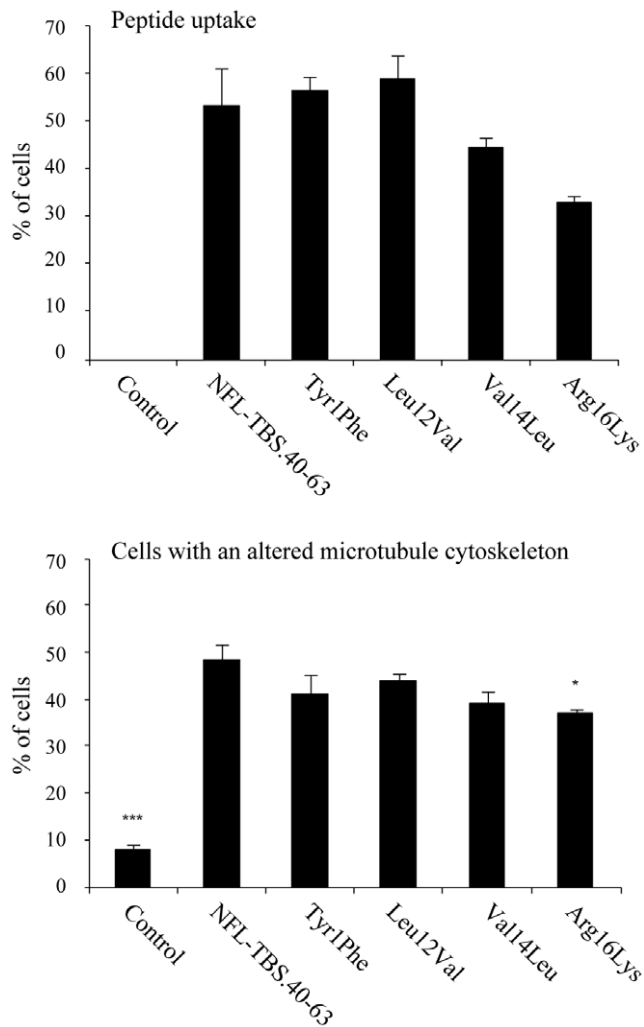


Figure 2. Replacement of AA residues with functionally equivalent residues restores the properties of NFL-TBS.40-63. Using a similar experimental approach to that described in Figure 1, the amino-acids at position 1, 12, 14 and 16 were replaced by amino-acids with similar properties. While substitution of these AAs by alanine abolished their properties, replacement of these AAs by functionally equivalent residues restore the capacity to penetrate in cells and to alter the MT cytoskeleton. As in Figure 1A, experiments were triplicated and a minimum of 200 cells was analyzed in each experiment. doi:10.1371/journal.pone.0049436.g002

also measured in pure water as a reference to evaluate the effect of buffer and SDS on the peptide conformation. All the CD measurements were performed on the peptides that were used for the biological tests.

The CD spectrum of the original NFL-TBS.40-63 peptide (wt NFL-TBS.40-63) in pure water indicates rather disordered conformation (**black line in Figure 4A**): the signal at 200 nm was negative while the ordered conformations (both α -helix and β -sheet) exhibit a positive CD signal at this UV region [31,32]. However, an additional negative feature could be seen around 220 nm, suggesting partial folding into α -helix or β -sheet, because an α -helix structure exhibits a negative band at 222 nm and β -sheet at 218 nm, while disordered peptides usually exhibit no or a positive signal around 220 nm. In fact, when the CD spectrum was analyzed by using Jasco secondary estimation software with Reed's reference set as reference spectra, the secondary structure

was estimated to be composed of 25% β -sheet and 75% random coil. This differs from the CD spectra of a peptide with the same AA composition but in a shuffled sequence (NFL-SCR) (**green line in Figure 4A**) or a reverse sequence (NFL-SBT) (data not shown): the signal above 220 nm is positive in their CD spectra. These peptides exhibited typical CD spectra corresponding to a completely disordered structure, while the wild-type NFL-TBS.40-63 peptide has some tendency to be folded in a particular conformation.

Furthermore, the CD spectrum of wild-type NFL-TBS.40-63 peptide was modified by addition of 2 mM SDS (**blue line in Figure 4A**), which creates a hydrophobic environment and may mimic the situation around the membrane, in a way indicating more ordered structures: the signal at 200 nm became positive and the negative band around 220 nm displayed a higher intensity. Two negative bands (one centered at 222 nm and the other at 209 nm) suggest the presence of α -helical structures. The spectral analysis with Reed's reference set predicts 20% α -helix, 40% β -sheet and 40% random coil. Thus, the peptide may be folded partially in an α -helical structure when it interacts with the membrane. However, addition of any mild detergents (IGEPAL CA-630, Nonidet P40, Tween 20, Triton X-100) to the peptide in pure water did not affect the CD signal.

In KF/phosphate buffer, which mimics the cell treating buffer, the peptide exhibited another type of CD spectrum: the signal at 200 nm is positive and the negative band around 220 nm was greater in intensity compared to that in pure water (**blue line in Figure 4A**). Since the negative band was centered at 218 nm instead of 222 nm and there was no clear negative band at 209 nm, another typical negative band for an α -helical structure, the peptide is probably folded in an antiparallel β -sheet structure. The spectral analysis with Reed's reference set predicts 7% α -helix, 56% β -sheet and 36% random coil.

The different structural characteristics observed in KF/phosphate buffer or in SDS correspond to different properties in terms of stability. In KF/phosphate buffer, the peptide was not stable when the temperature was increased: thermal unfolding occurred with T_m of about 40°C (**blue line in Figure 4B**). In addition, no refolding was observed when the temperature was lowered from 70 to 10°C at a rate of 1°C per min and even after 12 hours incubation at 20°C (**light blue line in Figure 4B**). Corresponding to this structural feature, the peptide once heated could not penetrate into the cells. In contrast, the peptide in 2 mM SDS was stable: no large signal change in CD spectrum was observed when the temperature was increased up to 70°C (**red line in Figure 4B**).

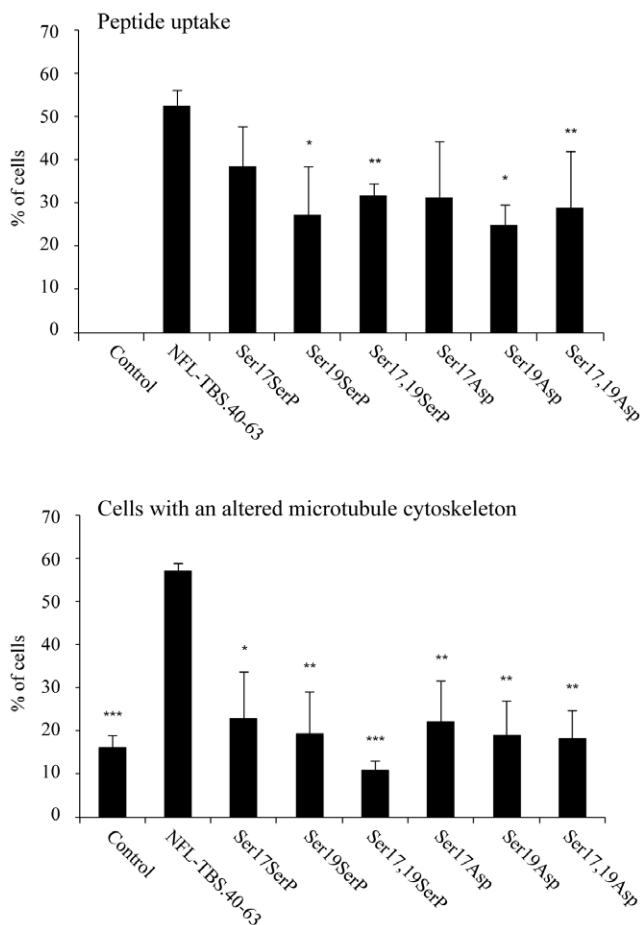
The dependency on the environment of the NFL-TBS.40-63 peptide structure is characteristic of its exact sequence arrangement. No modification in the CD signal of its shuffled (NFL-SCR) or reverse sequence peptide (NFL-SBT) could be observed following addition of SDS or in KF/phosphate buffer (data not shown). Moreover, both the structural characteristics of the peptide and its dependency on the environment can be greatly modified by punctual substitutions. As described below, the substitution of only one AA with alanine at certain positions of the peptide affected the CD signal, indicating major change in the structure (**Figure 5**).

In summary, the CD analysis indicates that the NFL-TBS.40-63 peptide folds into secondary structure elements and exhibits both α -helix and β -sheet structures, with a more pronounced importance of the α -helical character in a hydrophobic medium relative to a polar environment. Such data argue that for this peptide, membrane penetration would necessitate the formation of specific secondary structures. However, this does not imply that the

Table 2. Sequences of reverse (NFL-SBT) and scrambled (NFL-SCR) peptides, as well as the phosphorylated peptides.

Peptide	Sequence	Molecular weight (g/mol)	PI	Average hydrophilicity	Peptide incorporation (% of cells)	Disintegration of MT (% of cells)
NFL-TBS.40-63	Biotin-YSSYSAPVSSSLVRRSYSSSSGS-CONH ₂	2712.4	10.3	-0.1	51.2±4.2	58.4±2.3
Scrambled peptides						
NFL-SBT	Biotin-SGSSSSYRRVLSLSSVPASYSSY-CONH ₂	2712.4	10.3	-0.1	0	32.41±0.87
NFL-SCR	Biotin-SLGGSPSSVRASYSSRSYVSSS-CONH ₂	2712.4	10.3	-0.1	64.2±4.2	18.18±3.2
Phosphorylated and acid aspartic peptides						
Ser17SerP	Biotin-YSSYSAPVSSSLVRRS Sp YSSSSGS-CONH ₂	2792.4	10.3	-0.1	32.8±8.7	22.9±1.3
Ser19SerP	Biotin-YSSYSAPVSSSLVRRS Sp SSSSGS-CONH ₂	2792.4	10.3	-0.1	27.3±12.1	19.4±2.1
Ser17,19SerP	Biotin-YSSYSAPVSSSLVRRS SpSp SSSSGS-CONH ₂	2872.4	10.3	-0.1	32±2.1	11.0±3.0
Ser17Asp	Biotin-YSSYSAPVSSSLVRR D YSSSSGS-CONH ₂	2740.4	9.7	0	31.3±11.2	22.2±3.4
Ser19Asp	Biotin-YSSYSAPVSSSLVRRS D SSSSGS-CONH ₂	2740.4	9.7	0	25.2±4.8	19.2±1.5
Ser17,19Asp	Biotin-YSSYSAPVSSSLVRR DYD SSSSGS-CONH ₂	2768.4	6.8	0.1	29.0±12.7	18.6±6.8

doi:10.1371/journal.pone.0049436.t002

**Figure 3. Phosphorylation of NFL-TBS.40-63 affects its properties.** Replacement of Ser-17 or Ser-19 by a chemically phosphorylated serine, or by Asp strongly affected the capacity of the peptide to penetrate in cells and to destroy the MT network. The experimental conditions are similar to those described in Figure 1A. doi:10.1371/journal.pone.0049436.g003

peptide necessarily acts as a CPP, as the relation between the properties of CPP and their structural folding is not straightforward. While an α -helical structure is generally found or predicted for these peptides, β -sheet structures have also been described for some CPPs [34]. Furthermore, the α -helical structure of antennapedia can adopt a β -sheet structure in the presence of a charged lipid monolayer [35].

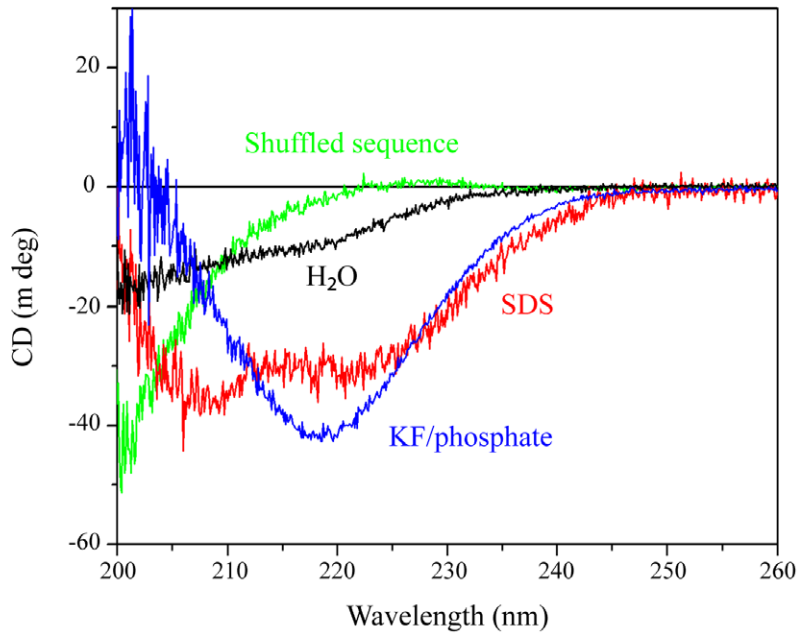
To further evaluate the importance of the structure/function relationships we also analyzed by CD the folding and stability of the peptide following alanine substitution of each AA, or their phosphorylation state.

Alanine substitutions and phosphorylation affect the folding of NFL-TBS.40-63 peptide

The CD spectra of alanine-substituted peptides can be separated in two classes (**Figure 5**). The spectra of peptides in which an AA residue at C-terminal part (21 to 24) was substituted with alanine exhibited a large negative band around 218 nm in the presence of SDS or in the KF/phosphate buffer. The CD spectra of these peptides depended upon the solvent just like the spectrum of the wild-type peptide. The peptides appeared rather disordered in pure water, in mainly anti-parallel β -sheet in KF/phosphate buffer and in a mixture of β -sheet and α -helical structures in 2 mM SDS. There was some correlation between the CD spectrum in KF/phosphate buffer and cell penetrating capacity. Gly23Ala, which exhibited only weak cell-penetrating activity, also displayed a CD signal corresponding to less ordered structure (**light blue line in Figure 5A**).

The CD spectra of peptides in which a residue is substituted with alanine at positions 2 to 20 (except for position 6, which is originally alanine) exhibited much weaker CD signals (**red lines in Figures 5A, B and C**). However, the spectra had a well-defined shape: a positive band centered at 228 nm, a negative band at 210 nm and a positive band at 200 nm. This kind of CD spectrum is reported to correspond to another type of β -sheet structure according to Yang et al. [36]. We could not fit the spectra using Reed's reference set, but obtained a reasonable fit using Yang's reference: 6% α -helix, 49% β -sheet, 28% β -turn and 16% random coil. The spectra were not affected by addition of SDS or in KF/phosphate buffer condition. The structure thus appeared very stable. Even increasing the temperature up to 80°C did not significantly affect these CD spectra (data not shown).

A



B

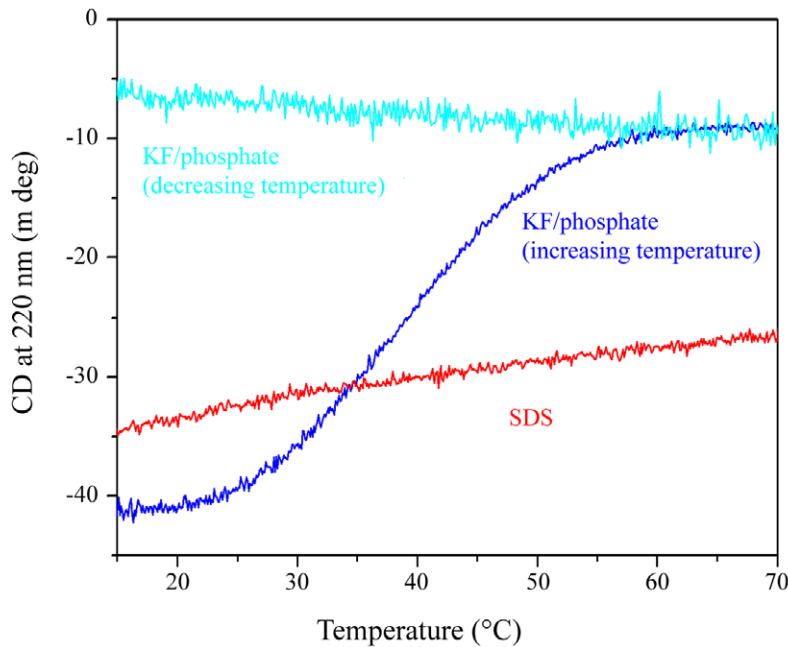


Figure 4. CD spectra of NFL-TBS.40-63 peptide. (A): CD spectra of 20 μ M biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide were measured in pure water (black line), 2 mM SDS (red line) and KF/phosphate buffer (blue line). The spectrum of peptide with a shuffled sequence (green) is also shown. (B): Change in CD signal at 220 nm of 20 μ M biotinylated NFL-TBS.40-63 in KF/phosphate buffer (blue line) and 2 mM SDS (red line) with increasing temperature was measured and is presented as a function of temperature. The change with decreasing temperature measured in KF/phosphate buffer (light blue line) is also shown.

doi:10.1371/journal.pone.0049436.g004

Almost all peptides exhibiting such CD spectra did not show any cell-penetrating capacity except Ser9Ala and Ser10Ala. These two particular peptides penetrated in cells significantly although to a

much lesser extent than the wt peptide. The peptide in which the residue at position 1 was substituted with alanine exhibited CD signals corresponding to a random coil structure in all solvents, as

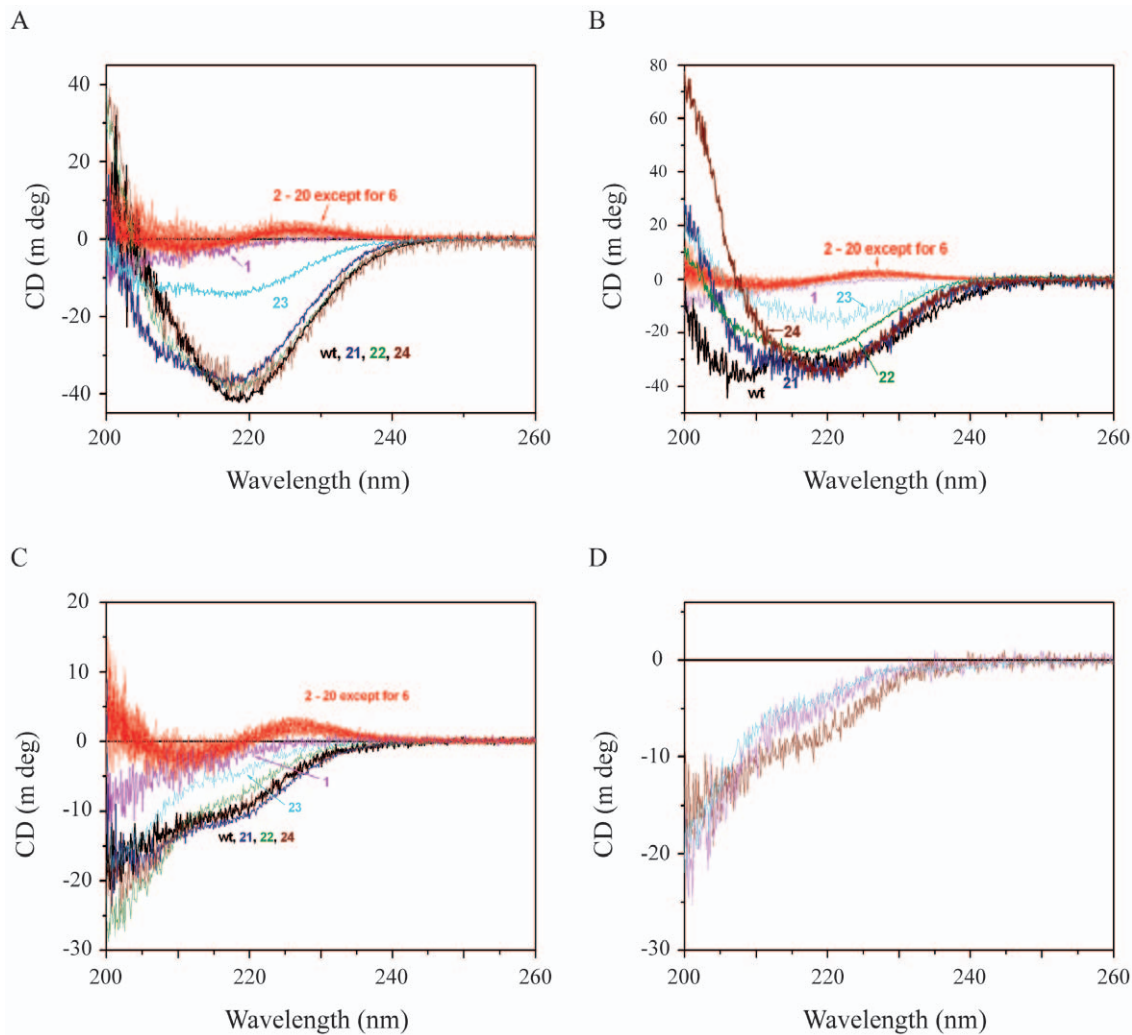


Figure 5. CD spectra of wt and alanine-substituted peptides. CD spectra of 20 μ M biotinylated wt and alanine-substituted NFL-TBS.40-63 peptides were measured in KF/phosphate buffer (Panel A), 2 mM SDS (Panel B) and pure water (Panel C). The spectra of wt peptide are in black. The spectra of peptides with a substitution by alanine at positions from 2 to 20 (except at position 6 where the original AA is alanine) are similar and represented by red lines. The spectra of wild-type (black), Tyr1Ala (magenta), Ser21Ala (dark blue), Ser22Ala (olive), Gly23Ala (light blue) and Ser24Ala (wine) are also presented. The number corresponds to the position of the replaced AA residue. CD spectra of 20 μ M NFL-TBS.40-63 peptides phosphorylated at positions 17 (wine), 19 (magenta) and the two positions (cyan) were measured in KF/phosphate buffer (Panel D). doi:10.1371/journal.pone.0049436.g005

well as a loss of biological activities. Thus, tyrosine at position 1 is important for the folding of this peptide and its activities.

As exposed in the previous section, we observed that the substitution by alanine at positions 1, 12, 14 or 16, strongly perturbed the peptide activity, but the substitution with physico-chemically similar AA (Tyr1Phe, Leu12Val, Val14Leu and Arg16Lys) conserved the activity except for Arg16Lys. We therefore examined the CD of these peptides. The CD spectra of peptides containing Tyr1Phe, Leu12Val or Arg16Lys substitution exhibited a CD signal similar to the wt peptide in KF/phosphate buffer. The CD spectrum of the peptide containing Val14Leu substitution corresponded to a less ordered structure than the wt peptide, but clearly different from the peptide with Val14Ala substitution. These results indicate that the physico-chemical properties of these particular AA are important for the folding of the peptide in the active form. Moreover, the fact that the peptide with Arg16Lys substitution folds in a similar way to wt peptide but exhibits lower activity indicates the importance of this

residue for the interaction with other proteins or with the membrane.

CD measurements showed that phosphorylation of the peptide at positions 17 and 19 destabilized the β -sheet structure (Figure 5D), in correlation with the decrease in cell-penetrating capacity. The CD analysis estimates that the phosphorylation at position 17 (wine line in Figure 5D) decreased the β -sheet content to 40% (from 56% content in the wt peptide) and increased the random coil content to 53% (36% in the wt peptide), while that at position 19 (magenta line in Figure 5D) decreased the β -sheet content to 34% and increased the random coil content to 60%. The phosphorylation of both sites (cyan line in Figure 5D) produced changes almost similar to those produced by single phosphorylation at position 17. Again, there is a correlation between the activity and the structure of peptide.

Together, these results reveal the importance of folding for the activity: both the peptides with scrambled or reversed sequence, as well as the peptide in which tyrosine 1 is replaced by alanine, do

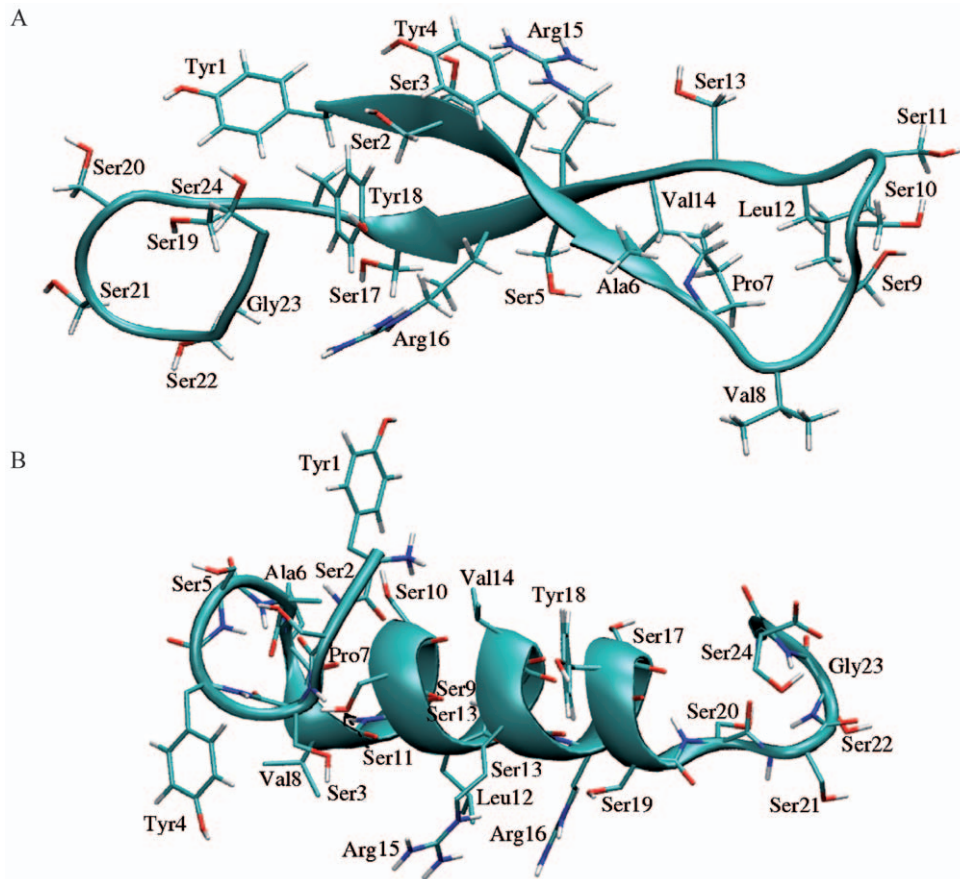


Figure 6. Predicted fold of NFL-TBS.40-63 peptide. A. The 3D structure of NFL-TBS.40-63 predicted by PEP-FOLD shows a β -hairpin involving the N-terminal section (1–5) and a central section (14–18) of the peptide. The C-terminal end shows the initiation of an α -helix. B. Alternative 3D structure predicted by PEP-FOLD, where the peptide mainly presents an α -helix fold. The figures were prepared using VMD [49]. doi:10.1371/journal.pone.0049436.g006

not cross the cell membranes and are not structured. In addition, the cell penetrating activity appears to correlate with a particular structural pattern. Moreover, all the mutated peptides, which exhibit a CD spectrum analogous to that of the wild type peptide (substitution with alanine at positions 21, 22, and 24 or functionally equivalent Tyr1Phe, Leu12Val and Arg16Lys substitutions) show a notable cell penetration activity. This was generally not the case for mutations that led to an ostensibly different CD spectrum, corresponding to different structural characteristics. These results, together with the absence of internalization of NFL-TBS.40-63 peptide composed of D-amino acids, and the saturating process of internalization in glioma cells demonstrated by FACS [13], suggest that a receptor may participate to its internalization. In that case, differences in uptake patterns of the peptide between glioma cells and normal cells could be due to differences of its interaction with a particular cell surface receptor expressed specifically in glioma. Our observations leave open the two possible options for crossing the glioblastoma membrane, either directly via endocytosis or through its interaction with a cell receptor.

Another interesting feature of the NFL-TBS.40-63 peptide is its sensitivity to the environment (KF/phosphate buffer or SDS), and its remarkable stabilization by the presence of SDS. Such a characteristic is also observed for mutated forms of the NFL-TBS.40-63 peptide that still penetrate in cells. Moreover, the results suggest that Tyr1, Leu12 and Ser21 interact with tubulin as

their tubulin binding activity decreases upon replacement by alanine or by residues with similar chemical properties, while the cell penetration is not compromised and the CD spectra are similar. These data suggest that a different conformation is required for anti-MT activity than for crossing the membrane. The alternative fold could be stabilized by tubulin binding.

It is noteworthy that the structure of the peptide is stabilized in the KF/phosphate buffer or in the presence of SDS. This indicates that some hydrophobic contacts in the peptide are important for the folding. The fact that the replacement of residues in the C-terminal part with alanine residue, which has distinct volume occupancy, destabilizes the structure suggests that this part is involved in the folding. On the other hand, replacement of residues in the N-terminal half by alanine promotes another folding.

Molecular modeling of NFL-TBS.40-63 peptide

Two extreme folding geometries were predicted by the PEP-FOLD program for the NFL-TBS.40-63 peptide (Figure 6). In the first, the peptide is predominantly folded into a β -hairpin geometry extended over five consecutive amino acids (residues 1 to 5 are connected to residues 18 to 14 respectively), with a short C-terminal section presenting an α -helix character (Figure 6A). The second geometry is characterized by a predominant α -helix folding (Figure 6B). The two geometries present almost equivalent internal energies, with respectively values of -25.0 and

$-26.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Each of them conserved its structural characteristics, in terms of secondary structure, over 2 ns of molecular dynamics simulation in explicit solvent. The structure with dominant α -helix character showed transient instabilities of one of its four helix turns situated at the N-ter side during 300 ps, after which the helix turn recovered stable interactions. Shifts in the β -strand pairing were also observed after 1 ns, indicating some structural variability. These results show that the two structures represent conformational substates with medium to low stability, which may coexist in solution. The mutations of residues Tyr4, Ser9, Ser11, Leu12, Ser13, Val14, Arg15, Ser17, and Ser19 into alanine were found to destabilize the β -hairpin part of the peptide and stabilize an α -helix conformation.

In conclusion, the combination of our immuno-cytochemical and structural analyses strongly suggests that the NFL-TBS.40-63 peptide presents specific folds when crossing the membrane as well as when it interacts with tubulin, but that these structures are not necessarily identical. As these conformations are affected each time that the properties to penetrate or to perturb the MT network are also affected, these results indicate a good structure/function relationships. Moreover, the peptide's ability to modify its structure in different conditions such as the cell interior versus hydrophobic environment appears a hallmark of the peptide activity. This structure/function relationship suggests importance of structure, not simple amino acid composition, for the activities of the peptide, including the selectivity to glioblastoma cells. Further studies will aim at characterizing the conformational equilibrium of the NFL-TBS.40-63 peptide in different conditions (temperature, solvent composition) and its structure when interacting with membranes or tubulin, using theoretical tools like molecular dynamics simulations and experimental structure determination.

Materials and Methods

Synthetic peptides

Biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site located on NFL and biotinylated analogues (Tables 1 and 2) were synthesized at more than 95% purity by Millegen (Toulouse, France). Peptides were dissolved in distilled water at a concentration of 1 mM.

Cell culture

Human glioblastoma cell line T98G was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). Human adrenal carcinoma cell line SW13 was kindly provided by Zhigang XUE (UPMC, Paris). Cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) media (Lonza France) containing respectively 10% and 2% fetal calf serum (Lonza France), 1% L-glutamine (Lonza France), and 1% penicillin/streptomycin (Sigma) in a humidified incubator gassed with 5% CO_2 (37°C) until 80–90% confluence was reached.

Immunocytochemistry

Cells were plated on cover slips and cultured in media containing biotinylated peptides (10 μM) for 6 hours. After being washed in Phosphate Buffered Saline (PBS), the cells were fixed for 10 min in 4% Paraformaldehyde (PFA in PBS), and washed 3 times in PBS. The cells were then incubated during 10 min in a 0.5% triton X-100 permeabilization solution, and washed 3 times in PBS. Next, they were incubated in a blocking solution (PBS 5% BSA) for 15 min, then incubated with mouse anti- β -tubulin antibody (Sigma) 1/200 overnight. Tubulin and biotinylated peptides were localized using respectively Alexa 568 nm anti-mouse antibody and streptavidin Alexa 488 nm (Molecular

Probes) 1/200 for 1 hour, followed by washing in PBS. The preparations were counterstained with 3 μM 4'6-diaminido-2-phenylindole (DAPI; Sigma) for 5 min, washed twice with PBS, then cover slips were mounted with an antifading solution.

Observations were performed with an Olympus confocal microscope (BX50) using Fluoview.3.1. Software or a Leica DMI6000 inverted microscope and analyzed with Metamorph 7.1.7.0. software. We counted cells containing the peptide and cells displaying a destroyed MT network. Experiments were repeated at least three times, and a minimum of 200 cells was scored during each experiment.

Circular dichroism measurements

Circular dichroism (CD) spectra were measured in a J-810 CD spectrometer (Jasco, Japan) in step mode (bandwidth: 2 nm; interval: 0.1 nm; response time: 0.125 s). The spectra were averaged over 3 scans to increase the signal to noise ratio. To optimize the measurements, a 1 cm \times 0.2 cm mini-quartz cell with four windows (Hellema, Germany) was used in such a way that the spectra from 260 to 200 nm were measured with a 1 cm pathlength and those between 220 and 185 nm with 0.2 cm pathlength. After normalization for pathlength (1 cm), the superimposition of two separated spectra in the 200–220 nm region was verified and the entire spectra reconstituted. The temperature of measurement was controlled with a Peltier-effect temperature controller, and was usually 20°C . The structural stability of peptides was studied by measuring the variation in CD signal at 220 nm (bandwidth: 10 nm; interval: 1 s; response time: 0.5 s; pathlength: 1 cm) when the temperature was increased by $1^\circ\text{C}/\text{min}$ from 20 to 85°C . All the CD experiments were performed with 20 μM peptide under 3 buffer conditions: pure water, 2 mM SDS and 10 mM potassium phosphate pH 7.4 with 200 mM KF.

The secondary structures were estimated from the CD spectra with Jasco secondary structure estimation software. The spectra from 195 to 200 nm were decomposed to α -helix, β -sheet, β -turn and random coil elements using either Reed's [37] or Yang's reference set [38] as reference spectrum of each element as described [37,38]. We usually obtained better fits using Reed's reference.

Molecular modeling

Molecular modeling was carried out using the program PEP-FOLD (web server <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD/>, [39]). PEP-FOLD predicts "ab initio" the folding characteristics of peptides comprising 9 to 25 amino-acids. It is based on structural alphabet SA letters describing the possible conformation of groups of four consecutive amino acids, which are selected and assembled via a genetic algorithm [40]. Structure reconstruction and energy evaluation rely on the coarse grain force field OPEP [41]. This program has been used successfully by several groups to predict biologically relevant peptide structures [42–44]. The sequence of the 24 amino acid peptide NFL-TBS.40-63 and all its alanine mutants were submitted to the PEP-FOLD server. Two protocols were used, either the default protocol or one using the PSI-PRED option which incorporates information from the homology-based PSI-PRED predictor [45]. Note that a recent update of the PEP-Fold program unifies the results of the two options, while supporting up to 35 amino acids.

Each one of the two main structures predicted for the wild type peptide (respectively represented in Figure 6A and Figure 6B) was submitted to a 2 ns, fully solvated, molecular dynamics simulation using the GROMACS software version 4.5.4 [46] and the OPLS-AA-2001 force field [47]. The simulation boxes were filled with

5714 (for the structure in Figure 6A) or 3873 (structure in Figure 6B) SPC/E water molecules. Two chloride ions were added to ensure electric neutrality. After energy minimization, each structure was submitted to a sequence of two 100 ps equilibration phases, respectively performed under canonical (NVT) and isothermal-isobaric (NPT) ensembles. Production was conducted in the NPT ensemble, using Particle-Mesh-Ewald treatment [48] for long range electrostatics interactions.

Statistical analysis

Data are presented as mean and Standard Error of the Mean (S.E.M.) (bars). Cell countings were analyzed by Student's *t* test using Prism version 3.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). We distinguished three different levels of variation with respect to control: $p < 0.05$; $p < 0.005$; $p < 0.001$ (see Figure 1).

References

- Lee MK, Cleveland DW (1996) Neuronal intermediate filaments. *Annual Review of Neuroscience* 19, 187–217.
- Hirokawa N (1982) Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *The Journal of cell biology* 94, 129–142.
- Carden MJ, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW, Lee VM (1987) Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *The Journal of Neuroscience* 7, 3489–3504.
- Eyer J, Leterrier JF (1988) Influence of the phosphorylation state of neurofilament proteins on the interactions between purified filaments in vitro. *Biochemical journal* 252, 655–660.
- Eyer J, Peterson A (1994) Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12, 389–405.
- Zhu QZ, Couillard-Despres S, Julien JP (1997) Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Experimental Neurology* 148, 299–316.
- Ohara O, Gahara Y, Miyake T, Teraoka H, Kitamura T (1993) Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *Journal of Cell Biology* 121, 387–395.
- Dewaegh SM, Lee VMY, Brady ST (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal-transport by myelinating Schwann-cells. *Cell* 68, 451–463.
- Hisanaga S, Hirokawa N (1990) Dephosphorylation-induced interactions of neurofilaments with microtubules. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 21852–21858.
- Hisanaga S, Kusubata M, Okumura E, Kishimoto T (1991) Phosphorylation of neurofilament H subunit at the tail domain by Cdc2 kinase dissociates the association to microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 266, 21798–21803.
- Miyasaka H, Okabe S, Ishiguro K, Uchida T, Hirokawa N (1993) Interaction of the tail domain of high-molecular-weight subunits of neurofilaments with the COOH-terminal region of tubulin and its regulation by Tau-protein kinase-II. *Journal of Biological Chemistry* 268, 22695–22702.
- Hirokawa N, Hisanaga S, Shiomura Y (1988) MAP2 is a component of crossbridges between microtubules and neurofilaments in the neuronal cytoskeleton: quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy and reconstitution studies. *The Journal of Neuroscience* 8, 2769–2779.
- Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, et al. (2009) Neurofilaments Bind Tubulin and Modulate Its Polymerization. *Journal of Neuroscience* 29, 11043–11054.
- Berges R, Balzeau J, Peterson AC, Eyer J (2012) A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Molecular Therapy* 20, 1367–1377.
- Yates DM, Manser C, De Vos KJ, Shaw CE, McLoughlin DM, et al. (2009) Neurofilament subunit (NFL) head domain phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *European Journal of Cell Biology* 88, 193–202.
- Chen J, Serizawa T, Komiyama M (2011) Binding analysis of peptides that recognize preferentially cis-azobenzene groups of synthetic polymers. *Journal of Peptide Science* 17, 163–168.
- Guerrini R, Salvadori S, Rizzi A, Regoli D, Calo G (2010) Neurobiology, Pharmacology, and Medicinal Chemistry of Neuropeptide S and Its Receptor. *Medicinal Research Reviews* 30, 751–777.
- Zorko M, Langel U (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 529–545.
- Foerg C, Merkle HP (2008) The biomedical promise of cell penetrating peptides: Limits versus prospects. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97, 144–162.
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, et al. (2001) Arginine-rich peptides - An abundant source of membrane-permeable peptides having

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques de l'Université d'Angers for assistance in confocal microscopy, the IMPACT platform for the CD measurements, and Zhigang XUE (UPMC, Paris) for SW13 cells. MT thanks Dr. B. Pitard for the advice about choice of detergents and Dr. K. Iwasaki-Yoshikane for the assistance in CD measurements.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RB JB MT CP JE. Performed the experiments: RB JB MT CP JE. Analyzed the data: RB JB MT CP JE. Contributed reagents/materials/analysis tools: RB JB MT CP JE. Wrote the paper: RB JB MT CP JE.

- potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry* 276, 5836–5840.
- Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J (2008) Review of the multiple aspects of phosphorylation functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 38, 27–65.
- Julien JP, Mushynski WE (1982) Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry* 257, 10467–10470.
- Hisanaga S, Gonda Y, Inagaki M, Ikai A, Hirokawa N (1990) Effects of phosphorylation of the neurofilament L protein on filamentous structures. *Cell Regulation* 1, 237–248.
- Mukai H, Toshimori M, Shibata H, Kitagawa M, Shimakawa M, et al. (1996) PKN associates and phosphorylates the head-rod domain of neurofilament protein. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9816–9822.
- Sihag RK, Jaffe H, Nixon RA, Rong XH (1999) Serine-23 is a major protein kinase A phosphorylation site on the amino-terminal head domain of the middle molecular mass subunit of neurofilament proteins. *Journal of Neurochemistry* 72, 491–499.
- Sihag RK, Nixon RA (1991) Identification of Ser-55 as a major protein kinase-A phosphorylation site on the 70-kDa subunit of neurofilaments - Early turnover during axonal-transport. *Journal of Biological Chemistry* 266, 18861–18867.
- Cleverley KE, Betts JC, Blackstock WP, Gallo JM, Anderton BH (1998) Identification of novel in vitro PKA phosphorylation sites on the low and middle molecular mass neurofilament subunits by mass spectrometry. *Biochemistry* 37, 3917–3930.
- Giasson BI, Mushynski WE (1998) Intermediate filament disassembly in cultured dorsal root ganglion neurons is associated with amino-terminal head domain phosphorylation of specific subunits. *Journal of Neurochemistry* 70, 1869–1875.
- Hashimoto R, Nakamura Y, Komai S, Kashiwagi Y, Matsumoto N, et al. (2000) Phosphorylation of neurofilament-L during LTD. *Neuroreport* 11, 2739–2742.
- Trimpin S, Mixon AE, Stapels MD, Kim MY, Spencer PS, et al. (2004) Identification of endogenous phosphorylation sites of bovine medium and low molecular weight neurofilament proteins by tandem mass spectrometry. *Biochemistry* 43, 2091–2105.
- Johnson WC Jr (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7, 205–214.
- Norden B, Rodger A, Dafforn T (2010) Linear dichroism and circular dichroism: a textbook on polarized-light spectroscopy. Royal Society of Chemistry (ISBN: 978-1-84755-902-9).
- Waterhous DV, Johnson WC (1994) Importance of environment in determining secondary structure in proteins. *Biochemistry* 33, 2121–2128.
- Oehlke J, Krause E, Wiesner B, Beyermann M, Bienert M (1997) Extensive cellular-uptake into endothelial cells of an amphipathic beta-sheet forming peptide. *FEBS Letters* 415, 196–199.
- Bellet-Amalric E, Blaudez D, Desbat B, Graner F, Gauthier F, et al. (2000) Interaction of the third helix of Antennapedia homeodomain and a phospholipid monolayer, studied by ellipsometry and PM-IRRAS at the air-water interface. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1467, 131–143.
- Yang JT, Wu CS, Martinez HM (1986) Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods in enzymology* 130, 208–269.
- Reed J, Reed TA (1997) A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Analytical Biochemistry* 254, 36–40.
- Venymamov SY, Baikov IA, Shen ZM, Wu CSC, Yang JT (1993) Circular dichroic analysis of denatured proteins - inclusion of denatured proteins in the reference set. *Analytical Biochemistry* 214, 17–24.
- Maupetit J, Derreumaux P, Tuffery P (2009) PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Research* 37, W498–W503.
- Maupetit J, Derreumaux P, Tuffery P (2010) A Fast Method for Large-Scale De Novo Peptide and Mini-protein Structure Prediction. *Journal of Computational Chemistry* 31, 726–738.

41. Maupetit J, Tuffery P, Derreumaux P (2007) A coarse-grained protein force field for folding and structure prediction. *Proteins* 69, 394–408.
42. Duvignaud JB, Leclerc D, Gagne SM (2010) Structure and dynamics changes induced by 2,2,2-trifluoro-ethanol (TFE) on the N-terminal half of hepatitis C virus core protein. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 88, 315–323.
43. Kawaguchi A, Suzuki T, Kimura T, Sakai N, Ayabe T, et al. (2010) Functional analysis of an alpha-helical antimicrobial peptide derived from a novel mouse defensin-like gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398, 778–784.
44. Steckbeck JD, Craigo JK, Barnes CO, Montelaro RC (2011) Highly Conserved Structural Properties of the C-terminal Tail of HIV-1 gp41 Protein Despite Substantial Sequence Variation among Diverse Clades: Implications for Functions in Viral Replication. *Journal of Biological Chemistry* 286, 27156–27166.
45. Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* 292, 195–202.
46. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* 4, 435–447.
47. Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL (2001) Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *Journal of Physical Chemistry B* 105, 6474–6487.
48. Essman U, Perela L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, et al. (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics* 103, 8577–8592.
49. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 14, 33–38.

4^{ème} article

Use of the NFL-TBS.40-63 peptide to improve lipid nanocapsules (LNC) uptake in GL261 mouse glioma cells.

Julien Balzeau, Maud Pinier, Raphael Berges, Patrick Saulnier, Jean-Pierre Benoit and Joel Eyer. Soumis à Biomaterials.

Les nanocapsules lipidiques (LNC) représentent une nouvelle voie de délivrance d'agents anticancéreux dans le traitement des gliomes. Ces nanovecteurs, dont la taille peut varier suivant leur composition, sont biocompatibles et peuvent incorporer des molécules lipophiles dans leur cœur lipidique. L'entrée préférentielle du peptide NFL-TBS.40-63 dans les cellules de gliome, décrite dans le second article, s'est révélée intéressante pour le ciblage de ces nanovecteurs vers les cellules cancéreuses par rapport aux astrocytes ou aux neurones.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les interactions entre le peptide NFL-TBS.40-63 et les LNC. Les propriétés tensio-actives du peptide, capacités d'une molécule à avoir une partie hydrophile et une partie lipophile, ont été testées par des mesures de tensiométrie. Une goutte d'huile (Labrafac® dans la formulation) est formée dans de l'eau, puis différentes concentrations de peptide sont ajoutées, et la tension superficielle à l'interface huile/eau est mesurée (**Figure 1A**). Cette tension diminue entre l'huile et l'eau en présence de peptide, démontrant des propriétés tensio-actives. La formulation comportant un agent tenio-actif hydrophile non-ionique à sa surface, le Solutol®, les mêmes expériences ont été réalisées en présence de cette molécule, afin de déterminer si le peptide NFL-TBS.40-63 s'insérait entre les molécules de Solutol®, ou s'il s'adsorbait à la surface (**Figure 1B**). L'ajout de concentrations croissantes de peptide ne modifiant pas la tension superficielle, nous en avons déduit que le peptide NFL-TBS.40-63 s'adsorbe à la surface de la couche de Solutol®, en interaction avec les chaînes polaires de PEG (**Figure 1C**).

La quantité de molécules de peptide adsorbée à la surface des LNC a été évaluée par dosage BCA à $48,3 \pm 7$ % de la masse totale de peptide. Sachant que la totalité du Labrafac® et du Lipoid® (tensio-actif lipophile formant une coque solide autour du Labrafac®) se retrouve dans les capsules assimilées à des sphères d'environ 50 nm (Minkov et al., 2005), une évaluation montre qu'environ 45 à 60 molécules de peptide NFL-TBS.40-63 s'insèrent à la surface d'une nanocapsule de 50 nm.

Afin de suivre les LNC et d'évaluer leur incorporation dans les cellules, un fluorochrome lipophile proche infra-rouge, le DiD, a été inclus dans leur cœur lipophile. Différentes dilutions des LNC contenant du DiD et fonctionnalisées ou non avec le peptide NFL-TBS.40-63 sont mises à incuber pendant 6 heures avec des cellules de gliome de souris GL261 ou des astrocytes de souris. La fluorescence des cellules est ensuite mesurée par cytométrie en flux (**Figure 2A**) et par microscopie à fluorescence (**Figure 2B**), montrant que les LNC fonctionnalisées rentrent 6 à 13 fois mieux dans les cellules de gliome GL261, et entre 5 et 7 fois mieux dans les astrocytes, selon les dilutions.

Le Paclitaxel a été choisi comme agent anticancéreux pour être incorporé dans les LNC par sa nature lipophile (encapsulation dans le cœur des LNC) et son action sur cette lignée de gliome. Les différentes formulations contenant ou non du Paclitaxel et fonctionnalisées ou non avec le peptide NFL-TBS.40-63 ont été testées pour leur action sur la viabilité des cellules GL261 (**Figures 3A et B**) et des astrocytes (**Figures 3C et D**). Après 72 heures de traitement, seulement 34,3 % des cellules GL261 sont vivantes avec la plus forte dose de Paclitaxel seul (1 μ M). En comparaison, 44,7 % et 53 % des cellules GL261 survivent après traitement avec les LNC-Paclitaxel-Peptide et LNC-Paclitaxel, respectivement. Pour les astrocytes, après 72 heures de traitement avec le Paclitaxel seul (1 μ M), 81 % des cellules sont vivantes, contre 100,8 % des cellules traitées avec les LNC-Paclitaxel et 94,8 % pour celles traitées avec les LNC-Paclitaxel-Peptide. Les LNC sans Paclitaxel, avec ou sans peptide, ne sont pas toxiques pour les deux types cellulaires à ces concentrations.

Enfin, ces différentes formulations ont été testées *in vivo* sur un modèle de souris C57Bl/6 porteuses d'un gliome GL261 (**Figure 4**). Six jours après implantation de 50 000 cellules dans le striatum droit, les souris sont traitées avec les différentes formulations contenant du DiD afin de les suivre. Après 15 jours, la fluorescence du DiD est analysée avec le système d'imagerie pour petit animal Maestro (**Figure 4A**), puis les animaux sont sacrifiés, les cerveaux prélevés et congelés afin de réaliser des coupes sériées (**Figure 4B**). L'analyse des marquages immunohistologiques montrent en rouge la fluorescence du DiD sur les différentes coupes. Les différentes LNC se retrouvent localisées en périphérie de la tumeur, et peu dans son cœur. La fluorescence du DiD incorporée dans la tumeur est plus importante lorsque les souris sont traitées avec les LNC fonctionnalisées avec le peptide NFL-TBS.40-63, indiquant une rétention plus importante de ces LNC dans le tissu cancéreux.

L'état général des souris a été suivi tout au long de l'expérience, avec la mesure quotidienne du poids des animaux (**Figure 4C**). 21 jours après implantation de la tumeur chez les animaux, toutes les souris présentent une perte de poids par rapport au début de l'expérience, sauf les souris traitées avec les LNC-Paclitaxel-Peptide. La mesure des volumes tumoraux révèle que les souris traitées avec le tampon salin présentent un volume moyen de $96 \pm 15,1 \text{ mm}^3$ contre $38,8 \pm 10,9 \text{ mm}^3$ pour les souris traitées avec les LNC-Paclitaxel, soit une réduction de 60 % du volume de la tumeur. Les souris traitées avec les LNC-Paclitaxel-Peptide présentent une réduction de 75 % du volume de leur tumeur, avec un volume tumoral moyen de $24,1 \pm 8,2 \text{ mm}^3$. Ces résultats montrent un intérêt considérable pour le peptide NFL-TBS.40-63 comme agent favorisant la délivrance ciblée de ces LNC dans le tissu cancéreux formé par ces gliomes.

The NFL-TBS.40-63 peptide improves the *in vitro* and *in vivo* targeted uptake of lipid nanocapsules by glioblastoma cells

Julien Balzeau, Maud Pinier, Raphael Berges, Patrick Saulnier⁽¹⁾, Jean-Pierre Benoit⁽¹⁾ and Joel Eyer*.

Laboratoire Neurobiologie & Transgenese, UPRES-EA3143, Bâtiment IBS, Centre Hospitalier Universitaire, 49033 Angers, France.

(1): Micro et Nanomédecine en Thérapeutique (MINT), UMR INSERM 1066, Bâtiment IBS, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, 49033, France.

***Corresponding author:** Joel Eyer, Laboratoire de Neurobiologie et Transgenese, UPRES-EA3143, Bâtiment IBS, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, 49033, France.
Joel.eyer@univ-angers.fr Tel: +33 2 44 68 84 88 Fax: +33 2 44 68 84 89

Abstract

We previously described a neurofilament derived cell-penetrating peptide, NFL-TBS.40-63, that specifically enters in glioblastoma cells where it disturbs the microtubule network both *in vitro* and *in vivo*. The aim of this study is to test whether this peptide can increase the targeted uptake by glioblastoma cells of lipid nanocapsules (LNC) filled with Paclitaxel, and thus can increase their anti-proliferation *in vitro* and *in vivo*. Here, using the drop tensiometry we show that approximately 60 NFL-TBS.40-63 peptides can bind to one 50 nm lipid nanocapsule. When nanocapsules are filled with a far-red fluorochrome (DiD) and Paclitaxel, the presence of the NFL-TBS.40-63 peptide increases their uptake by glioblastoma cells in culture as evaluated by FACS analysis, and thus reduces their proliferation. Finally, when such nanocapsules were injected in mice bearing a glioma tumour, they are preferentially targeted to the tumour and reduce its progression. Together, these results show that nanocapsules functionalized with the NFL-TBS.40-63 peptide represent a powerful novel drug-carrier system for glioma targeted treatment.

Keywords: glioblastoma, lipid nanocapsules, NFL-TBS.40-63 peptide, Paclitaxel

1. Introduction

Malignant glioma represent the most prevalent primary tumour of the central nervous system (about 5 for 100 000), and they can develop at all ages [1]. Despite a combined therapy including surgery when possible, radiotherapy (60 Gy, 30 fractions of 2 Gy) and chemotherapy (Temozolomide or Carmustine), the median survival is only 15 to 18 months [2, 3].

New vectors for the treatment of cancer have been developed to deliver locally anticancer drugs. Some were tested in clinical trials, like liposomes [4, 5] and microparticles [6] in many cancers. Use of Carmustine wafer in glioma treatment with radiotherapy and concomitant Temozolomide chemotherapy appears to be safe and feasible, but the beneficial effect is limited [7]. Different innovated vectors are investigated to enhance the delivery of drugs in glioma cells, like liposomes coated with a PEGylated vitamin E [8]. Recently, lipid nanocapsules (LNC) were developed by Heurtault et al. [9], that can be internalized in 9L rat glioma cell line to deliver different molecules, including Paclitaxel [10], Rhenium-188 [11] or Ferrociphenol [12].

Cell penetrating peptides (CPPs), also known as protein transduction domains, can translocate through cell membranes. Thus, they received a great attention as promising instruments for drug delivery. They were used to deliver drugs, imaging agents, and other possible therapeutic molecules [13]. We recently demonstrated that a peptide derived from the intermediate filament protein neurofilament (NFL-TBS.40-63 peptide) interacts with tubulin and can alter the microtubule network [14]. Moreover, this peptide behaves as a CPP because it enters specifically in rat (9L and F98), mouse (GL261) and human (T98G and U87-MG) glioblastoma cell lines, where it disrupts their microtubule network, without affecting healthy cells like astrocytes or neurons. When injected in Fisher rat bearing a F98 glioma, it provokes a strong reduction of the tumour progression [15].

In this study, we investigated whether this peptide can increase the targeted uptake by glioblastoma cells of lipid nanocapsules filled with Paclitaxel, and therefore could increase their anti-proliferation *in vitro* and *in vivo*. First, we characterized by drop tensiometry the binding properties of the NFL-TBS.40-63 peptide to the LNC. Then, the peptide functionalized or unfunctionalized LNC containing DiD (a far-red fluorochrome) and Paclitaxel were tested for their uptake and toxicity on mice glioma and astrocytes. They show an increased anti-proliferative activity when functionalized with the NFL-TBS.40-63 peptide but no major effect on astrocytes. Finally, when mice bearing GL261 glioma were treated with different LNC formulations, the NFL-TBS.40-63 peptide enhanced the antitumor property of the Paclitaxel filled nanocapsules, and restricted their distribution to the tumour and its periphery. Together, these results show that the NFL-TBS.40-63 peptide improves the targeted uptake of LNC by glioblastoma cells both *in vitro* and *in vivo*, and thus improves their efficiency.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Biotinylated peptides were synthesized (more than 95% purity) by Millegen (Toulouse, France). Labrafac[®] WL 1349 (caprylic-capric acid triglycerides) was purchased from Gattefosse SA (Saint-Priest, France), Solutol[®] HS15 (Free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) from BASF (Ludwigshafen, Germany), Lipoïd[®] S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany), and lipophilic DiD from Invitrogen (Villebon sur Yvette, France). Paclitaxel was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Deionized water was produced by a Milli-Q plus system (Millipore, France).

2.2. Preparation of lipid nanocapsules (LNC)

2.2.1. LNC preparation

50-nm-diameter LNC were prepared according to a previously described process [9]. To obtain LNC suspension, Solutol[®] HS15 (17% w/w), Lipoïd[®] (1.5% w/w), NaCl (1.75% w/w), Labrafac[®] (20% w/w) and water (59.75% w/w) were mixed and heated (85°C) under magnetic stirring. Three cycles of progressive heating and cooling between 60°C to 85°C were carried out. During the last cooling, 27.5 µl of DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate, dissolved at 1 mg/mL in absolute ethanol, Life Technologies, Saint Aubin, France) was added at 78-80°C. LNC suspension was formed following the irreversible shock induced by the addition of cold deionised water when the temperature was at 70-75°C. Slow magnetic stirring was then applied to cool down the preparation during 5 minutes.

2.2.2. NFL-TBS.40-63-coupled LNC

After the characterization of LNC (size, polydispersity index, zeta potential), 1 mL of LNC suspension was incubated during 24 hours with 369 μ L of 1 mM NFL-TBS.40-63 peptide dissolved in MilliQ purified water at room temperature in the dark under slow magnetic rotation (NFL-TBS.40-63 final concentration: 0.27 mM). For the LNC without peptide (control), 1 mL of LNC suspension was incubated under the same conditions with 369 μ L of MilliQ purified water. Then, characterization of the LNC-NFL and LNC was carried out to control the quality of LNC.

2.2.3. Paclitaxel-loaded LNC

To load anticancer agent into the oily core of the LNC, Paclitaxel was prepared according to Garcion [10]. Briefly, 10 mg of Paclitaxel was dissolved in a solution of 103 mg ethanol, 103 mg of dichloromethane and 5 mg of cholesterol 95 %. Solutol HS15, Labrafac, Lipoïd, NaCl and deionized water were added to this solution, and formulation was done as described above, with evaporation of dichloromethane and ethanol during the process. The final concentration after dilution due to the peptide incorporation was 1.71 mM of Paclitaxel, according to the initial amount of Paclitaxel.

2.3. Characterization of the particles

Nanocapsules were analyzed using a Malvern Zetasizer Nano Serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). For the measurement, LNC were diluted 1:60 (*v/v*) in MilliQ purified water. The average hydrodynamic diameter, the polydispersity index and the zeta potential were determined at 25°C in triplicate (**Table 1**).

2.4. Evaluation of the amount of NFL-TBS.40-63 peptide binding to the LNC

We evaluated the amount of the NFL-TBS.40-63 peptide adsorbed on purified non-loaded LNC (i.e. without encapsulated drug) using BCA Uptima (Interchim, Montluçon, France). Briefly, the LNC were separated from the water phase using an Amicon[®] Ultra-0.5 with a 100 kDa cut-off (Millipore, Paris, France). Following the adsorption process, the samples were centrifuged during 30 min at 4000 g to collect the water phase containing the unbound NFL-TBS.40-63 peptide. Then, to recover the LNC with the adsorbed peptide, the filter was placed upside down in a micro centrifuge tube and centrifuged 2 min at 1000 g. The original sample and the different fractions were measured. The positive control consisted of free NFL-TBS.40-63 peptide.

Each water phase sample (first collection) was diluted (1:4 *v/v*). Then, 25 μ L of each sample was placed into a 96-well plate and 200 μ L of BCA reagent was added. Absorbance was measured at 562 nm on a plate reader (Spectra Max M2, Molecular device, USA) following 1 hour incubation at 37°C. The difference between the free NFL-TBS.40-63 peptide and the unbound NFL-TBS.40-63 peptide present in the water phase of the LNC samples represents the fraction of the NFL-TBS.40-63 peptide adsorbed on the LNCs. A calibration curve was performed using increasing concentrations of peptide. The linearity of the titration method for the NFL-TBS.40-63 peptide was verified, up to 800 μ g/mL ($r^2 > 0.99$). Measurements were performed twice on 3 different batches of LNC-NFL ($n=6$).

2.5. Drop tensiometry measurements

Surface tension measurements were performed at the oil/water interface with a drop tensiometer device (Tracker Teclis, Longessaigne, France). A drop of Labrafac[®] (oily phase) was formed using an Exmire microsyringe (Prolabo, Paris, France) into an optical glass cell (Hellma, France) containing the NFL-TBS.40-63 peptide (up to $12.85 \cdot 10^{-5}$ M) solubilized in milliQ water

(aqueous phase). The axisymmetric shape of the rising drop was analyzed in real time at room temperature using a video camera connected to a computer. The volume of the droplet was maintained constant (5 μL) using a stepping motor connected to a microcomputer to control the drop volume in order to get a link between molecule adsorption and the surface tension. Saturation is obtained once the tension reached a plateau. Measurements were performed on 3 to 8 independent droplets. Each surface tension was calculated once equilibrium was reached, and corresponds to the complete saturation of the interface.

In another set of experiments Solutol[®] (10^{-4} M) was adsorbed at the oil/water interface, and once the equilibrium was reached, the NFL-TBS.40-63 peptide was added in the aqueous phase and compared to Solutol[®]-NFL-TBS.40-63 concomitant adsorption. Surface tension values were recorded, once the surface tension reached a plateau. Measurements were performed on 3 independent droplets. For the calculation of the surface pressure, densities of products, 0.945 and 0.999, for Labrafac[®] and water respectively, at 25°C, were taken into account.

2.6. Cellular analysis of LNC uptake by flow cytometry and fluorescent microscopy

For flow cytometer analysis, GL261 glioma cells and primary astrocytes [16] were seeded in 6-well plates at 4×10^5 cells per well for 12 hours at 37°C/5% CO₂. LNC-(DiD), LNC-(DiD)-NFL and vehicle were incubated at different dilutions (1:100, 1:200, 1:400 and 1:1000) for 6 hours in fresh DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza, Levallois-Perret, France). After incubation, cells were washed twice with DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Levallois-Perret, France) and incubated with Trypsin-EDTA 1X (Sigma, St Quentin Fallavier, France) for 15 minutes, to release LNC attached to the membrane. Cells were washed 3 times with PBS, centrifugated at 2000 rpm for 5 minutes, and counterstained with propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) before analysis on a BD FACSCalibur fluorescent-activated flow cytometer and using the BD CellQuest Software (BD Biosciences). Experiments were done in triplicate, and 20 000 cells were measured for each experiment.

For the fluorescent microscopy analysis, cells were cultured in 2-wells Lab-Tek chambers (1000 cells per well, Thermo Fisher Scientific, USA) for 12 hours before incubation with the different formulations or vehicle for 6 hours. After incubation, medium was discarded, and 1 mL of fresh DPBS was added per well. Cells were analyzed with an inverted fluorescent microscope (Leica DMI 6000 with a CoolSNAP-HQ2 camera), and using the Metamorph 7.1.7.0 software to evaluate the DiD fluorescence.

2.7. Cell viability analysis

Mouse glioma cells (GL261, 2×10^4 cells/mL) and primary astrocytes (1×10^6 cells/mL) were prepared [16], and 200 μ L of such a cell suspension was incubated in 96-well plates for 24 hours. Then, the culture media was removed and different LNC formulations diluted in fresh media were tested for 72 hours at 37°C. Following the treatment, 100 μ L of fresh media was added in each well, and cell viability was measured using the MTS/PMS survival assay. Briefly, 25 μ L of a mixture of MTS (3-carboxymethoxyphenyl-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Promega, Madison, USA) and PMS (phenazine methosulfate, Promega, Madison, USA) at a MTS-to-PMS ratio of 1:20 was added to the fresh media for 4 hours of incubation. The number of living cells is directly proportional to the intensity of coloration measured by the amount of 490 nm light absorbance in a SpectraMax M2 multi-scanning spectrophotometer. The absorbance determined following the incubation of cells with only the culture media was considered as 100% survival.

2.8. *In vivo* experiments of C57Bl6 mice bearing GL261 glioma

Female C57Bl6 mice (7 to 8 weeks old) were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). All experimental procedures and animal care were carried out in conformity with the guidelines of the European regulations. Mouse GL261 cells were detached

with Trypsin-EDTA 1X, washed twice in DMEM, counted, and diluted at 25×10^6 cells per mL. Animals (5 per group) were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of Ketamine 10% (0.8 $\mu\text{L/g}$) and Xylazine 2% (0.5 $\mu\text{L/g}$). 2 μL of the cell suspension were injected by stereotaxy in the right striatum, 1 mm anterior and 2 mm lateral to the bregma, 3.5 mm deep, at a flow rate of 0.5 μL per minute.

Six days after the GL261 cells implantation, 10 μL of LNC-(DiD), LNC-(DiD)-NFL, LNC-(DiD, Paclitaxel), LNC-(DiD, Paclitaxel)-NFL or vehicle were injected by slow-infusion CED (Convection-Enhanced Delivery) with an osmotic pump, at the same coordinates and the same flow rate. This volume corresponds to 14.6 μg of Paclitaxel per animal, according to the initial amount of Paclitaxel.

Animals were monitored each day for their clinical status (weight, ataxia, periorbital haemorrhage), and sacrificed 21 days after cells injection. Before euthanasia, mice were analyzed with the multispectral Maestro Imaging System (CRI, Caliper Life Sciences, USA) and using the Maestro 2.10.0 software to determinate if brains were still fluorescent for DiD. Brains were then removed, frozen in isopentane at -30°C and stored at -80°C before analysis.

2.9. Histological analysis and measurement of tumour size

Serial sections (20 μm thick) of frozen brains were obtained using a Leica cryostat, and stained with hematoxylin and eosin to distinguish tumour from the healthy tissue. Images of sections were captured with a Leica Z16APO microscope using the Leica Application Suite 2.8.1 software. The tumour area was measured with the ImageJ software, and knowing the thickness of all sections, the volume of the tumour was calculated.

2.10. Immunohistochemical analysis of LNC localization in brain section

Frozen brain sections (12 μm) were dried for 30 minutes at room temperature in the dark to protect DiD fluorescence before montage with Vectashield® Hard Set Mounting Medium containing DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories, Burlingame, USA). The pictures were taken using a Leica DMI6000 inverted microscope and a CoolSNAP HQ2 camera, and analyzed with the Metamorph7.1.7.0 software.

2.11. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. (bars). Cellular incorporation, viability data and tumour size were analyzed with Student's t test using Prism 4.00 (GraphPad software, San Diego, USA). Asterisks indicate significant level *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$ and ***, $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Fixation and quantification of the amount of NFL-TBS.40-63 peptide on LNC

The lipid nanoparticles (LNC) were widely described as cargo for various components [10, 11]. Recently, we showed that the NFL-TBS.40-63 peptide selectively targets glioblastoma cells both *in vitro* and *in vivo* [15]. Here, we determined if such LNC could be functionalized with this peptide to improve their targeted uptake by glioblastoma.

LNC were prepared using an emulsion inversion phase process [9]. Particles were characterized using a Malvern Zetasizer (**Table 1**). The average size of particles is 56.22 ± 0.05 nm and 54.73 ± 0.1 nm for respectively LNC and LNC-Paclitaxel. The polydispersity index for the different formulations is always inferior at 0.2, indicating a unique population of spherical nanoparticles with a diameter about 55 nm. The zeta potential is slightly negative (-8.7 ± 1.21 mV and -8.45 ± 1.93 mV for LNC and LNC-Paclitaxel respectively), due to the presence of PEG at the surface, reducing the non-specific binding of LNC.

After particles characterization, 1 mg of solubilized NFL-TBS.40-63 peptide (1 mM) was added to 1 mL of formulation and incubated at room temperature to allow peptide adsorption. After 24 hours of incubation, LNC with or without peptide were again characterized. The size of LNC-NFL and LNC-Paclitaxel-NFL is 58.17 ± 0.1 nm and 57.9 ± 0.16 nm respectively, with a slightly increase compared to LNC without peptide. The polydispersity is still under 0.2, demonstrating that no aggregates are formed in the preparation. The zeta potential is slightly negative (-6.01 ± 0.47 mV and -5.29 ± 0.5 mV), with a little increase compared to LNC without peptide.

To gain further insight on the interactions between the LNC and the NFL-TBS.40-63 peptide a study of the tension active properties was firstly performed. The surface tension at an interface Labrafac[®]/Water with increasing amount of NFL-TBS.40-63 peptide was measured on a rising

drop with a drop apparatus. The surface tension measured in the presence of increasing concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide progressively decreased (**Figure 1A**), which indicates that the peptide exhibits surfactant property.

To determine whether the NFL-TBS.40-63 molecules are inserted between Solutol[®] molecules at the LNC interface or adsorbed, surface tension was measured at an interface Labrafac[®]/Water containing Solutol[®] (10^{-4} M) and the NFL-TBS.40-63 peptide. This surface tension was compared to a stabilized interface Labrafac[®]/Water containing Solutol[®] (10^{-4} M) followed by the addition of the NFL-TBS.40-63 peptide. As shown in **Figure 1B**, the tension remains stable and no statistical difference was observed between the two types of measures. Thus, the interfacial behaviour suggests an interaction with the polar PEG groups of the Solutol[®] and not directly with Labrafac[®]. All these results demonstrate that the NFL-TBS.40-63 peptide is adsorbed at the surface of the surfactant layer, illustrated in **Figure 1C**.

To evaluate the amount of NFL-TBS.40-63 peptide adsorbed on the LNC, BCA assay was performed after LNC-NFL centrifugation using an Amicon[®] Ultra-0.5 with a 100 kDa cut-off. LNC-NFL stay in the upper side of the Amicon[®], and unbounded peptide is eluted in the water phase. A peptide calibration curve with BCA assay was compared to this water phase value, and thus unbounded peptide was calculated as $51.7 \pm 7\%$ of the initial amount. Consequently, the NFL-TBS.40-63 adsorption on the peptide was estimated to be $48.3 \pm 7\%$. Assuming that LNC have a spherical shape, that the whole input quantities of Labrafac[®] and Lipoid[®] are confined into the capsules and that the radius of a 56.22 nm LNC is about 23.61 nm (plus 4.5 nm of PEG) [17], we determined that the volume of one nanoparticle is 5.44×10^4 nm³ and that there is 2.15×10^{15} nanoparticles in 1 mL of the preparation. We added 1 mg of peptide ($2712 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) corresponding to 2.22×10^{17} molecules of peptide. With an adsorption estimated to $48.3 \pm 7\%$, its leads to approximately from 43 to 58 molecules of NFL-TBS.40-63 per nanoparticle.

3.2. The NFL-TBS.40-63 peptide enhances LNC incorporation

We demonstrated previously that the NFL-TBS.40-63 peptide can enter in mouse glioma cell lines (GL261), but it poorly penetrates in normal cells (astrocytes and neurons) [14, 15]. Here, we evaluated the capacity of LNC containing DiD fluorochrome and functionalized or not with the NFL-TBS.40-63 peptide to target and penetrate glioma cells. The incorporation of fluorescent LNC in glioma cells was evaluated by FACS and fluorescence microscopy.

Following 6 hours of incubation, the fluorescently filled LNC show a preferential internalization in cells when functionalized with NFL-TBS.40-63 peptide (**Figure 2A**). When tested on GL261 cells and astrocytes, respectively $57.7 \pm 4.7\%$ and $51.1 \pm 6.8\%$ of the cells incorporate LNC-(DiD)-NFL for a 1/100 dilution, versus $9.4 \pm 3.7\%$ and $10 \pm 1.9\%$ for LNC-(DiD) cells. Depending on the dilutions used, the functionalization of LNC with the NFL-TBS.40-63 peptide increases the entrance 6 to 13 fold in GL261 cells and 5 to 7 fold in astrocytes. The improvement of the uptake is also evidenced using fluorescence microscopy (**Figure 2B and 2C**), where the detection of DiD is clearly increased in LNC-(DiD)-NFL treated cells when compared to LNC-(DiD) treated cells.

3.3. Cell viability

We evaluated the effect of LNC formulations on cell survival of GL261 cells and mouse astrocytes. Following 72 hours of incubation, $34.3 \pm 0.8\%$ of glioma cells treated with the highest dose of Paclitaxel survives, compared to $44.7 \pm 2.6\%$ and $53 \pm 2\%$ for LNC-Paclitaxel-NFL and LNC-Paclitaxel respectively (**Figures 3A and 3B**). The LNC without Paclitaxel are not toxic for these cells, whether they are functionalized or not with the NFL-TBS.40-63 peptide. Similarly, the NFL-TBS.40-63 peptide at this dilution is not toxic (data not shown). The same assay was repeated on mice astrocytes primary cultures (**Figures 3C and 3D**). These cells are

less sensitive to Paclitaxel used at the same concentration ($81 \pm 1.6\%$ of survival cells), and no major effect on viability was detected after LNC-Paclitaxel or LNC-Paclitaxel-NFL treatment ($100.8 \pm 4.4\%$ and $94.8 \pm 4.3\%$ respectively). The LNC containing DiD were also tested, but no difference was observed compared to non-fluorescent LNC (data not shown).

3.4. Localization of LNC in the brain of mice bearing GL261 glioma.

For the *in vivo* studies, different sets of LNC containing DiD were injected by stereotaxy in the striatum 6 days after the tumour implantation. After 15 days, the DiD induced fluorescence can be detected with the multispectral Maestro Imaging System (**Figure 4A**). At this macroscopic level, almost all the DiD fluorescence can be detected in the right striatum.

A detailed analysis on 12 μm thick serial sections (**Figure 4B**) and using a fluorescent microscope reveals that the fluorescence on the sections of brains treated with the LNC-(DiD)-NFL is clearly increased when compared to those treated with the LNC-(DiD) that were not functionalized with the peptide. A similar result is observed when LNC also contain Paclitaxel. This shows that the NFL-TBS.40-63 peptide increases the uptake of LNC by the tumour. Moreover, while almost all the fluorescence is localized to the tumour when the animals are treated with the LNC functionalized with the NFL-TBS.40-63 peptide, several fluorescent signals can be found in the left hemisphere (which does not contain the tumour) when the LNC are not functionalized with the peptide. These observations clearly indicate that the LNC are well targeted to the tumour when they are functionalized with the NFL-TBS.40-63 peptide, while many LNC are not localized to the tumour when they are not functionalized with the peptide.

3.5. Effects of Paclitaxel filled LNC, alone or functionalized with the NFL-TBS.40-63 peptide on C57Bl/6 mice bearing GL261 glioma.

Mice bearing GL261 glioma were monitored every day for their behaviour and weight variations (**Figure 4C**). After 21 days, mice in the control group showed a loss of weight of $8.7 \pm 1.3\%$ compared to their initial weight and only $3.9 \pm 5.5\%$ for the LNC-Paclitaxel group (total Paclitaxel dose: 0.8 mg/kg body weight). On the opposite, the LNC-Paclitaxel-NFL treated mice present an increase of $1.6 \pm 1.5\%$ of their weight. Morphometry studies indicate that the LNC without Paclitaxel show no effect on the tumour size, whether they are functionalized or not with the NFL-TBS.40-63 peptide (**Figure 4B and 4D**). On the opposite, when the mice are treated with the LNC containing Paclitaxel, the tumour volume was reduced from $96 \text{ mm}^3 \pm 15.1$ to $38.8 \text{ mm}^3 \pm 10.9$, corresponding to a 60% reduction of the tumour volume. When the mice are treated with the LNC-Paclitaxel previously functionalized with the NFL-TBS.40-63 peptide, the tumour volume was reduced to $24.1 \text{ mm}^3 \pm 8.2$, corresponding to a 75% reduction of the tumour volume. This clearly shows that the NFL-TBS.40-63 peptide significantly increased the anti-proliferative activity of the Paclitaxel filled LNC.

4. Discussion

We previously showed that intermediate filaments are able to fix tubulin dimers on specific sites named tubulin-binding sites (TBS) [14]. Peptides corresponding to these sequences show different properties, including the capacity to alter tubulin polymerization or to penetrate in nuclei of glioma cells [18]. A peptide corresponding to the TBS sequence located on the neurofilament light subunit (NFL-TBS.40-63), can interact *in vitro* with tubulin, and can enter in multiple glioma cell lines where it inhibits the proliferation of glioma cells by altering their microtubule network. On the opposite, the peptide has no, or poor activities on the other cells of the nervous system, like astrocytes or neurons. Finally, when the peptide is injected in Fischer rats bearing a F98 glioma, it penetrates in the tumour and provokes a strong reduction of its development [15].

In this study, we further investigated the capacity of the NFL-TBS.40-63 peptide to target mouse glioma cells when it is coupled to lipid nanocapsules. Different methods to attach the peptide were tested using biotin- or amino-modified DSPE-PEG, but the internalization of LNC by cells was not increased following such coupling (data not shown). This probably reflected an alteration of the structure and function of the peptide [19]. On the opposite, incubation during 24 hours of the LNC with the NFL-TBS.40-63 peptide without any additional product allows an increased uptake in cells. Dialysis of nanocapsules after the grafting of the peptide to eliminate unbounded and excessive peptide did not modify the uptake compared to undialysed LNC-NFL (data not shown). To test whether the grafting of the peptide to LNC is essential, we also co-incubated LNC with free NFL-TBS.40-63 peptide at 20 μM (data not shown) with cells, but the uptake was similar as LNC without peptide, indicating that the 24 hours incubation for the attachment of the peptide to LNC is necessary. Additional experiments with different LNC and/or peptide concentrations will be proceeding, to confirm these results. The net positive charge at physiological pH (PI=10.3) of the NFL-TBS.40-63 peptide, the negative zeta potential (*c. a* -8.5 mV) at the surface of LNC and the decrease of zeta potential after 24 hours of incubation with the peptide (*c. a* -6 mV) indicate the formation of electrostatic interactions and a

direct adsorption of the peptide (**Figure 1C**). The adsorption on the LNC means that the structure of the peptide is still available for the preferential cell recognition as described previously [19].

Interestingly, the *in vitro* uptake of LNC by mice astrocytes is also enhanced at the same rate as the uptake by glioma cells by the adsorption of the NFL-TBS.40-63 peptide, abolishing the preferential uptake of NFL-TBS.40-63 peptide for glioma cells (**Figure 2**). The diminution of the negative charge of LNC after the adsorption of the peptide could facilitate a general uptake by cells. Alternatively, the structural motif of the peptide responsible for its preferential uptake by glioblastoma cells versus astrocytes [19] could be partially hidden or affected by its bidding to LNC. Further identification of the internalization pathway of the NFL-TBS.40-63 peptide and characterization of the binding strengths by surface plasmon resonance may provide additional information on this process.

The NFL-TBS.40-63 peptide has been shown to reduce *in vitro* the proliferation of glioblastoma cells, and *in vivo* the tumour growth when injected to rat bearing F98 glioma [15]. Thus, the presence of the peptide together with the LNC could have a similar activity. However, when Paclitaxel (20 nM) and the NFL-TBS.40-63 peptide (up to 100 μ M) were added to glioma cells, no difference was observed compared to the addition of Paclitaxel alone (data not shown). This indicates that they do not have synergistic activities, but experiments with different LNC-paclitaxel dilution and/or peptide concentrations will be proceeding. We showed that a single injection of the NFL-TBS.40-63 peptide at 5 mM in a F98 rat glioma model decreased the tumour volume [15], while at 1 mM no significant difference was observed with non-treated rats. As the final concentration of NFL-TBS.40-63 peptide is 0.27 mM in the *in vivo* experiments (**Figure 4**), it clearly shows that only Paclitaxel is responsible for the decrease of the tumour volume.

The LNC are localized mostly around the tumour (**Figure 4B**), and this observation can be linked with results of toxicity. CED allows to overcome the limited distribution volume of LNC

by allowing them to diffuse in the tumour and also in the healthy tissue surrounding the tumour, which is composed mainly of glial and vascular cells. In the tumour, where cells are very proliferative, the LNC can be rapidly captured and degraded, and thus the release of Paclitaxel can inhibit cells growth. Consequently, the presence of DiD in the tumour will rapidly decrease. On the opposite, the LNC around the tumour is captured by astrocytes or vascular cells. Because the Paclitaxel entrapped in LNC has a limited effect on these cells, they are not eliminated and thus DiD can stay longer in them (**Figure 3**) [10]. Alternatively, the LNC is first incorporated into glioblastoma, which then can transdifferentiate into vascular endothelial cells [20], and thus surround the tumour.

Morphometrical studies show that LNC without Paclitaxel did not affect the tumour size (**Figure 4D**), whether they are functionalized or not with NFL-TBS.40-63 peptide. These results are concordant with previous studies showing no effect of blank LNC in rat bearing respectively F98 and 9L glioma model [10, 21]. Here, we demonstrate that a single injection of LNC-Paclitaxel-NFL reduces the glioma growth more efficiently than LNC-Paclitaxel (75% versus 60%). This indicates that the delivery and the efficiency of these nanovectors can be improved using the NFL-TBS.40-63 peptide, and thus represent a promising tool in glioma treatment using Paclitaxel or other lipophilic drugs.

Conclusions

This work demonstrates that the NFL-TBS.40-63 peptide exhibits the ability to enhance delivery of lipid nanocapsules in mouse glioma cells and astrocytes. The delivery of Paclitaxel entrapped in LNC decreases glioma cells proliferation, but has no effect on healthy cells *in vitro*. In mouse bearing GL261 glioma, these LNC containing Paclitaxel and functionalized with NFL-TBS.40-63 peptide present a stronger capacity to inhibit tumour growth compared to unfunctionalized LNC. Therefore, the NFL-TBS.40-63 peptide provides an innovating tool to enhance drug delivery in nanovectors with its ability to penetrate in cells.

Acknowledgements

We are grateful to A. Pasquier for help with the evaluation of tumour volumes. This investigation was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Fonds Européens de Développement Régional (FEDER), Institut National du Cancer (INCA), and Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutiques (CIMATH) to J.E. J.B. was supported by la Région des Pays de la Loire and ARC.

References

- [1] Stupp R, Roila F. Malignant glioma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2009;20:126-128.
- [2] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009;10:459-466.
- [3] Delion M, Moraru C, Almayrac F, Von Langsdorff D, Paquis P, Menei P. [Glioblastoma incident studies from May 2006 to May 2007 in Angers and Nice, France]. *Neurochirurgie* 2010;56:499-502.
- [4] Delgado G, Potkul RK, Treat JA, Lewandowski GS, Barter JF, Forst D et al. A phase I/II study of intraperitoneally administered doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes in patients with ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:812-819.
- [5] Lammers T, Hennink WE, Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer* 2008;99:392-397.
- [6] Menei P, Capelle L, Guyotat J, Fuentes S, Assaker R, Bataille B et al. Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of malignant glioma: a randomized phase II trial. *Neurosurgery* 2005;56:242-248.
- [7] Salvati M, D'elia A, Frati A, Brogna C, Santoro A, Delfini R. Safety and feasibility of the adjunct of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers to the standard multimodal approach to high grade gliomas at first diagnosis. *J Neurosurg Sci* 2011;55:1-6.
- [8] Muthu MS, Kulkarni SA, Xiong J, Feng SS. Vitamin E TPGS coated liposomes enhanced cellular uptake and cytotoxicity of docetaxel in brain cancer cells. *Int J Pharm* 2011;421:332-340.
- [9] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002;19:875-880.

- [10] Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1710-1722.
- [11] Vanpouille-Box C, Lacoeyille F, Belloche C, Lepareur N, Lemaire L, LeJeune JJ et al. Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials* 2011;28:6781-6790.
- [12] Huynh NT, Morille M, Bejaud J, Legras P, Vessieres A, Jaouen G et al. Treatment of 9L gliosarcoma in rats by Ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules based on a passive targeting strategy via the EPR effect. *Pharm Res* 2011;28:3189-3198.
- [13] Said Hassane F, Saleh AF, Abes R, Gait MJ, Lebleu B. Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:715-726.
- [14] Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, Eyer J. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci* 2009;29:11043-11054.
- [15] Berges R, Balzeau J, Peterson AC, Eyer J. A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration and inducing apoptosis. *Mol Ther* 2012;20:1367-1377.
- [16] McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980;85:890-902.
- [17] Minkov I, Ivanova T, Panaiotov I, Proust J, Saulnier P. Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface. I. Kinetics of surface film formation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;45:14-23.
- [18] Balzeau J, Peterson AC, Eyer J. The vimentin-tubulin binding site peptide (Vim-TBS.58-81) crosses the plasma membrane and enters the nuclei of human glioma cells. *Int J Pharm* 2012;423:77-83.
- [19] Berges R, Balzeau J, Takahashi M, Prevost C, Eyer J, Structure-function analysis of the glioma targeting NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site on the light

neurofilament subunit. PLOS One 2012. Available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152907> (DOI: 10.1371/journal.pone.0049436).

[20] Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:4274-4280.

[21] Allard E, Huynh NT, Vessieres A, Pigeon P, Jaouen G, Benoit JP et al. Dose effect activity of Ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model. Int J Pharm 2009;379:317-323.

[22] Vichon-Petit S, Jarnet D, Paillard A, Benoit JP, Garcion E, Menei P. *In vivo* evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy. J Neurooncol 2010;97:195-205.

Legends

Figure 1: Characterization of the interaction between the NFL-TBS.40-63 peptide and LNC

A: Increasing amount of the NFL-TBS.40-63 peptide decreases the surface tension measured at a Labrafac[®]/water interface of a rising drop. Means \pm SD; displayed from 3-8 different droplets.

B: Increasing the amount of the NFL-TBS.40-63 peptide has no influence on the surface tension measured at a Labrafac[®]/water containing Solutol[®] interface of a rising drop, during the formation of the interface (solid line), nor after the stabilization of the interface (dashed line). Means \pm SD; displayed from 3 different droplets.

C: A schematic representation of the interfacial organization of NFL-TBS.40-63 adsorbed at the LNC surface.

Figure 2: Preferential incorporation in GL261 cells and mouse astrocytes of LNC grafted with the NFL peptide

A: GL261 cells (left panel) or mouse astrocytes (right panel) were incubated with different dilutions (1/100; 1/200; 1/400 and 1/1000) of LNC-(DiD) and LNC-(DiD)-NFL for 6 hours. The fluorescence of DiD was measured using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Statistically significant differences were evaluated by Student's t-test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.001$).

B: GL261 cells incubated during 6 hours in the presence of LNC-(DiD), LNC-(DiD)-NFL or PBS (1/100) in Lab-Tek chambers, and then observed with an inverted fluorescent microscope. Scale bar = 50 μm .

C: Mouse astrocytes incubated during 6 hours in the presence of LNC-(DiD), LNC-(DiD)-NFL or PBS (1/100) in Lab-Tek chambers, and then observed with an inverted fluorescent microscope. Scale bar = 50 μm .

Figure 3: Cytotoxicity effects of different LNC on GL261 cells and mouse astrocytes.

The cell survival of GL261 cells (A and B) and mouse astrocytes (C and D) was determined by MTS Cytotoxicity assay (Promega) after 72 hours of treatment with various concentrations of Paclitaxel alone, and LNC with or without Paclitaxel and functionalized or not with NFL-TBS.40-63 peptide.

Figure 4: *In vivo* localization and effects of the different LNC on tumour size following their injection in mice brain bearing a GL261 tumour.

A: Pictures of mice bearing a tumour 21 days after the implantation of GL261 cells and 15 days after the intra-tumoral injection of LNC. The upper mouse was treated with 10 μ L of LNC-(DiD)-NFL and the lower mouse with 10 μ L of vehicle. DiD was localized with the multispectral Maestro Imaging System (CRI, Caliper Life Sciences). Scale bar = 1 cm.

B: Coronal sections of the brain stained with hematoxylin/eosin (line on the left) or immunofluorescently stained with Vectashield[®] containing DAPI (lines on the right). Red fluorescence shows LNC containing DiD. Scale bar = 200 μ m.

C: Daily weight monitoring of the animals during the experiment. Weights are represented as the mean of five animals in each group, \pm standard deviation.

D: Tumour volumes of C57Bl6 mice bearing a GL261 glioma and treated with 10 μ L of different formulations (LNC-(DiD), LNC-(DiD)-NFL, LNC-(DiD, Paclitaxel), LNC-(DiD, Paclitaxel)-NFL or control). Statistically significant differences were evaluated by Student's t-test compared to control (**: $p < 0.005$; ***: $p < 0.001$; n. s.: not significant).

Table 1: Physicochemical characteristics of different LNC formulations

	Mean particle size (nm)	Polydispersity PDI	Zeta potential (mV)	Encapsulation rate (%)
LNC	56.22 ± 0.05	0.046 ± 0.009	-8.70 ± 1.21	-
LNC-NFL	58.17 ± 0.10	0.085 ± 0.010	-6.01 ± 0.47	-
LNC-(Paclitaxel)	54.73 ± 0.10	0.123 ± 0.004	-8.45 ± 1.93	93.0 ± 3.1
LNC-(Paclitaxel)-NFL	57.90 ± 0.16	0.175 ± 0.011	-5.27 ± 0.50	[10, 22]

Figure 1

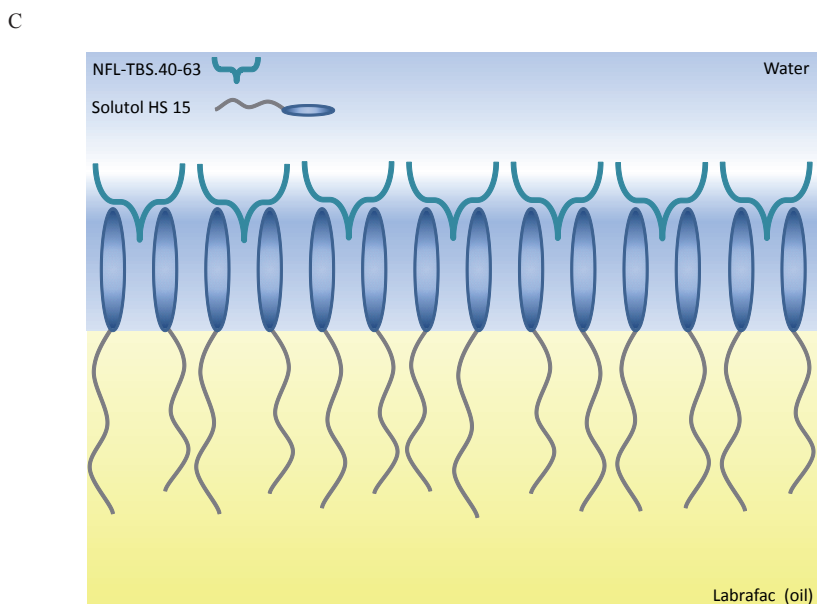
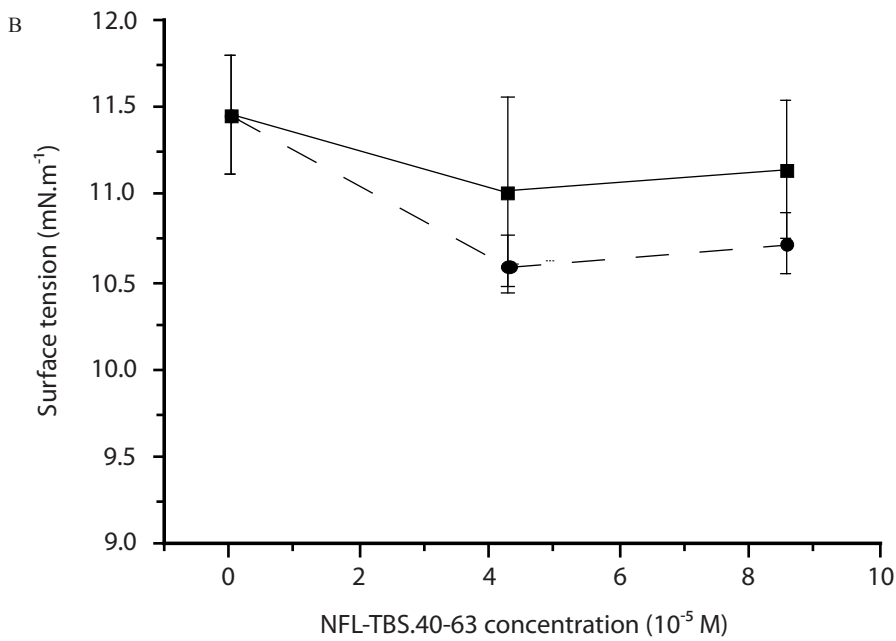
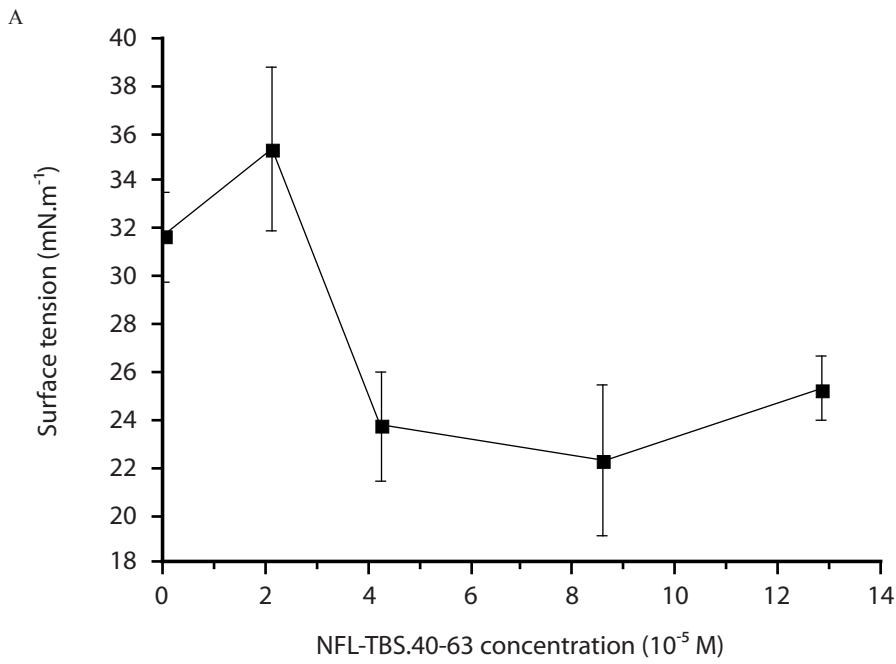


Figure 2

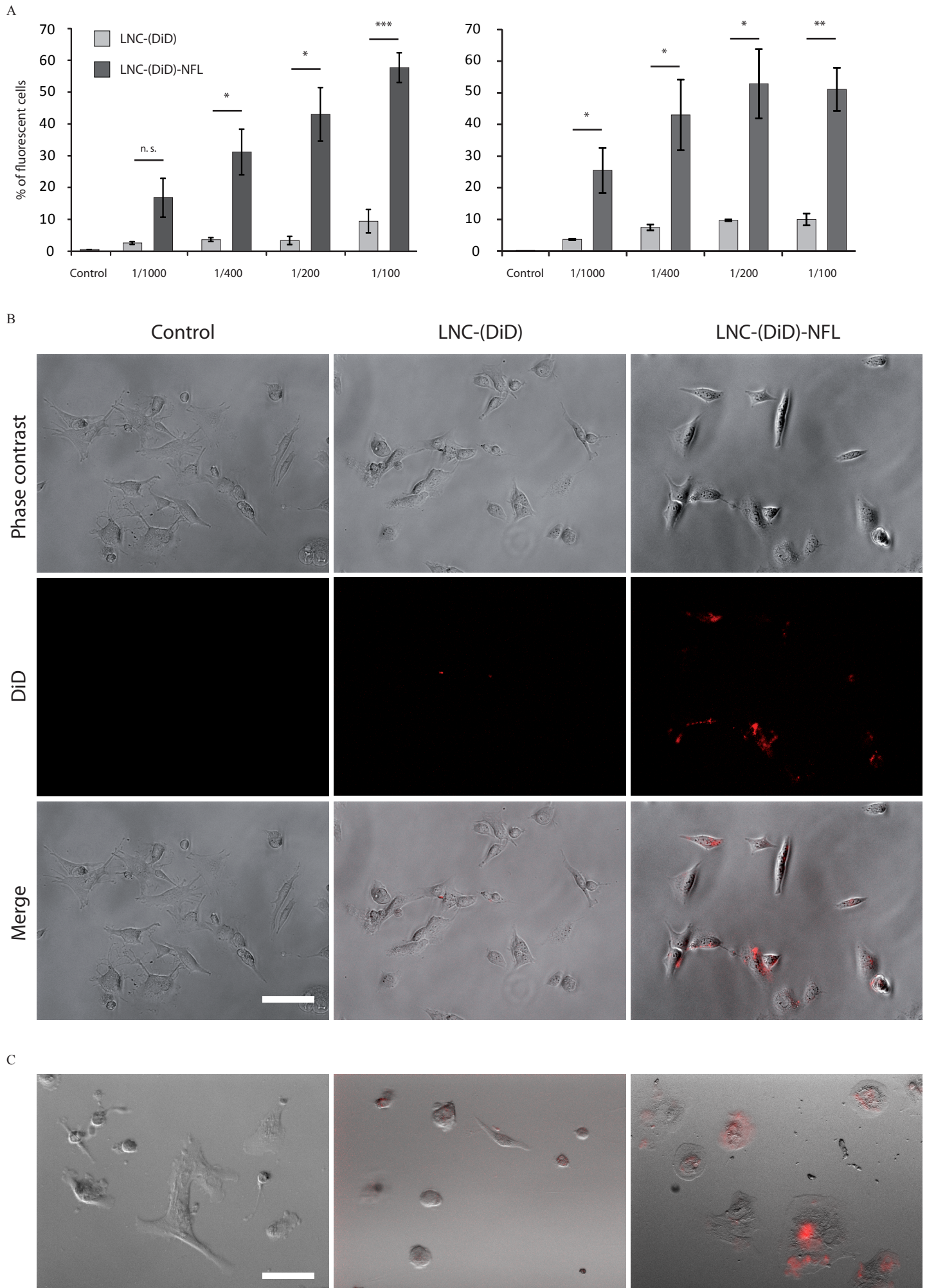


Figure 3

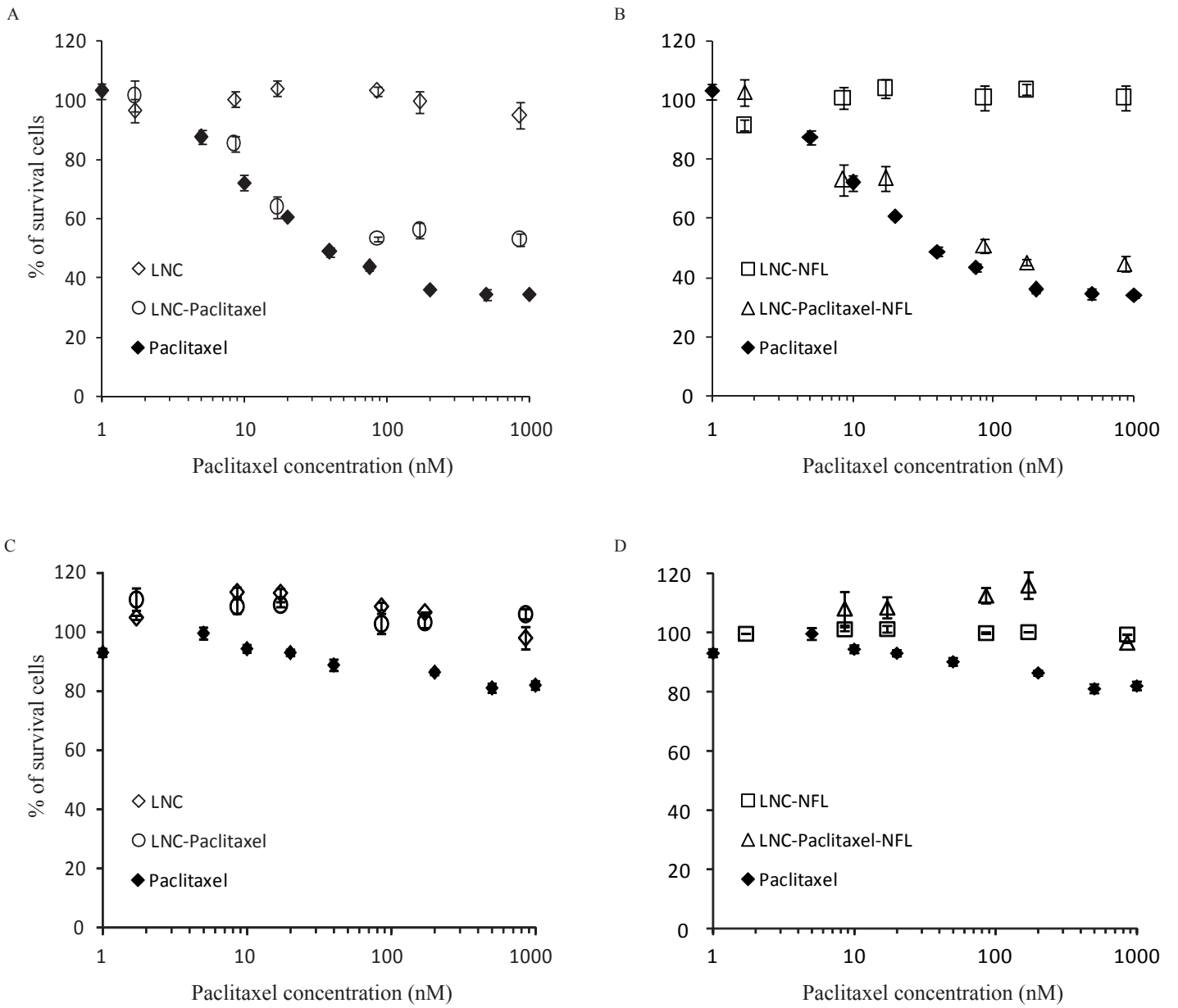
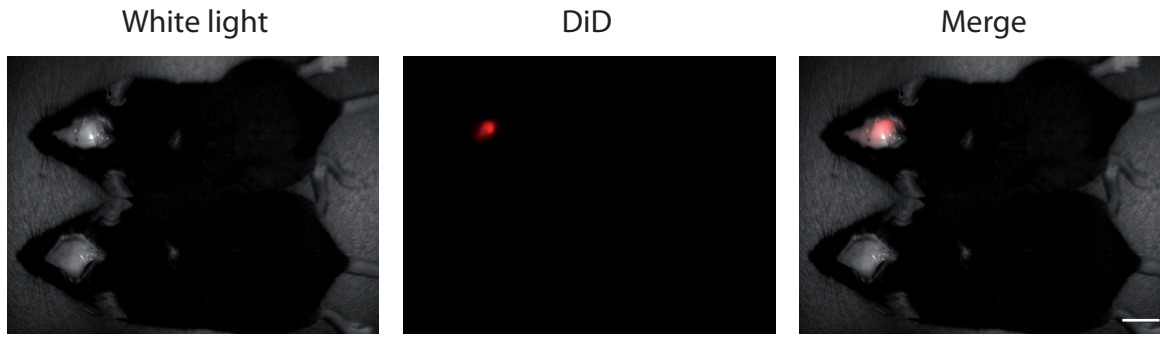
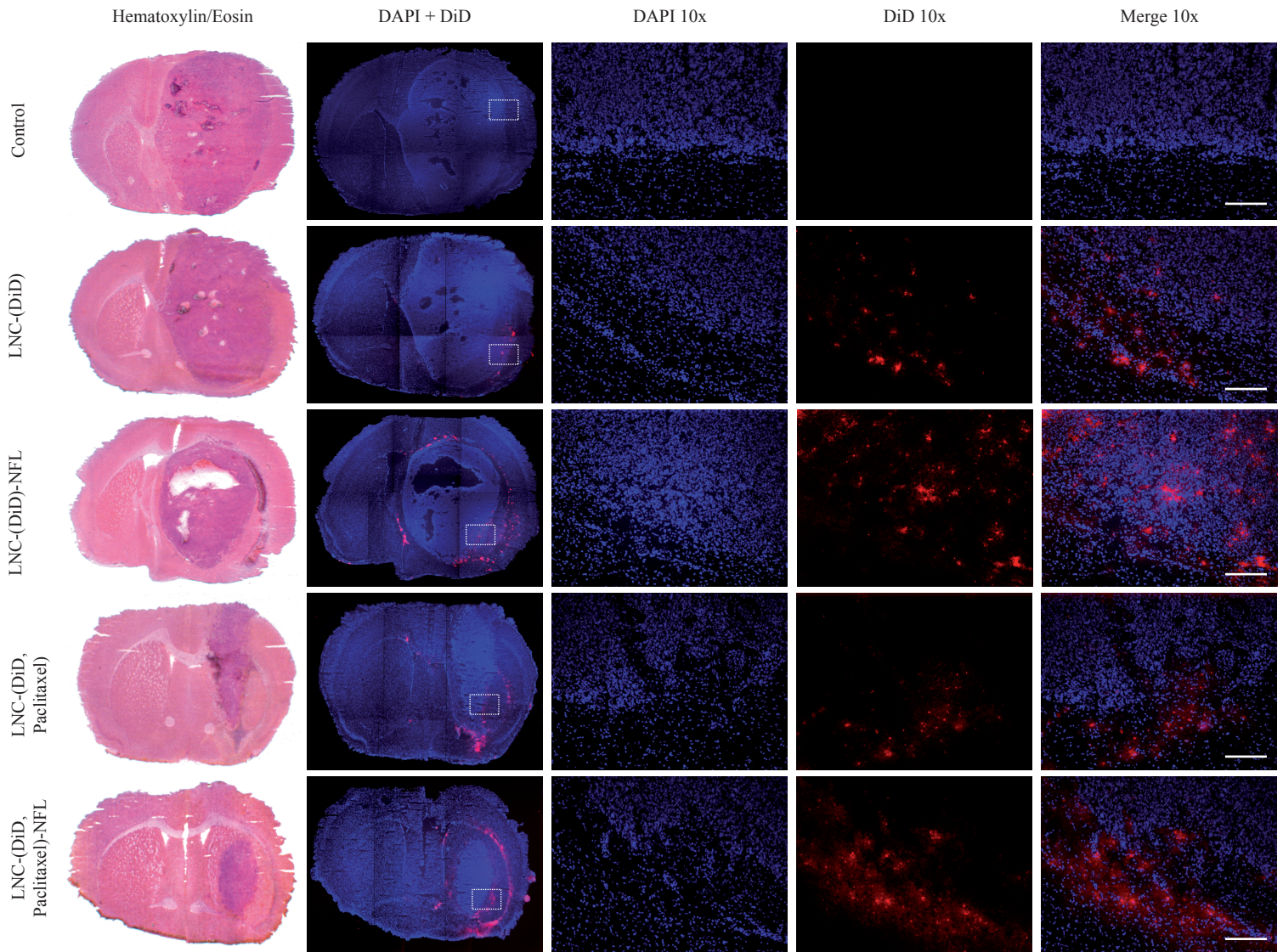


Figure 4

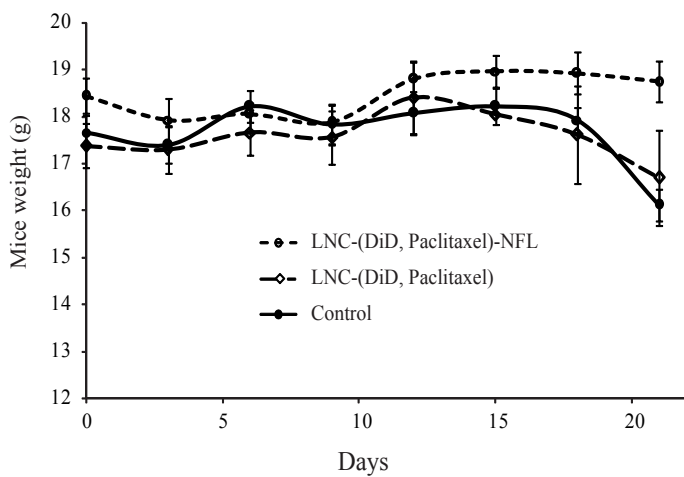
A



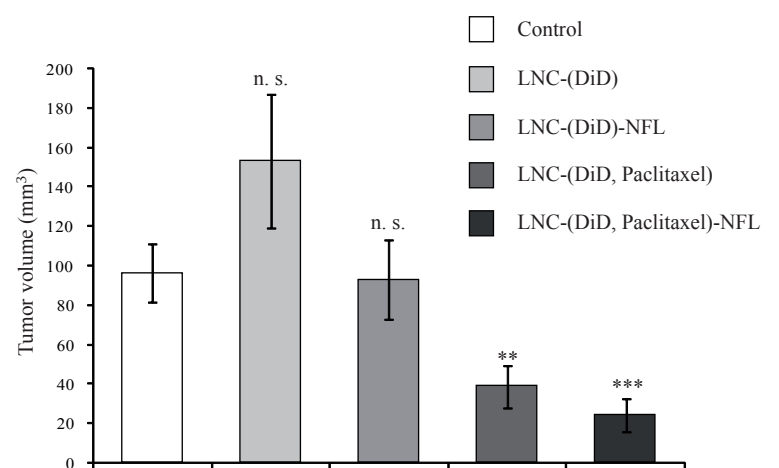
B



C



D



Brain tumor targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules

Anne-Laure Laine, Ngoc Trinh Huynh, Anne Clavreul, Julien Balzeau, Jerome Bejaud, Anne Vessieres, Jean-Pierre Benoit, Joel Eyer and Catherine Passirani. *Eur J Pharm Biopharm* (2012) 81(3):690-3.

Cette étude porte sur le traitement du gliome par le Ferrociphénol (FcdiOH), agent anticancéreux organométallique dérivé du Tamoxifène, encapsulé dans les LNC décrites précédemment. Ces LNC-FcdiOH sont couplées avec différents vecteurs afin d'améliorer leur délivrance dans les cellules : soit avec l'anticorps monoclonal OX26 murin, ciblant le récepteur à la transferrine, soit avec le peptide NFL-TBS.40-63 étudié au laboratoire. Ces différentes formulations sont ensuite testées *in vitro* sur les cellules de gliosarcome de rat 9L, et *in vivo* chez des rats Fischer porteurs d'un gliome 9L implanté par stéréotaxie dans leur striatum droit, par deux voies d'administration différentes : par CED directement dans la tumeur et par injection intra-carotidienne.

Les tests de viabilité *in vitro* n'ont pas montré de différences significatives entre le Ferrociphénol seul et les formulations contenant du FcdiOH et fonctionnalisées avec l'OX26 ou le peptide NFL-TBS.40-63 (**Figure 1**). L'IC50 du FcdiOH seul a été mesurée à 0,4 μM contre 0,6 μM pour les LNC-FcdiOH, 0,7 μM pour les LNC-FcdiOH-OX26 et 0,55 μM pour les LNC-FcdiOH-Peptide.

Ces formulations ont été testées chez le rat porteur d'une tumeur 9L (**Figure 2**). Les résultats indiquent que le traitement par CED avec les LNC-FcdiOH fonctionnalisées avec l'anticorps OX26 ou le peptide NFL-TBS.40-63 diminue significativement la survie des animaux comparé au groupe contrôle (tampon salin), avec des médianes de survie de 22 jours et de 11 jours respectivement. L'injection intra-carotidienne des LNC-FcdiOH-OX26 n'est pas toxique pour les animaux, avec une médiane de survie comparable à celle du groupe contrôle (25 jours). C'est avec les LNC-FcdiOH-Peptide injectées par voie intra-carotidienne que les meilleurs résultats ont été obtenus : la médiane de survie passe à 27 jours, avec 3 rats dont la survie dépasse les 30 jours (35 jours, 40 jours et 44 jours). Cette stratégie de ciblage actif avec le peptide NFL-TBS.40-63 dans le traitement des gliomes démontre une nouvelle fois son efficacité.



Note

Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules

Anne-Laure Laine^{a,b,1}, Ngoc Trinh Huynh^{a,b,1}, Anne Clavreul^{a,b,c}, Julien Balzeau^d, Jérôme Béjaud^{a,b}, Anne Vessieres^e, Jean-Pierre Benoit^{a,b}, Joël Eyer^d, Catherine Passirani^{a,b,*}

^a Ingénierie de la Vectorisation Particulaire in Micro et Nanomédecines Biomimétiques, LUNAM Université, Angers, France

^b Inserm – U1066 IBS-CHU, Angers, France

^c Département de Neurochirurgie, CHU, Angers, France

^d Laboratoire Neurobiologie et Transgenèse, Inserm, Angers, France

^e CNRS, UMR 7223, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2011

Accepted in revised form 18 April 2012

Available online 26 April 2012

Keywords:

OX26-MAb

NFL-TBS peptide

Intra-carotid injection

LNCs

Brain tumour

CED

ABSTRACT

In this study, a new active targeting strategy to favour ferrociphenol (FcdiOH) internalisation into brain tumour cells was developed by the use of lipid nanocapsules (LNCs) coated with a cell-internalising peptide (NFL-TBS.40–63 peptide) that interacts with tubulin-binding sites. In comparison, OX26 murine monoclonal antibodies (OX26-MAb) targeting transferrin receptors were also inserted onto the LNC surface. The incorporation of OX26 or peptide did not influence the *in vitro* antiproliferative effect of FcdiOH-LNCs on the 9L cells since their IC50 values were found in the same range. *In vivo*, intracerebral administration of OX26-FcdiOH-LNCs or peptide-FcdiOH-LNCs by convection enhanced delivery did not enhance the animal median survival time in comparison with untreated rats (25 days). Interestingly, intra-carotid treatment with peptide-FcdiOH-LNCs led to an ameliorated survival time of treated rats with the presence of animals surviving until days 35, 40 and 44. Such results were not obtained with OX26-MAbs, demonstrating the benefit of NFL-TBS.40–63 peptide as an active ligand for peripheral drug delivery to the brain tumours.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanotechnology has emerged as an interesting field in engineering and designing new systems for drug delivery in oncology such as brain tumour therapy. It can provide medical and pharmaceutical benefits because it enables the control of drug characteristics such as solubility, bioavailability, vascular circulation time, and site-specific delivery [1]. Our laboratory has developed and patented a novel nanoscale system, the so-called lipid nanocapsules (LNCs) [2]. They present an oily core corresponding to medium-chain triglycerides surrounded by tensioactives providing a cohesive membrane made of lecithin and polyethylene glycol 660 hydroxystearate at high density. Thanks to their oily core, these LNCs allow the encapsulation of various lipophilic compounds and represent a potential platform for drug delivery in cancer therapy [2]. Since recently, we have encapsulated into LNCs the organometallic anticancer 2-ferrocenyl-1,1-bis(4-hydroxyphenyl)but-1-ene (or FcdiOH). These FcdiOH-LNCs were shown to be promising in the 9L rat gliosarcoma model [3]. In order to improve

the drug delivery to the site of interest, i.e. the cancer tissue, further modifications of the LNC surface by coating with longer PEG chains in a context of a passive targeting strategy, or by incorporating specific molecules through an active targeting strategy, can be carried out [2]. Two main targeting agents are of particular interest: OX26 murine monoclonal antibody (OX26-MAb) to the rat transferrin receptor (TfR) and NFL-TBS.40-63 peptide derived from the light neurofilament subunit (NFL).

Since the transferrin receptor is overexpressed at the surface of brain tumour cells but is also present in the blood–brain barrier [4], antibodies against the TfR such as OX26 conjugated to nanoparticles have been widely assessed for brain-specific delivery [5,6]. Furthermore, in a previous study, we assessed the targeting ability of the antibody covalently attached onto the LNC surface, and its beneficial effect on drug delivery into a healthy brain has been demonstrated [7].

NFL-TBS.40-63 peptide that specifically interacts with tubulin-binding sites (TBSs) was shown to enter in multiple cancer cell lines leading to disruption of their microtubule network and reduction of their proliferation [8].

Taking those advantages into consideration, we compared in the present study the effect of peptide-FcdiOH-LNCs and OX26-FcdiOH-LNCs on the proliferation of 9L gliosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. In addition, to favour the drug delivery to the site of

* Corresponding author. Ingénierie de la Vectorisation Particulaire in Micro et Nanomédecines Biomimétiques, LUNAM Université, F-49933 Angers, France. Tel.: +33 244 688534; fax: +33 244 688546.

E-mail address: catherine.passirani@univ-angers.fr (C. Passirani).

¹ These authors contributed equally to this work.

interest, two loco-regional administration routes were assessed, an intra-tumour injection by convection enhanced delivery (CED) and a peripheral injection via the carotid artery.

2. Materials and methods

2.1. Chemical materials

Ferrociphenol was prepared by a McMurry coupling reaction [9]. The lipophilic Labrafac® WL1349 (caprylic-capric acid triglycerides) was purchased from Gattefosse S.A. (Saint-Priest, France). Lipoïd® S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) came from Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Germany); Solutol® HS15 (a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) from BASF (Ludwigshafen, Germany) and NaCl from Prolabo (Fontenay-sous-bois, France). Deionised water was acquired from a Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France) and sterile water from Cooper (Melun, France). DSPE-mPEG2000-maleimide was kindly provided by Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA).

2.2. Tumour cell line and culture

Rat 9L gliosarcoma cells were obtained from the European Collection of Cell Culture (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). The cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Lonza, Verviers, Belgium) supplied with 1% non-essential amino acids (Lonza), 10% foetal calf serum (FCS) (Lonza) and 1% antibiotic and antimycotic solution (Sigma).

2.3. Animals

Syngeneic Fischer F344 female rats, weighing 160–180 g, were obtained from Charles River Laboratories France (L'Arbresle, France). All experiments were performed on 10–11-week-old female Fisher rats. Animal care was carried out in strict accordance with French Ministry of Agriculture regulations.

2.4. Preparation of the LNCs

2.4.1. Ferrociphenol-loaded LNCs

LNCs were prepared according to the original described procedure [2]. Briefly, the preparation process involved 2 steps. Step I consisted of mixing all the components (Solutol® HS15 (17% w/w), Lipoïd® S75-3 (1.5% w/w), Labrafac® WL1349 (20% w/w), NaCl (1.75% w/w) and water (59.75% w/w)) under magnetic stirring and heating from room temperature to 85 °C. Three cycles of progressive cooling and heating between 85 and 60 °C were then carried out. Step II was an irreversible shock induced by sudden dilution with cold water (28.5% (v/v)) to the mixture at 70–72 °C. Slow magnetic stirring was then applied to the suspension for 5 min.

To load the anticancer agent into the oily core of LNCs, FcdiOH was firstly dispersed in Labrafac® under ultrasound at 4% (w/w) for 30 min, and the resulting lipophilic phase was then mixed with other components, as described above, to prepare a suspension of FcdiOH-LNCs at a concentration of 6.5 mg of FcdiOH per g of LNC suspension.

2.4.2. Peptide-FcdiOH-LNCs

Prior to incubation with the peptide (sequence: YSSY-SAPVSSSLSVRRYSSSSGS), the FcdiOH-LNC suspension was passed through a PD-10 sephadex column (Amersham Biosciences Europe, Orsay, France) and then concentrated via centrifugations by using a Millipore Amicon 100 kDa centrifugal filter device (Millipore, St.

Quentin-Yvelines, France). The resulting LNC suspension (1 mL) was then incubated for 24 h with 369 µL of 1 mM peptide solution in MiliQ water at room temperature under slow magnetic rotation.

2.4.3. OX26-FcdiOH-LNCs

OX26-FcdiOH-LNCs were prepared following the previously described procedure [7]. Briefly, DSPE-mPEG2000-maleimide was incorporated to the surface of FcdiOH-LNCs 6.5 mg/g at the final concentration of 20 mM by the post-insertion technique at 60 °C for 2 h to formulate functionalized LNCs. The resulting LNC suspension was then passed through a Sepharose CL4-B column, equilibrated with HEPES buffer (pH 7.4, 0.1 M) to separate the functionalized LNCs from micelles composed of free DSPE-mPEG2000-maleimide.

OX26 MAb was purified from a supernatant harvested from cultures of the OX26 hybridoma cell line. The obtained OX26 MAb underwent a thiolation process followed by incubation over night at room temperature with functionalized FcdiOH-LNCs leading to the formation of OX26-FcdiOH-LNCs.

2.5. LNC characterisation

The determination of the drug loading is achieved by spectrophotometry at 450 nm after dilution at 1:10 in a 22/67/11 (v/v/v) Ethanol/THF/water mixture.

The average hydrodynamic diameter and the polydispersity index (PI) of nanocapsules were determined at 25 °C, in triplicate, by using a Malvern Zetasizer® (Nano Serie DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). For the measurement, the LNCs were diluted at 1:100 (v/v) in deionised water.

2.6. In vitro cell viability

A suspension of 9L cells (1.9×10^4 cells/mL) was put on each well of 24-well plates for 48 h. On day 2, the culture media was removed, and cells were treated with free FcdiOH or different types of FcdiOH-LNC suspensions in the concentration range from 0.01 to 100 µmol/L.

After 72 h of incubation at 37 °C, the media containing treatments was replaced by new media. Cell survival percentage was estimated by the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) survival assay (Promega, Lyon, France). Briefly, the MTS solution (100 µL) was added into each well, and the plates were incubated at 37 °C for 2 h 30. The optical density values (OD) were measured at 490 nm for dark purple intensity and at 750 nm for subtraction of background using a multiwell-scanning spectrophotometer (Multiskan Ascent, Labsystems SA, Cergy-pontoise, France). The maximal absorbance was determined by incubating cells with culture media and was considered as 100% survival. All experiments were performed in triplicate and presented as Mean ± SD.

2.7. In vivo studies

2.7.1. Intracranial gliosarcoma cell inoculation

The animals were anaesthetised by intra-peritoneal injection of 1.0 ml/kg of a 1:1 (v/v) mixture of ketamine (100 mg/ml) (Clorke-tam®, Vétquinol, Lure, France) and xylazine (20 mg/ml) (Rom-pun®, Bayer, Puteaux, France). The incision site was shaved, and the head was immobilised in a stereotaxic frame (Lab Standard Stereotaxic; Stoelting, Chicago, IL). A middle scalp incision was made, and a burr hole was drilled into the skull using a small dental drill. Ten microlitres of 10^5 9L cell/mL suspension was injected stereotaxically into the rat right striatum as previously performed [3] with the following coordinates: 1 mm posterior from the bregma,

3 mm lateral from the sagittal suture, and 5 mm below the dura (with the incisor bar set at 0 mm).

2.7.2. Efficacy study

On day 6 after 9L cell implantation, tumour-bearing rats were treated with OX26–FcdiOH–LNCs or peptide–FcdiOH–LNCs by CED administration (60 μ L), or intra-carotid injection (400 μ L). The procedures of CED and intra-carotid injection were detailed elsewhere [10]. The untreated control group did not receive any treatment. Animals were weighed every day. Rats were sacrificed in a CO₂ chamber when they lost 20% of body weight and/or as soon as any distress symptom appeared. The death was recorded as if it had occurred on the next day of sacrifice and was represented as the survival time of animals on the Kaplan–Meier curves.

2.7.3. Statistical analysis

Statistical comparisons between the control group and the treated groups were estimated from the log-rank test (Mantel–Cox Test) by using StatView software, version 5.0 (SAS Institute Inc.). The level of significance was set at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical properties of LNC suspensions

Blank LNCs presented an average hydrodynamic diameter of 47.6 ± 0.8 nm and a very narrow size dispersion (PDI = 0.041). As described in a previous study relating the good encapsulation of FcdiOH into the oily core of LNCs [3], its loading did neither alter the particle size nor the PDI (45.0 ± 2.5 nm and 0.054, respectively). The adsorption of NFL-TBS peptide onto the LNC surface appeared to have no effect on the particle size (45.7 ± 1.4 nm), but increased significantly the PDI (0.199). With the assumption that all peptides interact with LNCs, the rate of coupled molecules was estimated around 46 peptides per LNC. In contrast to the NFL-TBS₄₀₋₆₃ peptide, the covalent coupling of thiolated OX26 to maleimide functions of PEG chains increased the particle size of about 18 nm (up to 63.7 ± 3.2 nm) as compared to FcdiOH–LNCs. This was in agreement with the study of [7] who reported an increase in the hydrodynamic diameter of the obtained OX26–LNCs between 12 and 30 nm [7]. The final number of bound OX26 Mabs was assessed around 1 per LNC. The drug payloads of peptide–FcdiOH–LNCs and OX26–FcdiOH–LNCs are summarised in Table 1. The decrease in concentration in FcdiOH for OX26–FcdiOH–LNCs compared to non-coated FcdiOH–LNCs resulted from dilutions during incorporation process of active ligands onto the LNC surface.

3.2. Antiproliferative effect in vitro

The MTS assay was used to determine *in vitro* cytostaticity after exposure of nanocarriers to 9L gliosarcoma cells with a cascade concentration range of FcdiOH (0.01–100 μ M). The cell survival profiles of the various kinds of FcdiOH–LNCs and free FcdiOH were illustrated in Fig. 1. At low concentrations (0.01–0.1 μ M), neither free FcdiOH nor FcdiOH–LNCs altered the cell growth (over 80%). Cell survival was dramatically decreased (below 20%) at the concentration

Table 1

Concentration in FcdiOH encapsulated into peptide–FcdiOH–LNCs and OX26–FcdiOH–LNCs compared to the drug payload of non-coated FcdiOH–LNCs.

Treatment	Concentration (mg/mL)
FcdiOH–LNCs	6
Peptide–FcdiOH–LNCs	6,1 (carotid) – 5,5 (CED)
OX26–FcdiOH–LNCs	3,4

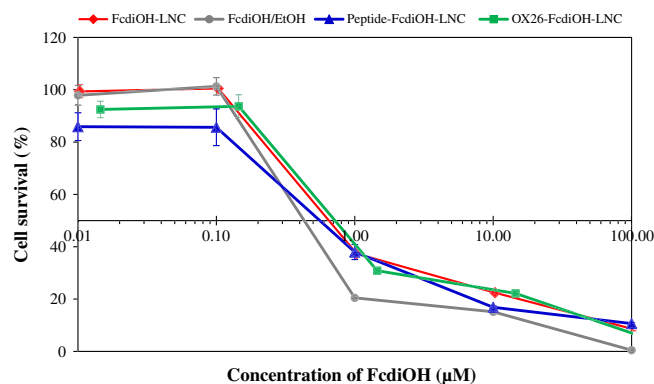


Fig. 1. Cell survival of 9L gliosarcoma cells after 72 h exposure to different treatments with free FcdiOH or with the various kinds of FcdiOH–LNCs at different concentrations of drug (0.01–100 μ M). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

of 10 μ M, resulting in an IC₅₀ of about 0.4 μ M for free FcdiOH and 0.6 μ M for FcdiOH–LNCs. Moreover, the incorporation of either peptides or OX26 Mabs did not compromise the cytostatic effect of FcdiOH–LNCs since their IC₅₀ was 0.55 and 0.7 μ M, respectively.

3.3. Survival studies

Peptide–FcdiOH–LNCs and OX26–FcdiOH–LNCs were administered through intra-cranial CED or carotid delivery in 9L gliosarcoma-bearing rats. Fig. 2 shows the animal survival time plotted on Kaplan–Meier curves.

We observed that CEDs of OX26–FcdiOH–LNCs and peptide–FcdiOH–LNCs significantly reduced the survival compared to the control group ($P < 0.05$). The median survival time of control rats was 25 days, whereas the medians of OX26–FcdiOH–LNC- and peptide–FcdiOH–LNC-treated rats were 22 and 11 days, respectively.

This toxicity was not observed previously after treatment with non-targeted FcdiOH–LNCs [10]. We could hypothesise that intra-tumour CED of these targeted LNCs with penetrating properties, especially for peptide–FcdiOH–LNCs, induces a large diffusion of LNCs which can affect tumour cells but also healthy cells leading to non-elucidated side effects and morbidity.

In comparison with CED, intra-carotid delivery of OX26–FcdiOH–LNCs and peptide–FcdiOH–LNCs did not induce toxicity. 9L gliosarcoma-bearing rats receiving intra-carotid injection of OX26–FcdiOH–LNCs showed a similar median survival time as control rat one. This unsuccessful treatment could be linked to the low administered dose of FcdiOH as we previously showed that antitumour efficacy of FcdiOH was dose-dependent on an orthotopic gliosarcoma model [3]. Therefore, the FcdiOH concentration

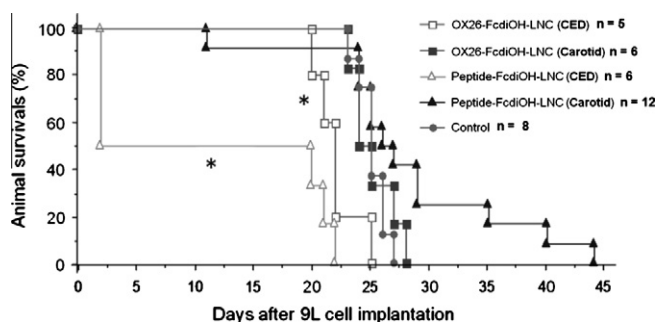


Fig. 2. Kaplan–Meier survival plots for 9L gliosarcoma-bearing rats treated with peptide–FcdiOH–LNCs and OX26–FcdiOH–LNCs by means of CED or intra-carotid injection. *Significantly different from control group ($P < 0.05$) (n = number of rats).

in the OX26–FcdiOH–LNCs might be below the pharmacologically active dose. Furthermore, the low OX26–Mabs amount coupled onto the LNCs may limit the immunonanocapsule delivery across the BBB. However, a high density of Mabs at the surface of nanoparticles is known to reduce their stealth properties [6]. In consequence, an optimal coupling rate must be achieved for a suitable brain delivery balanced with a low clearance phenomenon.

Interestingly, we observed that intra-carotid treatment with peptide–FcdiOH–LNCs increased the survival for almost half of the rats (5/12) up to 44 days. This increase in survival time had never been reached either with CED or intracarotid treatment of non-targeted LNCs [10] and represents an outstanding outcome compared to control group with the longest survival set at 27 days.

In conclusion, the treatment by intra-carotid injection with the peptide–FcdiOH–LNCs demonstrated an interesting efficacy that was strengthened by the presence of a long-term survival rat until 44 days after 9L cell implantation. This new active targeting strategy may offer a promising approach for glioma treatment, and further studies are required to ensure a safe clinical use of peptide–FcdiOH–LNCs.

Acknowledgments

The authors would like to thank Jérôme Roux and Pierre Legras (Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire (SCAHU), Angers, France) and Katy Albertini for their technical assistance

in animal experiments. We are also grateful to Pascal Pigeon for the synthesis of FcdiOH. This work was supported by grants from “La Ligue Nationale Contre le Cancer” and “ANR Mecafferol”.

References

- [1] S.D. Caruthers, S.A. Wickline, G.M. Lanza, Nanotechnological applications in medicine, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 26–30.
- [2] N.T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 201–209.
- [3] E. Allard, N.T. Huynh, A. Vessières, P. Pigeon, G. Jaouen, J.-P. Benoit, C. Passirani, Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 317–323.
- [4] W.A. Hall, Transferrin receptor on glioblastoma multiforme, *J. Neurosurg.* 74 (1991) 313–314.
- [5] K. Ulbrich, T. Hekmatara, E. Herbert, J. Kreuter, Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 251–256.
- [6] J. Huwiler, D. Wu, W.M. Pardridge, Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93 (1996) 14164–14169.
- [7] A. Béduneau, F. Hindré, A. Clavreul, J.-C. Leroux, P. Saulnier, J.-P. Benoit, Brain targeting using novel lipid nanovectors, *J. Control. Release* 126 (2008) 44–49.
- [8] A. Bocquet, R. Berges, R. Frank, P. Robert, A.C. Peterson, J. Eyer, Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization, *J. Neurosci.* 29 (2009) 11043–11054.
- [9] G. Jaouen, S. Top, A. Vessieres, G. Leclercq, J. Quivy, L. Jin, A. Croisy, The first organometallic antioestrogens and their antiproliferative effects, *C. R. Acad. Sci. Ser. IIC Chem.* 3 (2000) 89–93.
- [10] N.T. Huynh, C. Passirani, E. Allard-Vannier, L. Lemaire, J. Roux, E. Garcion, A. Vessieres, J.-P. Benoit, Administration-dependent efficacy of ferrociphenol lipid nanocapsules for the treatment of intracranial 9L rat gliosarcoma, *Int. J. Pharm.* 423 (2012) 55–62.

DISCUSSION

Les travaux du laboratoire portent sur l'étude du cytosquelette et des interactions entre les MT et les FI. Un modèle de souris transgéniques NFH-LacZ étudié au laboratoire présente une séquestration des neurofilaments (NF) dans le corps cellulaire des neurones et une absence des NF dans les axones, avec une concentration anormalement élevée de microtubules (MT) dans les axones (Eyer et Peterson, 1994). A partir de ces observations, il a été montré que la tubuline libre est capable d'interagir avec les NF, ainsi que d'autres protéines des FI, au niveau de séquences particulières appelées TBS (Tubulin-Binding Site) localisées dans leur partie N-terminale (Bocquet et al., 2009). Les NF se sont révélés être *in vivo* de véritables réservoirs de tubuline dépolymérisée, comme cela est schématisé sur la **Figure 24**. A partir de ces séquences, différents peptides TBS ont été synthétisés, dont certains se sont montrés capables de rentrer dans des cellules de gliomes et d'altérer le réseau de MT.

Dans le premier article, nous avons étudié l'un des peptides TBS issu de la protéine vimentine et appelé Vim-TBS.58-81. Ce peptide est capable de rentrer spontanément dans les cellules de glioblastome humain T98G et d'aller se localiser dans leur noyau. Ces propriétés le classent dans la catégorie des peptides pénétrant les cellules ou Cell-Penetrating Peptides (CPP). Ces peptides sont apparus depuis plusieurs années comme des vecteurs non-viraux très prometteurs pour le transport de différentes molécules ou cargos, telles que des protéines, des oligonucléotides ou des nanoparticules. Ces peptides dont la taille est classiquement inférieure à 30 acides aminés, d'origine naturelle ou synthétique, sont chargés positivement et peuvent posséder une structure secondaire leur permettant d'interagir avec la membrane plasmique des cellules (Zorko et Langel, 2005). Par sa structure, sa taille et sa charge nette de +4, le peptide Vim-TBS.58-81 peut être classé comme amphipathique. Il a été montré par dichroïsme circulaire que ce peptide ne possédait pas de structure secondaire spéciale à l'état natif, mais il a été montré que les amphipathiques secondaires tels que la Pénétratine sont capables d'effectuer un changement de conformation lors de leur insertion dans la membrane plasmique (Christiaens et al., 2002). Les mesures par dichroïsme circulaire sur des membranes modèles montrent le passage d'une conformation « random coil » à celle d'hélice α . Des études physico-chimiques du peptide Vim-TBS.58-81 sur de telles membranes modèles pourraient permettre de préciser ses propriétés de transporteur nucléaire. De plus, l'étude comparative d'une éventuelle structure secondaire lorsque les peptides Vim-TBS.58-81 et Tat.48-60 sont couplés avec le peptide pro-apoptotique P10 pourrait expliquer leur différence de localisation cellulaire.

Le mode d'internalisation des CPP est un sujet encore controversé. Il semble que deux voies principales d'internalisation sont utilisées par les CPP, à savoir la translocation directe et l'endocytose, et qui dépendent de nombreux facteurs tels que la température, la concentration ou la composition de la membrane cellulaire (Sun et Leung, 1974). Par exemple, le peptide octa-arginine R8 rentre par endocytose à faible concentration (2 μM) dans les cellules KG1a (leucémie myéloblastique humaine) caractérisée par sa localisation vésiculaire, mais à une concentration plus forte (10 μM), il rentre également par translocation, observable par sa fluorescence diffuse dans toute la cellule (Fretz et al., 2007). En comparaison, le peptide Vim-TBS.58-81 à forte concentration (50 μM) se retrouve colocalisé avec la toxine cholérique, marqueur d'endocytose au niveau des radeaux lipidiques, et ne se retrouve pas de façon diffuse dans les cellules T98G, ce qui indique qu'il ne rentre pas par translocation à cette concentration. La nature des molécules cargos peut aussi modifier le mode d'internalisation, comme pour le peptide Tat.48-60 (Tünnemann et al., 2006) et la Pénétratine et le TP10 (El-Andaloussi et al., 2007b). Les différences structurales et physiques des fluorochromes couplés aux CPP, ainsi que leurs propriétés chimiques en fonction du pH, peuvent jouer un rôle dans le ciblage intracellulaire des CPP, comme l'a montré Szeto et collaborateurs (Szeto et al., 2005). Nous avons également observé ce phénomène avec le peptide Vim-TBS.58-81. Lorsqu'il est couplé à la carboxyfluorescéine, le peptide Vim-TBS.58-81 rentre dans les cellules T98G, mais son couplage avec le TAMRA (TetrAMethylRhodAmine) ou avec le Cy5 (Cyanine) inhibe totalement son entrée. La fixation des cellules peut également permettre une entrée artéfactuelle des peptides dans les cellules (Lundberg et Johansson, 2002). L'utilisation de marqueurs spécifiques de voies d'endocytose couplés à des fluorochromes, et de la colocalisation entre eux et les CPP, additionnée à la microscopie sur cellules vivantes peut permettre la mise en évidence précise des voies d'endocytose spécifique des peptides.

Nous avons présenté dans le deuxième article un autre peptide TBS issu de la sous-unité légère des neurofilaments, NFL-TBS.40-63. Ce peptide est capable de rentrer dans plusieurs lignées de cellules de gliome humain, de rat et de souris, de perturber le réseau de MT et d'inhiber la prolifération des cellules. Sa faible incorporation dans les cellules saines cérébrales, neurones et astrocytes, et son absence d'effet sur ces types cellulaires en font un candidat intéressant dans le traitement des gliomes. Testé chez des rats porteurs de gliome, il s'est montré capable de réduire la croissance tumorale et de rester au niveau de la tumeur plusieurs jours après son injection.

La différence principale entre ce peptide et les drogues anti-microtubulaires vient de son mode d'internalisation préférentiel pour les cellules tumorales par rapport aux cellules saines. Les poisons du fuseau couramment utilisés en cancérologie sont des molécules lipophiles, entrant de façon passive dans les cellules et déstabilisant le réseau de MT des cellules en division. Or, nous avons montré que l'internalisation du peptide NFL-TBS.40-63 peut être inhibée lors d'une incubation à 4°C ou en présence d'un inhibiteur d'ATP intracellulaire, signes caractéristiques d'une entrée par endocytose. Ces propriétés anti-microtubulaires et d'internalisation préférentielle sont comparables à l'estramustine-phosphate (EMP), molécule agissant sur le réseau de MT et ciblant préférentiellement les cellules tumorales, notamment les cellules tumorales prostatiques et les gliomes. Découverte à la fin des années 1960, cette molécule dérivée de l'oestradiol est utilisée depuis les années 1970 dans le traitement des cancers prostatiques en seconde intention (Nilsson et Müntzing, 1973). Son internalisation se fait au niveau des récepteurs aux œstrogènes, mais son action cytotoxique est favorisée par une protéine particulière, EMBP (EstraMustin-Binding Protein), qui est surexprimée dans ces types cellulaires (Von Schoultz et al. 1988 ; Karlsson et al., 2000), et peu dans les astrocytes (Yoshida et al., 1994). En se fixant sur les MAPs et la tubuline, l'EMP est capable de déstabiliser les MT, provoquant un arrêt de la prolifération cellulaire en G2/M, ainsi que des cassures sur l'ADN et une inhibition de sa synthèse, provoquant l'apoptose de la cellule (Yoshida et al., 1996). En comparaison, nous avons montré que le peptide NFL-TBS.40-63 a un effet sur le réseau de MT et provoque un arrêt des cellules en phase G1 (Bocquet et al., 2009), mais qu'il rentre faiblement dans la lignée de cancer prostatique humain LNCaP (Berges et al, 2012, **Supplemental Data 4**). Une étude sur la co-localisation et l'interaction avec des MAPs pourrait expliquer les effets préférentiels du peptide NFL-TBS.40-63 sur les cellules de gliomes et de cancer de la prostate par rapport aux astrocytes, tout comme l'EMP. L'identification du mode d'internalisation et d'action sur le réseau de microtubules sont actuellement en cours au laboratoire, sachant que le peptide rentre dans d'autres lignées (fibroblastes murins NIH-3T3, adénocarcinome humain HeLa) sans avoir d'effet sur les MT.

Les travaux présentés dans le troisième article portant sur une étude structure/fonction du peptide NFL-TBS.40-63 ont permis de mettre en évidence la présence de structures secondaires relativement stables, et de type hélice α et feuillet β selon le caractère hydrophile de son environnement. Ces structures ont été mises en évidence par dichroïsme circulaire, et se sont révélées cruciales pour l'entrée du peptide dans les cellules et son action sur le réseau

microtubulaire. Cependant, il n'est pas encore possible d'expliquer clairement le mécanisme d'entrée cellulaire d'un CPP selon ses propriétés amphipathiques ou ses structures secondaires. Par exemple, le peptide VT5 est un peptide synthétique amphipathique possédant un feuillet β (Krause et al., 1996 ; Oehlke et al., 1997), alors que le peptide MAP possède une structure en hélice α (Oehlke et al., 1998). Les deux sont capables d'être internalisés par des cellules endothéliales via des processus énergie-dépendants et énergie-indépendants. Par ailleurs, la Pénétratine possède une structure native hélicoïdale, qui change en structure β en présence de lipides chargés (Bellet-Amalric et al., 2000). Il n'est donc pas étonnant que le peptide NFL-TBS.40-63 avec sa structure secondaire puisse rentrer dans les cellules.

Des études par cristallographies et par Biacore (appareil permettant l'étude de l'interaction entre deux protéines ou entre une protéine et son ligand) sont actuellement en cours et devraient permettre de préciser la structure du peptide NFL-TBS.40-63 selon les différents milieux dans lesquels il se trouve, et les molécules avec lesquelles il interagit. Les effets de certains peptides étant inhibés après changement d'un seul acide aminé (Ser21Ala et Ser24Ala) et ceci malgré leur entrée dans les cellules, le peptide sera également cristallisé en présence de tubuline, afin d'identifier les acides aminés impliqués dans cette interaction et savoir s'il se fixe sur un site déjà connu de liaison aux drogues anti-microtubulaires.

Dans le quatrième article, nous avons étudié les capacités de ciblage du peptide NFL-TBS.40-63 en le greffant à la surface de nanocapsules lipidiques (LNC pour Lipid NanoCapsules). Ces LNC contenant un fluorochrome dans leur cœur lipidique ont pu être suivies par microscopie à fluorescence et par cytométrie en flux. Ainsi, nous avons montré que leur internalisation augmente après greffage du peptide à leur surface. Lorsque ces LNC contenant du Paclitaxel sont testées sur des cellules de glioblastome, la viabilité des cellules tumorales est diminuée *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris porteuses d'un gliome, car le volume des tumeurs a diminué respectivement de 60% et 75% pour les LNC contenant du Paclitaxel et les LNC contenant du Paclitaxel et fonctionnalisées avec le peptide. Ces résultats montrent que le peptide NFL-TBS.40-63 est capable d'améliorer la délivrance d'un nanovecteur et de ralentir la croissance des tumeurs.

L'analyse physico-chimique du greffage du peptide à la surface des LNC a permis de calculer un pourcentage de greffage à leur surface proche de 50%, ainsi qu'un nombre moyen de molécules de peptide par LNC (entre 43 et 58 molécules de NFL-TBS.40-63 par LNC). Les expériences présentées dans le quatrième article ont été effectuées avec des LNC non dialysées après le greffage du peptide NFL-TBS.40-63, afin de diminuer au maximum le temps entre la fabrication des LNC avec Paclitaxel et l'injection chez la souris, et pour permettre au peptide non greffé de favoriser l'entrée des LNC, comme cela a été montré pour le peptide iRGD dans des modèles de tumeurs du sein et de la prostate (Sugahara et al., 2010). Sugahara et collaborateurs ont montré qu'il n'est pas nécessaire que ce peptide iRGD ciblant les tumeurs soit fixé à un agent anticancéreux (ici l'Abraxan, composé de Paclitaxel recouvert d'albumine) pour améliorer la délivrance et l'efficacité de cet anticancéreux. Par la suite, nous avons comparé l'incorporation des LNC dialysées ou non après greffage du peptide sur des lignées de gliome de souris GL261 et sur des astrocytes humains. Les LNC dialysées rentrent 2,5 fois plus dans les astrocytes humains que les LNC non dialysées, mais pour les LNC greffées avec peptide, aucune différence significative n'a été observée entre les LNC dialysées ou non. Concernant les cellules GL261, aucune différence majeure n'est observée entre les LNC avec peptide dialysées et non dialysées. Ces résultats montrent que la dialyse des LNC après le greffage du peptide n'est pas indispensable et ne modifie pas leur incorporation dans les cellules.

Nous avons également testé sur les lignées cellulaires la co-incubation directe des LNC avec le peptide NFL-TBS.40-63 libre. Les résultats ont montré que l'addition de peptide libre n'augmente pas l'entrée des LNC, et qu'il est indispensable de préincuber 24 heures le peptide avec les LNC. Ces résultats indiquent que c'est le greffage du peptide à la surface des LNC qui permet l'amélioration de leur entrée dans les cellules. L'étude de l'interaction de NFL-TBS.40-63 avec les LNC par plusieurs techniques, dont le Biacore, nous permettra de mesurer la force d'interaction, et d'optimiser par la suite le greffage en ajustant la quantité de peptide par LNC.

Le couplage des LNC au peptide a largement augmenté l'entrée dans les astrocytes de souris, dans les mêmes proportions que dans les cellules tumorales. Ceci indique une perte de spécificité du peptide, et pourrait s'expliquer par le mode de greffage du peptide à la surface

des LNC qui pourrait modifier sa structure secondaire ou rendre moins accessible ses acides aminés. Sans cette reconnaissance privilégiée, les LNC rentrent dans les mêmes proportions dans les types sains et tumoraux. L'incorporation dans les astrocytes des LNC contenant du Paclitaxel n'a pourtant pas d'effet sur leur viabilité, ces cellules ayant une prolifération plus lente que les cellules tumorales. Injectées chez des souris porteuses d'un gliome, les LNC contenant du Paclitaxel diminuent le volume des tumeurs. De plus, chez les souris traitées avec les LNC-(Paclitaxel) couplées au peptide NFL-TBS.40-63, les animaux ne présentaient pas de perte de poids et un comportement normal. La diminution du volume de leur tumeur de 75% par rapport au contrôle après une seule injection par CED montre l'efficacité du traitement, qui pourrait être encore amélioré par une seconde injection de ces LNC ou par une injection d'un autre anticancéreux tel que le BCNU, actuellement utilisé sous forme de Gliadel® dans le traitement des gliomes chez l'homme.


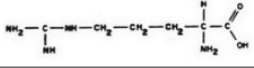
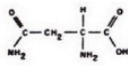
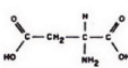
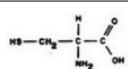
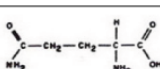
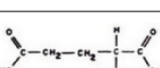

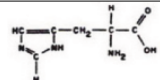
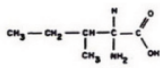
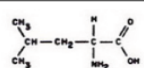
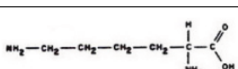
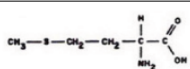
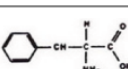

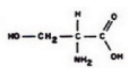
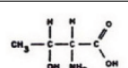
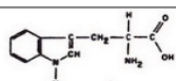
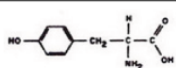

Le cinquième article a également montré une amélioration de la survie de rats porteurs d'un gliome après administration intra-carotidienne de LNC recouvertes de peptide NFL-TBS.40-63 et contenant du Ferrociphénol (FcdiOH). De manière remarquable, le peptide NFL-TBS.40-63 montre une efficacité supérieure à l'anticorps OX26. L'injection par CED des LNC contenant le FcdiOH, recouvertes par le peptide NFL-TBS.40-63 ou par l'anticorps OX26, est toxique pour les rats. Ceci pourrait provenir d'une concentration en FcdiOH et d'une entrée de ces vecteurs dans les cellules sont trop importantes pour une délivrance directement dans le cerveau. Une injection par CED des LNC plus diluées pourrait éventuellement éviter ou de diminuer cette toxicité.

La voie intra-artérielle permet l'injection d'un volume plus important et la concentration finale dans la tumeur sera diminuée. Le traitement avec les LNC recouvertes de l'anticorps OX26 ne présente pas de différence significative avec le contrôle. Pourtant, la délivrance par voie intra-veineuse de liposomes remplis de Daunomycine (Huwyler et al., 1996) et de nanoparticules (Ulbrich et al., 2009), et recouverts de cet anticorps permet la traversée de la barrière hémato-encéphalique. L'absence d'effet pour ces OX26-FcdiOH-LNC peut être due à une trop faible dose de FcdiOH délivrée ou à un taux d'anticorps couplé aux LNC trop faible. Le traitement par les LNC-FcdiOH fonctionnalisées avec le peptide montre que la moitié des rats présente une amélioration de leur survie, donc que ces LNC sont capables de traverser la

barrière hémato-encéphalique altérée au niveau de la tumeur, et d'agir sur les cellules tumorales. Une étude pilote de bio-distribution du peptide NFL-TBS.40-63 a montré qu'il ne passait pas la barrière hémato-encéphalique chez des animaux sains lorsqu'il est injecté seul dans la circulation. Une étude de bio-distribution des LNC fonctionnalisées ou non avec le peptide NFL-TBS.40-63 permettra de connaître l'affinité des LNC couplées au peptide pour les différents tissus de l'organisme, chez des animaux sains ou porteurs de tumeurs, afin d'optimiser le mode de délivrance des LNC. De plus, la compréhension de la structure du peptide NFL-TBS.40-63 et de ses interactions avec les différents éléments de son environnement tels que la tubuline, les membranes plasmiques et la coque solide des LNC permettra d'optimiser son utilisation dans le traitement des gliomes.

ANNEXES

Annexe 1 : Les acides aminés, nomenclature et caractéristiques physico-chimiques

Nom	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre	Formule	Chaîne latérale	pI
Alanine	Ala	A		Aliphatique linéaire Groupement méthyle	6,107
Arginine	Arg	R		Groupement guanidium	10,76
Asparagine	Asn	N		Groupement amide	
Acide Aspartique	Asp	D		Groupement carboxyle	2,98
Cystéine	Cys	C		Groupement thiol	5,02
Glutamine	Gln	Q		Groupement amide	
Acide Glutamique	Glu	E		Groupement carboxyle	3,08
Glycine	Gly	G		Aliphatique linéaire	6,064
Histidine	His	H		Noyau imidazole	7,64
Isoleucine	Ile	I		Aliphatique linéaire	6,038
Leucine	Leu	L		Aliphatique linéaire	6,036
Lysine	Lys	K		Groupement amine	9,47
Méthionine	Met	M		Aliphatique linéaire Groupement méthylthioester	5,74
Phénylalanine	Phe	F		Groupement phényl	5,91
Proline	Pro	P		Aliphatique cyclique	6,3
Sérine	Ser	S		Alcool aliphatique Groupement hydroxyle	5,68
Thréonine	Thr	T		Alcool aliphatique Groupement hydroxyle	
Tryptophane	Trp	W		Noyau indole	5,88
Tyrosine	Tyr	Y		Groupement phénol	5,63
Valine	Val	V		Aliphatique linéaire	6,002

Annexe 2 : Molécules et essais cliniques en cours pour le GBM (adapté de Zhou et al., 2012)

Molécule ou voie de signalisation visée	Agents	Références
Inhibiteurs de mTORC1	Sirolimus, Everolimus, Temsirolimus, Deforolimus	Sunayama et al., 2010 ; Cloughesy et al., 2008 ; Metcalf et al., 2004 ; Mita et al., 2008 ; Reardon et al., 2006
Inhibiteurs de mTORC1/mTORC2	OXA-01, OSI-027, AZD8055	Falcon et al., 2011
Inhibiteurs de la PI3 kinase	XL765, LY294002, Wortmannin	Prasad et al., 2011 ; Maira et al., 2008 ; Schultz et al., 1995
Inhibiteurs de la PI3K/mTOR	NVP-BEZ235, PI-103	Sunayama et al., 2010 ; Maira et al., 2008
Inhibiteurs de Raf	Sorafenib	Yang et al., 2010 ; Siegelin et al., 2010
Inhibiteurs d'Akt	Perifosine	Essai NCT01051557
Inhibiteurs du récepteur tyrosine kinase de l'EGF	Erlotinib, Gefinib, lapatinib, BIBW2992, Nimotuzumab, Cetuximab, AEE788	Reardon et al., 2006 ; Wick et al., 2011 ; Yung et al., 2010 ; Wang et al., 2006 ; Diaz Miqueli et al., 2009 ; Franceschi et al., 2007 ; Pfeffer et al., 2004 ; Hegi et al., 2011 ; Goudar et al., 2005 ; Eller et al., 2005 ; Thiessen et al., 2010 ; Guo et al., 2009
		Essais NCT00727506 et NCT00753246
Inhibiteurs de facteurs de croissance	Leflunomide, Suramin	Strawn et al., 2000 ; Grossman et al., 2001 ; Laterra et al., 2004
Inhibiteurs de la farnesyl transférase	Tipifarnib, lonafarnib	Glass et al., 2000 ; Chaponis et al., 2011 ; Cloughesy et al., 2006 ; Lustig et al., 2008 ; Moyal et al., 2007
Inhibiteurs de l'histone désacétylase	Vorinostat, Depsipeptide, Panobinostat	Sarcar et al., 2010 ; Galanis et al., 2009 ; Sawa et al. 2004
Inhibiteurs de HSP90	NXD30001	Zhu et al., 2010
LDL receptor peptide	ANG1005	Régina et al., 2008 ; Thomas et al., 2009
Inhibiteurs de Met	XL184 (cabozantinib)	De Groot et al., 2009 ; Wen et al., 2010
Inhibiteurs des MMP	Prinomastat (AG3340)	Price et al., 1999 ; Levine et al., 2002
Déstabilisation des microtubules	CYT997, MPC-6827, Epothilones	Essais NCT01285414, NCT00892931 et NCT00635557
Inhibiteurs du récepteur tyrosine kinase du PDGF	Dasatinib, Imatinib, Tandutinib, Pazopanib	Wick et al., 2011 ; Milano et al., 2009 ; Lu-Emerson et al., 2010 ; Iwamoto et al., 2010 ; Razis et al., 2009 ; Dresemann et al., 2005
		Essais NCT00895960, NCT00609999 et NCT00379080
Inhibiteurs de la PKCB STK	Enzastaurin	Butowski et al., 2010 ; Kreisl et al., 2009 ; Wick et al., 2010
Inhibiteurs du protéasome	Bortezomib	Unterkircher et al., 2011 ; Balyasnikova et al., 2011 ; Pedeboscq et al., 2008 ; Kardosh et al., 2008 ; Phuphanich et al., 2010
Inhibiteurs de Sp1	Terameprocol	Essai NCT00404248
Inhibiteurs de topoisomérases	RTA744, Etoposide, Topotecan, Irinotecan, AQ4N, Edotecarin, Rubitecan, Pyrazoloacridine, Karenitecin, Gimatécane	Visnyei et al., 2011
Inhibiteurs du récepteur tyrosine kinase du VEGF	PTK787 (Valatinib)	Gerstner et al., 2011 ; Morabito et al., 2006 ; Homsy et al., 2007
Inhibiteur des CDK4/6	PD-0332991	Michaud et al., 2010 ; Wiedemeyer et al., 2010
Inhibiteurs de la protéase du VIH	Nelfinavir	Pore et al., 2006 ; Tian et al., 2011 ; Pyrko et al., 2007
Endocannabinoïdes capsaicin-like	N-Arachidonoyldopamine, N-Oleoyldopamine, N-Palmitoyldopamine	Visnyei et al., 2011 ; Guzman et al., 2001 ; Galve-Roperh et al., 2000 ; Sanchez et al., 1998 ; Hu et al., 2009 ; Davies et al., 2010 ; Chu et al., 2003
Anti-protazoal; inhibiteurs du ribosome 28S	Emetine	Visnyei et al., 2011 ; Xia et al., 2007 ; Chau et al., 2005 ; Kong et al., 2010
Activateur de la c-Jun-NH ₂ -terminal kinase (JNK)	Anisomycin	Visnyei et al., 2011 ; Xia et al., 2007
Inhibiteurs de l'angiogénèse	AGM 1470	Takamiya et al., 1994
Inhibiteurs de la voie Hedgehog	Cyclopamine	Bar et al., 2007

Annexe 3 : Brevet : Utilisation d'un peptide de neurofilament pour le traitement du gliome

WO 2011/073207 PCT/EP2010/069663

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 June 2011 (23.06.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/073207 A1

PCT

- (51) International Patent Classification:
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2010/069663
- (22) International Filing Date:
14 December 2010 (14.12.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09306227.1 14 December 2009 (14.12.2009) EP
61/286,207 14 December 2009 (14.12.2009) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): **UNIVERSITE D'ANGERS** [FR/FR]; 40, rue de Rennes, F-49000 Angers (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)** [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). **THE ROYAL INSTITUTION FOR THE ADVANCEMENT OF LEARNING / MCGILL UNIVERSITY** [CA/CA]; 845 Sherbrooke Street West, Montreal, QUEBEC H3A 2T5 (CA).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **EYER, Joël** [FR/FR]; La Croix-Piron, F-49320 Blaison-Gohier (FR). **PETERSON, Alan** [CA/CA]; 464 Argyle Avenue, Westmount, H3Y 3B4 (CA). **BALZEAU, Julien** [FR/FR]; 19 rue Meignan, F-49500 Segre (FR). **BERGES, Raphaël** [FR/FR]; 7-9 rue Vauvert, F-49100 Angers (FR).
- (74) Agent: **WARCOIN, Jacques**; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2011/073207 A1

(54) Title: USE OF A NEUROFILAMENT PEPTIDE FOR THE TREATMENT OF GLIOMA

(57) Abstract: The present invention provides a new drug to treat malignant glioma, which is the most prevalent type of primary tumor of the central nervous system (CNS). The present invention indeed shows that the isolated NFL-TBS₄₀₋₆₃ peptide is highly specific for glioma cells, in which it triggers apoptosis. It is therefore presented here for use in a method for treating malignant glioma. The present invention further relates to the use of the NFL-TBS₄₀₋₆₃ peptide for detecting specifically glioma cells either in vivo, or in vitro, or for addressing chemical compounds to said tumor cells.

BIBLIOGRAPHIE

Agemy L, Friedmann-Morvinski D, Kotamraju VR, Roth L, Sugahara KN, Girard OM, Mattrey RF, Verma IM, Ruoslahti E (2011) Targeted nanoparticle enhanced proapoptotic peptide as potential therapy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(42):17450-5.

Allard E, Passirani C, Garcion E, Pigeon P, Vessières A, Jaouen G, Benoit JP (2008a) Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release*. 130(2):146-53.

Allard E, Hindre F, Passirani C, Lemaire L, Lepareur N, Noiret N, Menei P, Benoit JP (2008b) 188Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 35(10):1838-46.

Allard E, Huynh NT, Vessières A, Pigeon P, Jaouen G, Benoit JP, Passirani C (2009) Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model. *Int J Pharm*. 379(2):317-23.

Allard E, Jarnet D, Vessières A, Vinchon-Petit S, Jaouen G, Benoit JP, Passirani C (2010) Local delivery of ferrociphenol lipid nanocapsules followed by external radiotherapy as a synergistic treatment against intracranial 9L glioma xenograft. *Pharm Res*. 27(1):56-64.

Alli E, Yang JM, Ford JM, Hait WN (2007) Reversal of stathmin-mediated resistance to paclitaxel and vinblastine in human breast carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 71(5):1233-40.

Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135(3509):1127-8.

Aroui S, Ram N, Appaix F, Ronjat M, Kenani A, Pirolet F, De Waard M (2009) Maurocalcine as a non toxic drug carrier overcomes doxorubicin resistance in the cancer cell line MDA-MB 231. *Pharm Res*. 26(4):836-45.

Asada S, Choi Y, Yamada M, Wang SC, Hung MC, Qin J, Uesugi M (2002) External control of Her2 expression and cancer cell growth by targeting a Ras-linked coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(20):12747-52.

Bai RL, Paull KD, Herald CL, Malspeis L, Pettit GR, Hamel E (1991) Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *J Biol Chem*. 266(24):15882-9.

Baker RD, Howl J, Nicholl ID (2007) A synchological cell penetrating peptide mimic of p21(WAF1/CIP1) is pro-apoptogenic. *Peptides*. 28(4):731-40.

Balaña C, Ramirez JL, Taron M, Roussos Y, Ariza A, Ballester R, Sarries C, Mendez P, Sanchez JJ, Rosell R (2003) O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 9(4):1461-8.

Balyasnikova IV, Ferguson SD, Han Y, Liu F, Lesniak MS (2011) Therapeutic effect of neural stem cells expressing TRAIL and bortezomib in mice with glioma xenografts. *Cancer Lett.* 310(2):148-59.

Balzeau J, Peterson A, Eyer J (2012) The vimentin-tubulin binding site peptide (Vim-TBS.58-81) crosses the plasma membrane and enters the nuclei of human glioma cells. *Int J Pharm.* 2012 Feb 14;423(1):77-83.

Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A, Eberhart CG (2007) Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells.* 25(10):2524-33.

Bartholomä M, Valliant J, Maresca KP, Babich J, Zubieta J (2008) Single amino acid chelates (SAAC): a strategy for the design of technetium and rhenium radiopharmaceuticals. *Chem Commun (Camb).* 7;(5):493-512.

Bayssas M, Gouveia J, de Vassal F, Misset JL, Schwarzenberg L, Ribaud P, Musset M, Jasmin C, Hayat M, Mathé G (1980) Vindesine: a new vinca alkaloid. *Recent Results Cancer Res.* 74:91-7.

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY (2003) Primary brain tumours in adults. *Lancet.* 361(9354):323-31.

Bellet-Amalric E, Blaudez D, Desbat B, Graner F, Gauthier F, Renault A (2000) Interaction of the third helix of Antennapedia homeodomain and a phospholipid monolayer, studied by ellipsometry and PM-IRRAS at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta.* 1467(1):131-43.

Belmont LD, Mitchison TJ (1996) Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell.* 84(4):623-31.

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinié F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Trétarre B, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hédelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadié M, Monnereau A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schwartz C, Bovet M, Chérié-Challine L, Estève J, Remontet L, Velten M (2008) Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 56(3):159-75.

Bennett MJ, Barakat K, Huzil JT, Tuszynski J, Schriemer DC (2010) Discovery and characterization of the laulimalide-microtubule binding mode by mass shift perturbation mapping. *Chem Biol.* 17(7):725-34.

Bennett V, Stenbuck PJ (1979) Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J Biol Chem.* 254(7):2533-41.

- Bergeron C, Beric-Maskarel K, Muntasser S, Weyer L, Somerville MJ, Percy ME (1994) Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53(3):221-30.
- Berges R, Balzeau J, Peterson AC, Eyer J (2012) A Tubulin Binding Peptide Targets Glioma Cells Disrupting Their Microtubules, Blocking Migration, and Inducing Apoptosis. *Mol Ther.* 20(7):1367-77.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron.* 11(1):153-63.
- Bhattacharya B, Noad RJ, Roy P (2007) Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virology.* 15;4:7.
- Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, Eyer J (2009) Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci.* 2009 Sep 2;29(35):11043-54.
- Boleti H, Karsenti E, Vernos I (1996) Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis. *Cell.* 84(1):49-59.
- Bollag DM, McQueney PA, Zhu J, Hensens O, Koupal L, Liesch J, Goetz M, Lazarides E, Woods CM (1995) Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.* 55(11):2325-33.
- Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy BJ, Rajaraman P, Schwartzbaum JA, Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels JL, Wrensch M, Buffler PA; Brain Tumor Epidemiology Consortium (2008) Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer.* 113(7 Suppl):1953-68.
- Bonfanti M, Taverna S, Salmona M, D'Incalci M, Brogini M (1997) p21WAF1-derived peptides linked to an internalization peptide inhibit human cancer cell growth. *Cancer Res.* 57(8):1442-6.
- Bragulla HH, Homberger DG (2009) Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat.* 214(4):516-59.
- Bruce JY, Eickhoff J, Pili R, Logan T, Carducci M, Arnott J, Treston A, Wilding G, Liu G (2012) A phase II study of 2-methoxyestradiol nanocrystal colloidal dispersion alone and in combination with sunitinib malate in patients with metastatic renal cell carcinoma progressing on sunitinib malate. *Invest New Drugs.* 30(2):794-802.
- Brues AM, Cohen A (1936) Effects of colchicine and related substances on cell division. *Biochem J.* 30(8):1363-1368.1.
- Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH (2007) *Mayo Clin Proc.* 82(10):1271-86.

Burgess SA, Walker ML, Sakakibara H, Knight PJ, Oiwa K (2003) Dynein structure and power stroke. *Nature*. 421(6924):715-8.

Butowski N, Chang SM, Lamborn KR, Polley MY, Parvataneni R, Hristova-Kazmierski M, Musib L, Nicol SJ, Thornton DE, Prados MD (2010) Enzastaurin plus temozolomide with radiation therapy in glioblastoma multiforme: a phase I study. *Neuro Oncol*. 12(6):608-13.

Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL (2001) Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ*. 8(5):443-50.

Carlier MF, Didry D, Pantaloni D (1987) Microtubule elongation and guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. Role of guanine nucleotides in microtubule dynamics. *Biochemistry*. 26(14): 428-37.

Carlier MF (1991) Actin : protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem*. 266(1): 1-4.

Chaponis D, Barnes JW, Dellagatta JL, Kesari S, Fast E, Sauvageot C, Panagrahy D, Greene ER, Ramakrishna N, Wen PY, Kung AL, Stiles C, Kieran MW (2011) Lonafarnib (SCH66336) improves the activity of temozolomide and radiation for orthotopic malignant gliomas. *J Neurooncol*. 104(1):179-89.

Chau NM, Rogers P, Aherne W, Carroll V, Collins I, McDonald E, Workman P, Ashcroft M (2005) Identification of novel small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 that differentially block hypoxia-inducible factor-1 activity and hypoxia-inducible factor-1 α induction in response to hypoxic stress and growth factors. *Cancer Res*. 65(11):4918-28.

Chen B, Liu Q, Zhang Y, Xu L, Fang X (2008) Transmembrane delivery of the cell-penetrating peptide conjugated semiconductor quantum dots. *Langmuir*. 24(20):11866-71.

Child HW, Del Pino PA, De La Fuente JM, Hursthouse AS, Stirling D, Mullen M, McPhee GM, Nixon C, Jayawarna V, Berry CC (2011) Working together: the combined application of a magnetic field and penetratin for the delivery of magnetic nanoparticles to cells in 3D. *ACS Nano*. 5(10):7910-9.

Christiaens B, Symoens S, Verheyden S, Engelborghs Y, Joliot A, Prochiantz A, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Vanloo B (2002) Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *Eur J Biochem*. 269(12):2918-26.

Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM (2003) N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem*. 278(16):13633-9.

Cimini A, Ippoliti R (2011) Innovative Therapies against Human Glioblastoma Multiforme. *ISRN Oncol*. 2011;2011:787490.

Clark IE, Jan LY, Jan YN (1997) Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the *Drosophila* oocyte, epithelium, neuron and muscle. *Development*. 124(2):461-70.

Cleveland DW, Sullivan KF (1985) Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu Rev Biochem*. 54:331-65.

Cloughesy TF, Wen PY, Robins HI, Chang SM, Groves MD, Fink KL, Junck L, Schiff D, Abrey L, Gilbert MR, Lieberman F, Kuhn J, DeAngelis LM, Mehta M, Raizer JJ, Yung WK, Aldape K, Wright J, Lamborn KR, Prados MD (2006) Phase II trial of tipifarnib in patients with recurrent malignant glioma either receiving or not receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs: a North American Brain Tumor Consortium Study. *J Clin Oncol*. 24(22):3651-6.

Cloughesy TF, Yoshimoto K, Nghiemphu P, Brown K, Dang J, Zhu S, Hsueh T, Chen Y, Wang W, Youngkin D, Liao L, Martin N, Becker D, Bergsneider M, Lai A, Green R, Oglesby T, Koletto M, Trent J, Horvath S, Mischel PS, Mellinghoff IK, Sawyers CL (2008) Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med*. 5(1):e8.

Conde C, Cáceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*. 2009 May;10(5):319-32.

Costantini DL, Chan C, Cai Z, Vallis KA, Reilly RM (2007) ¹¹¹In-labeled trastuzumab (Herceptin) modified with nuclear localization sequences (NLS): an Auger electron-emitting radiotherapeutic agent for HER2/neu-amplified breast cancer. *J Nucl Med*. 48(8):1357-68.

Costantini DL, McLarty K, Lee H, Done SJ, Vallis KA, Reilly RM (2010) Antitumor effects and normal-tissue toxicity of ¹¹¹In-nuclear localization sequence-trastuzumab in athymic mice bearing HER-positive human breast cancer xenografts. *J Nucl Med*. 51(7):1084-91.

Cornelissen B, Darbar S, Sleeth K, Kersemans V, Vallis K (2009) Amplification of IR-induced DNA damage by Auger electron treatment with TAT-radioimmunoconjugates. *J Nucl Med*. 50 (Supplement 2):638.

Correia I, Chu D, Chou YH, Goldman RD, Matsudaira P (1999) Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol*. 146(4):831-42.

Crombez L, Aldrian-Herrada G, Konate K, Nguyen QN, McMaster GK, Bresseur R, Heitz F, Divita G (2009) A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Mol Ther*. 17(1):95-103.

Cutts JH, Beer CT, Noble RL. (1960) Biological properties of Vincalukoblastine, an alkaloid in *Vinca rosea* Linn, with reference to its antitumor action. *Cancer Res*. 20:1023-31.

Czosnek H, Soifer D, Wisniewski HM (1980) Studies on the biosynthesis of neurofilament proteins. *J Cell Biol*. 85:726-34.

- Dale BA (1985) Filaggrin, the matrix protein of keratin. *Am J Dermatopathol.* 7(1):65-8.
- Dale BA, Resing KA, Lonsdale-Eccles JD (1985) Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann N Y Acad Sci.* 455:330-42.
- D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E (1994) 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(9):3964-8.
- Datta K, Sundberg C, Karumanchi SA, Mukhopadhyay D (2001) The 104-123 amino acid sequence of the beta-domain of von Hippel-Lindau gene product is sufficient to inhibit renal tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 61(5):1768-75.
- Davies JW, Hainsworth AH, Guerin CJ, Lambert DG (2010) Pharmacology of capsaicin-, anandamide-, and N-arachidonoyl-dopamine-evoked cell death in a homogeneous transient receptor potential vanilloid subtype 1 receptor population. *Br J Anaesth.* 104(5):596-602.
- De Groot JF, Prados M, Urquhart T, Robertson S, Yaron Y, Sorensen AG, Norton A, Batchelor T, Drappatz J, Wen P (2009) A phase II study of XL184 in patients (pts) with progressive glioblastoma multiforme (GBM) in first or second relapse. *J Clin Oncol.*27(15S) Abs 2047.
- Dehmelt L, Halpain S (2004) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6(1):204.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem.* 269(14):10444-50.
- Diaz Miqueli A, Rolff J, Lemm M, Fichtner I, Perez R, Montero E (2009) Radiosensitisation of U87MG brain tumours by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Br J Cancer.* 100(6):950-8.
- Don S, Verrills NM, Liaw TY, Liu ML, Norris MD, Haber M, Kavallaris M (2004) Neuronal-associated microtubule proteins class III beta-tubulin and MAP2c in neuroblastoma: role in resistance to microtubule-targeted drugs. *Mol Cancer Ther.* 3(9):1137-46.
- Doolin PF, Birge WJ (1966) Ultrastructural organization of cilia and basal bodies of the epithelium of the choroid plexus in the chick embryo. *J Cell Biol.* 29(2):333-45.
- Dresemann G (2005) Imatinib and hydroxyurea in pretreated progressive glioblastoma multiforme: a patient series. *Ann Oncol.* 16(10):1702-8.
- Drewes G, Ebnet A, Mandelkow EM (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci.* 23(8):307-11.
- Dupuis-Williams P, Fleury-Aubusson A, de Loubresse NG, Geoffroy H, Vayssié L, Galvani A, Espigat A, Rossier J (2002) Functional role of epsilon-tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J Cell Biol.* 158(7):1183-93.

Düzgüneş N, de Ilarduya CT (2012) Genetic nanomedicine: gene delivery by targeted lipoplexes. *Methods Enzymol.* 509:355-67.

Edwards ML, Stemerick DM, Sunkara PS (1990) Chalcones: a new class of antimetabolic agents. *J Med Chem.* 33(7):1948-54.

El-Andaloussi S, Johansson HJ, Holm T, Langel U (2007a) A novel cell-penetrating peptide, M918, for efficient delivery of proteins and peptide nucleic acids. *Mol Ther.* 15(10):1820-6.

El-Andaloussi S, Järver P, Johansson HJ, Langel U (2007) Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochem J.* 407(2):285-92.

El-Azouzi M, Chung RY, Farmer GE, Martuza RL, Black PM, Rouleau GA, Hettlich C, Hedley-Whyte ET, Zervas NT, Panagopoulos K, Nakamura Y, Gusella JF, Seizinger BR (1989) Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(18):7186-90.

Eller JL, Longo SL, Kyle MM, Bassano D, Hicklin DJ, Canute GW (2005) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme in vitro and in vivo. *Neurosurgery.* 56(1):155-62; discussion 162.

Elmqvist A, Lindgren M, Bartfai T, Langel U (2001) VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res.* 269(2):237-44.

Estève E, Mabrouk K, Dupuis A, Smida-Rezgui S, Altafaj X, Grunwald D, Platel JC, Andreotti N, Marty I, Sabatier JM, Ronjat M, De Waard M (2005) Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J Biol Chem.* 280(13):12833-9.

Eyer J, Peterson AC (1994) Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron.* 12(2):389-405.

Falcon BL, Barr S, Gokhale PC, Chou J, Fogarty J, Depeille P, Miglarese M, Epstein DM, McDonald DM (2011) Reduced VEGF production, angiogenesis, and vascular regrowth contribute to the antitumor properties of dual mTORC1/mTORC2 inhibitors. *Cancer Res.* 71(5):1573-83.

Faraji AH, Wipf P (2009) Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem.* 17(8):2950-62.

Fliegner KH, Ching GY, Liem RK (1990) The predicted amino acid sequence of alpha-internexin is that of a novel neuronal intermediate filament protein. *EMBO J.* 9(3):749-55.

Foisner R, Wiche G (1991) Intermediate filament-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 3(1):75-81.

Franceschi E, Cavallo G, Lonardi S, Magrini E, Tosoni A, Grosso D, Scopece L, Blatt V, Urbini B, Pession A, Tallini G, Crinò L, Brandes AA (2007) Gefitinib in patients with

progressive high-grade gliomas: a multicentre phase II study by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *Br J Cancer*. 96(7):1047-51.

Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K (1979) Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1979 Jun;81(3):570-80.

Franke WW, Schiller DL, Hatzfeld M, Winter S (1983) Protein complexes of intermediate-sized filaments: melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80(23):7113-7.

Frankel AD, Pabo CO (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 55(6):1189-93.

Fretz MM, Penning NA, Al-Taei S, Futaki S, Takeuchi T, Nakase I, Storm G, Jones AT (2007) Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. *Biochem J*. 403(2):335-42.

Friede RL, Samorajski T (1970) Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice. *Anat Rec*. 167(4):379-87.

Frizelle SP, Kratzke MG, Carreon RR, Engel SC, Youngquist L, Klein MA, Fourre L, Shekels LL, Kratzke RA (2008) Inhibition of both mesothelioma cell growth and Cdk4 activity following treatment with a TATp16INK4a peptide. *Anticancer Res*. 28(1A):1-7.

Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK, Liu TJ, Alemany R, Bruner JM, Chintala SK, Rao JS, Levin VA, Kyritsis AP (1998) Suppression of human glioma growth by adenovirus-mediated Rb gene transfer.

Fujiwara S, Takeo N, Otani Y, Parry DA, Kunimatsu M, Lu R, Sasaki M, Matsuo N, Khaleduzzaman M, Yoshioka H (2001) Epiplakin, a novel member of the Plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen. Structure and tissue localization. *J Biol Chem*. 276(16):13340-7.

Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM (2002) Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med*. 8(8):808-15.

Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*. 276(8):5836-40.

Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ, Reid JM, Ames MM, Hardwick JS, Reilly JF, Loboda A, Nebozhyn M, Fantin VR, Richon VM, Scheithauer B, Giannini C, Flynn PJ, Moore DF Jr, Zwiebel J, Buckner JC (2009) Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. *J Clin Oncol*. 27(12):2052-8.

- Galloway PG, Mulvihill P, Perry G (1992) Filaments of Lewy bodies contain insoluble cytoskeletal elements. *Am J Pathol.* 140(4):809-22.
- Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med.* 6(3):313-9.
- Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, Menei P, Benoît JP (2006) A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther.* 5(7):1710-22.
- Geisler N, Kaufmann E, Fischer S, Plessmann U, Weber K (1983) Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy terminal extensions increasing in size between triplet proteins. *Embo J.* 2:1295-1302.
- Gerstner ER, Eichler AF, Plotkin SR, Drappatz J, Doyle CL, Xu L, Duda DG, Wen PY, Jain RK, Batchelor TT (2011) Phase I trial with biomarker studies of vatalanib (PTK787) in patients with newly diagnosed glioblastoma treated with enzyme inducing anti-epileptic drugs and standard radiation and temozolomide. *J Neurooncol.* 103(2):325-32.
- Giacinti C, Giordano A (2006) RB and cell cycle progression. *Oncogene.* 25(38):5220-7.
- Gingras M, Raimundo JM, Chabre YM (2007) Cleavable dendrimers. *Angew Chem Int Ed Engl.* 46(7):1010-7.
- Gius DR, Ezhevsky SA, Becker-Hapak M, Nagahara H, Wei MC, Dowdy SF (1999) Transduced p16INK4a peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G1. *Cancer Res.* 59(11):2577-80.
- Glass TL, Liu TJ, Yung WK (2000) Inhibition of cell growth in human glioblastoma cell lines by farnesyltransferase inhibitor SCH66336. *Neuro Oncol.* 2(3):151-8.
- Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol.* 134(4):971-83.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 275(8):5535-44.
- Gong CX, Wang JZ, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2003) Inhibition of protein phosphatase 2A induces phosphorylation and accumulation of neurofilaments in metabolically active rat brain slices. *Neurosci Lett.* 340(2):107-10.

Gonzales M, Weksler B, Tsuruta D, Goldman RD, Yoon KJ, Hopkinson SB, Flitney FW, Jones JC (2001) Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2001 Jan;12(1):85-100.

Goodin S, Kane MP, Rubin EH (2004) Epothilones: mechanism of action and biologic activity. *J Clin Oncol*. 22(10):2015-25.

Goudar RK, Shi Q, Hjelmeland MD, Keir ST, McLendon RE, Wikstrand CJ, Reese ED, Conrad CA, Traxler P, Lane HA, Reardon DA, Cavenee WK, Wang XF, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN (2005) Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition. *Mol Cancer Ther*. 4(1):101-12.

Green KJ, Böhringer M, Gocken T, Jones JC (2005) Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem*. 70:143-202.

Gregoriadis G, Wills EJ, Swain CP, Tavill AS (1974) Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet*. 1(7870):1313-6.

Grossman SA, Phuphanich S, Lesser G, Rozental J, Grochow LB, Fisher J, Piantadosi S; New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium (2001) Toxicity, efficacy, and pharmacology of suramin in adults with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 19(13):3260-6.

Guo D, Prins RM, Dang J, Kuga D, Iwanami A, Soto H, Lin KY, Huang TT, Akhavan D, Hock MB, Zhu S, Kofman AA, Bensinger SJ, Yong WH, Vinters HV, Horvath S, Watson AD, Kuhn JG, Robins HI, Mehta MP, Wen PY, DeAngelis LM, Prados MD, Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Mischel PS (2009) EGFR signaling through an Akt-SREBP-1-dependent, rapamycin-resistant pathway sensitizes glioblastomas to antiproliferative therapy. *Sci Signal*. 2(101):ra82.

Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperch I (2001) Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J Mol Med (Berl)*. 78(11):613-25.

Hamel E, Lin CM (1983) Interactions of combretastatin, a new plant-derived antimitotic agent, with tubulin. *Biochem Pharmacol*. 32(24):3864-7.

Harbour JW, Worley L, Ma D, Cohen M (2002) Transducible peptide therapy for uveal melanoma and retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 120(10):1341-6.

Hastie SB (1991) Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol Ther*. 51(3):377-401.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 352(10):997-1003.

- Hegi ME, Diserens AC, Bady P, Kamoshima Y, Kouwenhoven MC, Delorenzi M, Lambiv WL, Hamou MF, Matter MS, Koch A, Heppner FL, Yonekawa Y, Merlo A, Frei K, Mariani L, Hofer S (2011) Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib--a phase II trial. *Mol Cancer Ther.* 10(6):1102-12.
- Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K (2005) The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med.* 3:38.
- Helmke BP, Goldman RD, Davies PF (2000) Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow. *Circ Res.* 2000 Apr 14;86(7):745-52.
- Herrmann H, Aebi U (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem.* 73:749-89.
- Herrmann H, Wiche G (1987) Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J Biol Chem.* 262(3):1320-5.
- Herzog W, Weber K (1978) Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro. *Eur J Biochem.* 92(1):1-8.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP (2002) A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res.* 19(6):875-80.
- Hill WD, Arai M, Cohen JA, Trojanowski JQ (1993) Neurofilament mRNA is reduced in Parkinson's disease substantia nigra pars compacta neurons. *J Comp Neurol.* 329(3):328-36.
- Hisanaga S, Hirokawa N (1988) Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J Mol Biol.* 202:297-305.
- Hirokawa N, Glicksman MA, Willard MB (1984) Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *J Cell Biol.* 98:1523-36.
- Hirokawa N (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 6(1):74-81.
- Hirokawa N, Noda Y, Okada Y (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol.* 10(1):60-73.
- Hirokawa N, Noda Y (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev.* 88(3):1089-118.
- Holinger EP, Chittenden T, Lutz RJ (1999) Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem.* 274(19):13298-304.

Homsy J, Daud AI (2007) Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control*. 14(3):285-94.

Hu SS, Bradshaw HB, Benton VM, Chen JS, Huang SM, Minassi A, Bisogno T, Masuda K, Tan B, Roskoski R Jr, Cravatt BF, Di Marzo V, Walker JM (2009) The biosynthesis of N-arachidonoyl dopamine (NADA), a putative endocannabinoid and endovanilloid, via conjugation of arachidonic acid with dopamine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 81(4):291-301.

Huse JT, Holland EC (2010) Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 10(5):319-31.

Huwylar J, Wu D, Pardridge WM (1996) Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(24):14164-9.

Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ (2005) PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J*. 24(22):3834-45.

Iwamoto FM, Lamborn KR, Robins HI, Mehta MP, Chang SM, Butowski NA, Deangelis LM, Abrey LE, Zhang WT, Prados MD, Fine HA (2010) Phase II trial of pazopanib (GW786034), an oral multi-targeted angiogenesis inhibitor, for adults with recurrent glioblastoma (North American Brain Tumor Consortium Study 06-02). *Neuro Oncol*. 12(8):855-61.

Jafari M, Soltani M, Naahidi S, Karunaratne DN, Chen P (2012) Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery. *Curr Med Chem*. 19(2):197-208.

Janmey PA, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M (1991) Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol*. 113(1):155-60.

Järver P, Langel U (2006) Cell-penetrating peptides--a brief introduction. *Biochim Biophys Acta*. 1758(3):260-3.

Jin J, Bae KH, Yang H, Lee SJ, Kim H, Kim Y, Joo KM, Seo SW, Park TG, Nam DH (2011) In vivo specific delivery of c-Met siRNA to glioblastoma using cationic solid lipid nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 22(12):2568-72.

Job D, Valiron O, Oakley B (2003) Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol*. 15(1):111-7.

Joensuu H, Pupa M, Sihto H, Tynninen O, Nupponen NN (2005) Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol*. 207(2):224-31.

Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisén J (1999) Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res*. 253(2):733-6.

Johnson IH, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP Jr (1963) The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res*. 23:1390-427.

- Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(5):1864-8.
- Josephson L, Tung CH, Moore A, Weissleder R (1999) High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem.* 10(2):186-91.
- Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature.* 347(6288):37-44.
- Kanazawa T, Taki H, Tanaka K, Takashima Y, Okada H (2011) Cell-penetrating peptide-modified block copolymer micelles promote direct brain delivery via intranasal administration. *Pharm Res.* 28(9):2130-9.
- Kardosh A, Golden EB, Pyrko P, Uddin J, Hofman FM, Chen TC, Louie SG, Petasis NA, Schönthal AH (2008) Aggravated endoplasmic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib. *Cancer Res.* 68(3):843-51.
- Katsumoto T, Mitsushima A, Kurimura T (1990) The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol Cell.* 68(2):139-46.
- Kavallaris M (2010) Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer.* 10(3):194-204.
- Kerkis A, Kerkis I, Rádis-Baptista G, Oliveira EB, Vianna-Morgante AM, Pereira LV, Yamane T (2004) Crostamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *FASEB J.* 18(12):1407-9.
- Kong HS, Lee S, Beebe K, Scroggins B, Gupta G, Lee MJ, Jung YJ, Trepel J, Neckers L (2010) Emetine promotes von Hippel-Lindau-independent degradation of hypoxia-inducible factor-2 α in clear cell renal carcinoma. *Mol Pharmacol.* 78(6):1072-8.
- Konishi H, Namikawa K, Shikata K, Kobatake Y, Tachibana T, Kiyama H (2007) Identification of peripherin as a Akt substrate in neurons. *J Biol Chem.* 282(32):23491-9.
- Korenbaum E, Nordberg P, Björkegren-Sjögren C, Schutt CE, Lindberg U, Karlsson R (1998) The role of profilin in actin polymerization and nucleotide exchange. *Biochemistry.* 1998 Jun 30;37(26):9274-83.
- Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kouzelis K, Hadjiyannakis M, Priftis A, Stamoulis G, Seretis A, Thomas-Tsagli E (1997) MDM2 and p53 expression in gliomas: a multivariate survival analysis including proliferation markers and epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer.* 75(9):1269-78.

Kowalski RJ, Giannakakou P, Hamel E (1997) Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol®). *J Biol Chem.* 272(4):2534-41.

Khrapunovich-Baine M, Menon V, Verdier-Pinard P, Smith AB 3rd, Angeletti RH, Fiser A, Horwitz SB, Xiao H (2009) Distinct pose of discodermolide in taxol binding pocket drives a complementary mode of microtubule stabilization. *Biochemistry.* 48(49):11664-77.

Krause E, Beyermann M, Fabian H, Dathe M, Rothemund S, Bienert M (1996) Conformation of a water-soluble beta-sheet model peptide. A circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopic study of double D-amino acid replacements. *Int J Pept Protein Res.* 48(6):559-68.

Kreis S, Schönfeld HJ, Melchior C, Steiner B, Kieffer N (2005) The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin alpha2/beta1 cytoplasmic tail complex and co-localizes with native alpha2/beta1 in endothelial cell focal adhesions. *Exp Cell Res.* 305(1):110-21.

Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Kotliarova S, Walling J, Musib L, Thornton D, Albert PS, Fine HA (2009) A phase I trial of enzastaurin in patients with recurrent gliomas. *Clin Cancer Res.* 15(10):3617-23.

Kruczynski A, Barret JM, Etiévant C, Colpaert F, Fahy J, Hill BT (1998) Antimitotic and tubulin-interacting properties of vinflunine, a novel fluorinated Vinca alkaloid. *Biochem Pharmacol.* 55(5):635-48.

Kuhlmann-Krieg S, Sommer I, Schachner M (1988) Ultrastructural features of cultured oligodendrocytes expressing stage-specific cell-surface antigens. *Brain Res.* 467(2):269-80.

Kulke MH, Chan JA, Meyerhardt JA, Zhu AX, Abrams TA, Blaszkowsky LS, Regan E, Sidor C, Fuchs CS (2011) A prospective phase II study of 2-methoxyestradiol administered in combination with bevacizumab in patients with metastatic carcinoid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 68(2):293-300.

Lagerholm BC (2007) Peptide-mediated intracellular delivery of quantum dots. *Methods Mol Biol.* 374:105-12.

Lamprecht A, Benoit JP (2006) Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control Release.* 112(2):208-13.

Langley RC Jr, Cohen CM (1987) Cell type-specific association between two types of spectrin and two types of intermediate filaments. *Cell Motil Cytoskeleton.* 8(2):165-73.

Laterra JJ, Grossman SA, Carson KA, Lesser GJ, Hochberg FH, Gilbert MR; NABTT CNS Consortium study (2004) Suramin and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: phase 2 NABTT CNS Consortium study. *Neuro Oncol.* 6(1):15-20.

Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LS, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh JR, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy AS, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE, Wordeman L (2004) A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol.* 167(1):19-22.

Lee SC, Kim IG, Marekov LN, O'Keefe EJ, Parry DA, Steinert PM (1993) The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J Biol Chem.* 268(16):12164-76.

Lee SH, Kim MS, Kwon HC, Park IC, Park MJ, Lee CT, Kim YW, Kim CM, Hong SI (2000) Growth inhibitory effect on glioma cells of adenovirus-mediated p16/INK4a gene transfer in vitro and in vivo. *Int J Mol Med.* 6(5):559-63.

Lesniak MS, Brem H (2004) Targeted therapy for brain tumours. *Nat Rev Drug Discov.* 3(6):499-508.

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2(3):183-92.

Levine PA, Phuphanich S, Glantz MJ, Mason WP, Groves MD, Recht LD, Shaffrey M, Puduvalli D, Roeck B, Zhang MH, Collier MA, Anderson MD (2002) Randomized phase II study of temozolomide (TMZ) with and without the metalloprotease (MMP) inhibitor prinomastat in patients with glioblastoma multiforme (GBM) following best surgery and radiation therapy. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol.* 21:100.

Long BH, Carboni JM, Wasserman AJ, Cornell LA, Casazza AM, Jensen PR, Lindel T, Fenical W, Fairchild CR (1998) Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Res.* 58(6):1111-5.

Li DM, Sun H (1997) TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 57(11):2124-9.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 275(5308):1943-7.

Li Y, He H, Jia X, Lu WL, Lou J, Wei Y (2012) A dual-targeting nanocarrier based on poly(amidoamine) dendrimers conjugated with transferrin and tamoxifen for treating brain gliomas. *Biomaterials.* 33(15):3899-908.

Ling Y, Wei K, Zou F, Zhong S (2012) Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *Int J Pharm.* 430(1-2):266-75.

- Liu M, Guo YM, Wu QF, Yang JL, Wang P, Wang SC, Guo XJ, Qiang YQ, Duan XY (2006) Paramagnetic particles carried by cell-penetrating peptide tracking of bone marrow mesenchymal stem cells, a research in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 347(1):133-40.
- Loktionov A (2004) Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett.* 208(1):1-33.
- Ludueña RF (1993) Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol Biol Cell.* 4(5):445-57.
- Lu-Emerson C, Norden AD, Drappatz J, Quant EC, Beroukhim R, Ciampa AS, Doherty LM, Lafrankie DC, Ruland S, Wen PY (2011) Retrospective study of dasatinib for recurrent glioblastoma after bevacizumab failure. *J Neurooncol.* 104(1):287-91.
- Lundberg M, Johansson M (2002) Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(2):367-71.
- Lustig R, Mikkelsen T, Lesser G, Grossman S, Ye X, Desideri S, Fisher J, Wright J; New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium (2008) Phase II preradiation R115777 (tipifarnib) in newly diagnosed GBM with residual enhancing disease. *Neuro Oncol.* 10(6):1004-9.
- Lynley AM, Dale BA (1983) The characterization of human epidermal filaggrin. A histidine-rich, keratin filament-aggregating protein. *Biochim Biophys Acta.* 744(1):28-35.
- Mabuchi K, Li B, Ip W, Tao T (1997) Association of calponin with desmin intermediate filaments. *J Biol Chem.* 272(36):22662-6.
- MacRae TH (1997) Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem.* 244(2):265-78.
- Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Gräslund A (2011) Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys.* 2011:414729.
- Madiraju C, Edler MC, Hamel E, Raccor BS, Balachandran R, Zhu G, Giuliano KA, Vogt A, Shin Y, Fournier JH, Fukui Y, Brückner AM, Curran DP, Day BW (2005) Tubulin assembly, taxoid site binding, and cellular effects of the microtubule-stabilizing agent dictyostatin. *Biochemistry.* 44(45):15053-63.
- Mäe M, Langel U (2006) Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol.* 6(5):509-14.
- Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, García-Echeverría C (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 7(7):1851-63.
- Maity A, Pore N, Lee J, Solomon D, O'Rourke DM (2000) Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human

glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res.* 60(20):5879-86.

Makowski GS, Ramsby ML (1998) Degradation of cytokeratin intermediate filaments by calcium-activated proteases (calpains) in vitro: implications for formation of Mallory bodies. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 101(3):211-23.

Manna T, Thrower D, Miller HP, Curmi P, Wilson L (2006) Stathmin strongly increases the minus end catastrophe frequency and induces rapid treadmilling of bovine brain microtubules at steady state in vitro. *J Biol Chem.* 281(4):2071-8.

Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(12):679-89.

Maral R, Bourut C, Chenu E, Mathé G (1984) Experimental antitumor activity of 5'-nor-anhydrovinblastine navelbine. *Cancer Lett.* 22(1):49-54.

Margus H, Padari K, Pooga M (2012) Cell-penetrating peptides as versatile vehicles for oligonucleotide delivery. *Mol Ther.* 20(3):525-33.

Matsui H, Tomizawa K, Lu YF, Matsushita M (2003) Protein Therapy: in vivo protein transduction by polyarginine (11R) PTD and subcellular targeting delivery. *Curr Protein Pept Sci.* 4(2):151-7.

Meltzer PS (1994) MDM2 and p53: a question of balance. *J Natl Cancer Inst.* 86(17):1265-6.

Menezes JR, Luskin MB (1994) Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J Neurosci.* 14(9):5399-416.

Metcalf CA, Bohacek R, Rozamus LW, Burns KD, Roses JB, Rivera VM, Tang H, Keats JA, Dalgarno DC, Snodgrass J, Berstein DL, Weigele M, Clackson T (2004) Structure-based design of AP23573, a phosphorous-containing analog of rapamycin for anti-tumor therapy. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 45:2476.

Michalczyk K, Ziman M (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol.* 20(2):665-71.

Michaud K, Solomon DA, Oermann E, Kim JS, Zhong WZ, Prados MD, Ozawa T, James CD, Waldman T (2010) Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res.* 70(8):3228-38.

Michiue H, Eguchi A, Scadeng M, Dowdy SF (2009) Induction of in vivo synthetic lethal RNAi responses to treat glioblastoma. *Cancer Biol Ther.* 8(23):2306-13.

Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 93(3):421-43.

Milano V, Piao Y, LaFortune T, de Groot J (2009) Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma. *Mol Cancer Ther.* 8(2):394-406.

- Minin AA, Moldaver MV (2008) Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochemistry (Mosc)*. 2008 Dec;73(13):1453-66.
- Minkov I, Ivanova T, Panaiotov I, Proust J, Saulnier P (2005) Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface. I. Kinetics of surface film formation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 45(1):14-23.
- Mita M, Sankhala K, Abdel-Karim I, Mita A, Giles F (2008) Deforolimus (AP23573) a novel mTOR inhibitor in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*. 17(12):1947-54.
- Mizuno Y, Guyon JR, Okamoto K, Kunkel LM (2007) Synemin expression in brain. *Muscle Nerve*. 36(4):497-504.
- Molloy JE, Burns JE, Sparrow JC, Tregear RT, Kendrick-Jones J, White DC (1995) Single-molecule mechanics of heavy meromyosin and S1 interacting with rabbit or *Drosophila* actins using optical tweezers. *Biophys J*. 68(4 Suppl):298S-303S; 303S-305S.
- Mooberry SL, Tien G, Hernandez AH, Plubrukarn A, Davidson BS (1999) Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res*. 59(3):653-60.
- Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F (2006) Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist*. 11(7):753-64.
- Morris MC, Vidal P, Chaloin L, Heitz F, Divita G (1997) A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 25(14):2730-6.
- Morris PG, Fornier MN (2008) Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clin Cancer Res*. 14(22):7167-72.
- Moyal EC, Laprie A, Delannes M, Poublanc M, Catalaa I, Dalenc F, Berchery D, Sabatier J, Bousquet P, De Porre P, Alaux B, Toulas C (2007) Phase I trial of tipifarnib (R115777) concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 68(5):1396-401.
- Müller-Reichert T, Chrétien D, Severin F, Hyman AA (1998) Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (alpha,beta)methylenediphosphonate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(7):3661-6.
- Munoz DG, Greene C, Perl DP, Selkoe DJ (1988) Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 47(1):9-18.
- Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K (1992) Immunocytochemical and ultrastructural studies of upper motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 83(5):518-24.
- Murphy M, Hinman A, Levine AJ (1996) Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein. *Genes Dev*. 10(23):2971-80.

- Müsch A (2004) Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic*. 5(1):1-9.
- Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF (1998) Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med*. 4(12):1449-52.
- Nair BG, Fukuda T, Mizuki T, Hanajiri T, Maekawa T (2012) Intracellular trafficking of superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with TAT peptide: 3-dimensional electron tomography analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 421(4):763-7.
- Nascimento FD, Hayashi MA, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Rádis-Baptista G, Nader HB, Yamane T, Tersariol IL, Kerkis I (2007) Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*. 282(29):21349-60.
- Nave KA, Schwab MH (2005) Glial cells under remote control. *Nat Neurosci*. 8(11):1420-2.
- Ng QS, Mandeville H, Goh V, Alonzi R, Milner J, Carnell D, Meer K, Padhani AR, Saunders MI, Hoskin PJ (2011) Phase Ib trial of radiotherapy in combination with combretastatin-A4-phosphate in patients with non-small-cell lung cancer, prostate adenocarcinoma, and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol*. 23(1):231-7.
- Nguyen TL, Xu X, Gussio R, Ghosh AK, Hamel E (2010) The assembly-inducing laulimalide/peloruside a binding site on tubulin: molecular modeling and biochemical studies with [³H]peloruside A. *J Chem Inf Model*. 50(11):2019-28.
- Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S (2006) Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol*. 8(2):156-62.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. 342(6250):705-8.
- Nilsson T, Müntzing J (1973) Histochemical and biochemical investigation of advanced prostatic carcinoma treated with estramustine phosphate, Estracyt. *Scand J Urol Nephrol*. 7(1):18-22.
- Nitin N, LaConte LE, Zurkiya O, Hu X, Bao G (2004) Functionalization and peptide-based delivery of magnetic nanoparticles as an intracellular MRI contrast agent. *J Biol Inorg Chem*. 9(6):706-12.
- Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 391(6663):199-203.
- Obermeyer N, Janson N, Bergmann J, Buck F, Ito WD (2003) Proteome analysis of migrating versus nonmigrating rat heart endothelial cells reveals distinct expression patterns. *Endothelium*. 2003;10(3):167-78.

- Oehlke J, Krause E, Wiesner B, Beyermann M, Bienert M (1997) Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic beta-sheet forming peptide. *FEBS Lett.* 415(2):196-9.
- Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, Krause E, Beyermann M, Klausch E, Melzig M, Bienert M (1998) Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta.* 1414(1-2):127-39.
- Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijssen JF, Hennink WE (2010) Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res.* 27(12):2569-89.
- Oguiura N, Boni-Mitake M, Rádis-Baptista G (2005) New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon.* 46(4):363-70.
- Ohara O, Gahara Y, Miyake T, Teraoka H, Kitamura T (1993) Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *J Cell Biol.* 121(2):387-95.
- Oka N, Soeda A, Inagaki A, Onodera M, Maruyama H, Hara A, Kunisada T, Mori H, Iwama T (2007) VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 360(3):553-9.
- Okumura M, Yamakawa H, Ohara O, Owaribe K (2002) Novel alternative splicings of BPAG1 (bullous pemphigoid antigen 1) including the domain structure closely related to MACF (microtubule actin cross-linking factor). *J Biol Chem.* 277(8):6682-7.
- Pagano A, Honoré S, Mohan R, Berges R, Akhmanova A, Braguer D (2012) Epothilone B inhibits migration of glioblastoma cells by inducing microtubule catastrophes and affecting EB1 accumulation at microtubule plus ends. *Biochem Pharmacol.* 84(4):432-43.
- Parada Y, Banerji L, Glassford J, Lea NC, Collado M, Rivas C, Lewis JL, Gordon MY, Thomas NS, Lam EW (2001) BCR-ABL and interleukin 3 promote haematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and p27Kip1 expression. *J Biol Chem.* 276(26):23572-80.
- Pease DC (1963) The ultrastructure of flagellar fibrils. *J Cell Biol.* 18:313-26.
- Pédeboscq S, L'Azou B, Passagne I, De Giorgi F, Ichas F, Pometan JP, Cambar J (2008) Cytotoxic and apoptotic effects of bortezomib and gefitinib compared to alkylating agents on human glioblastoma cells. *J Exp Ther Oncol.* 7(2):99-111.
- Pelloski CE, Ballman KV, Furth AF, Zhang L, Lin E, Sulman EP, Bhat K, McDonald JM, Yung WK, Colman H, Woo SY, Heimberger AB, Suki D, Prados MD, Chang SM, Barker FG 2nd, Buckner JC, James CD, Aldape K (2007) Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol.* 25(16):2288-94.
- Penningroth SM, Kirschner MW (1977) Nucleotide binding and phosphorylation in microtubule assembly in vitro. *J Mol Biol.* 115(4):643-73.

- Perrot R, Lonchampt P, Peterson AC, Eyer J (2007) Axonal neurofilaments control multiple fiber properties but do not influence structure or spacing of nodes of Ranvier. *J Neurosci.* 27(36):9573-84.
- Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J (2008) Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2008 Aug;38(1):27-65.
- Peyrot V, Leynadier D, Sarrazin M, Briand C, Rodriguez A, Nieto JM, Andreu JM (1989) Interaction of tubulin and cellular microtubules with the new antitumor drug MDL 27048. A powerful and reversible microtubule inhibitor. *J Biol Chem.* 264(35):21296-301.
- Pfaendtner J, De La Cruz EM, Voth GA (2010) Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(16):7299-304.
- Pfeffer MR, Levitt ML, Aderka D (2004) Gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 22(13):2755-6; author reply 2756.
- Phillips WT, Goins B, Bao A, Vargas D, Gutierrez JE, Trevino A, Miller JR, Henry J, Zuniga R, Vecil G, Brenner AJ (2012) Rhenium-186 liposomes as convection-enhanced nanoparticle brachytherapy for treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol.* 14(4):416-25.
- Phuphanich S, Supko JG, Carson KA, Grossman SA, Burt Nabors L, Mikkelsen T, Lesser G, Rosenfeld S, Desideri S, Olson JJ (2010) Phase 1 clinical trial of bortezomib in adults with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol.* 100(1):95-103.
- Pitre A, Davis N, Paul M, Orr AW, Skalli O (2012) Synemin promotes Akt-dependent glioblastoma cell proliferation by antagonizing PP2A. *Mol Biol Cell.* 2012 Feb 15.
- Poillot C, De Waard M (2011) [Potential of cell penetrating peptides for cell drug delivery]. *Med Sci (Paris).* 27(5):527-34.
- Pollard TD, Mooseker MS (1981) Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J Cell Biol.* 88(3):654-9.
- Pooga M, Hällbrink M, Zorko M, Langel U (1998) Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12(1):67-77.
- Pore N, Gupta AK, Cerniglia GJ, Maity A (2006) HIV protease inhibitors decrease VEGF/HIF-1alpha expression and angiogenesis in glioblastoma cells. *Neoplasia.* 8(11):889-95.
- Prasad G, Sottero T, Yang X, Mueller S, James CD, Weiss WA, Polley MY, Ozawa T, Berger MS, Aftab DT, Prados MD, Haas-Kogan DA (2011) Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide. *Neuro Oncol.* 13(4):384-92.

- Price A, Shi Q, Morris D, Wilcox ME, Brasher PM, Rewcastle NB, Shalinsky D, Zou H, Appelt K, Johnston RN, Yong VW, Edwards D, Forsyth P (1999) Marked inhibition of tumor growth in a malignant glioma tumor model by a novel synthetic matrix metalloproteinase inhibitor AG3340. *Clin Cancer Res.* 5(4):845-54.
- Puputti M, Tynnenen O, Sihto H, Blom T, Mäenpää H, Isola J, Paetau A, Joensuu H, Nupponen NN (2006) Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. *Mol Cancer Res.* 4(12):927-34.
- Pyrko P, Kardosh A, Wang W, Xiong W, Schönthal AH, Chen TC (2007) HIV-1 protease inhibitors nelfinavir and atazanavir induce malignant glioma death by triggering endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* 67(22):10920-8.
- Qiang L, Yu W, Andreadis A, Luo M, Baas PW (2006) Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J Neurosci.* 26(12):3120-9.
- Qin Y, Chen H, Zhang Q, Wang X, Yuan W, Kuai R, Tang J, Zhang L, Zhang Z, Zhang Q, Liu J, He Q (2011) Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals. *Int J Pharm.* 420(2):304-12.
- Qin Y, Zhang Q, Chen H, Yuan W, Kuai R, Xie F, Zhang L, Wang X, Zhang Z, Liu J, He Q (2012) Comparison of four different peptides to enhance accumulation of liposomes into the brain. *J Drug Target.* 20(3):235-45.
- Rádis-Baptista G, de la Torre BG, Andreu D (2008) A novel cell-penetrating peptide sequence derived by structural minimization of a snake toxin exhibits preferential nucleolar localization. *J Med Chem.* 2008 Nov 27;51(22):7041-4.
- Rana S, Maples PB, Senzer N, Nemunaitis J (2008) Stathmin 1: a novel therapeutic target for anticancer activity. *Expert Rev Anticancer Ther.* 8(9):1461-70.
- Razis E, Selviaridis P, Labropoulos S, Norris JL, Zhu MJ, Song DD, Kalebic T, Torrens M, Kalogera-Fountzila A, Karkavelas G, Karanastasi S, Fletcher JA, Fountzilas G (2009) Phase II study of neoadjuvant imatinib in glioblastoma: evaluation of clinical and molecular effects of the treatment. *Clin Cancer Res.* 15(19):6258-66.
- Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Desjardins A, Sathornsumetee S, Herndon JE 2nd, Dowell JM, McLendon RE, Provenzale JM, Sampson JH, Smith RP, Swaisland AJ, Ochs JS, Lyons P, Tourt-Uhlig S, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN (2006) Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 12(3 Pt 1):860-8.
- Régina A, Demeule M, Ché C, Lavallée I, Poirier J, Gabathuler R, Béliveau R, Castaigne JP (2008) Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol.* 155(2):185-97.
- Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, McLaughlin ME, Jacks T (2000) Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nat Genet.* 26(1):109-13.

- Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM (1975) Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science*. 189(4207):1002-5.
- Rittner K, Benavente A, Bompard-Sorlet A, Heitz F, Divita G, Brasseur R, Jacobs E (2002) New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther*. 5(2):104-14.
- Roach MC, Boucher VL, Walss C, Ravdin PM, Ludueña RF (1998) Preparation of a monoclonal antibody specific for the class I isotype of beta-tubulin: the beta isotypes of tubulin differ in their cellular distributions within human tissues. *Cell Motil Cytoskeleton*. 39(4):273-85.
- Roger B, Al-Bassam J, Dehmelt L, Milligan RA, Halpain S (2004) MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr Biol*. 14(5):363-71.
- Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, Ayers M, Ross JS, Zhang P, Buchholz TA, Kuerer H, Green M, Arun B, Hortobagyi GN, Symmans WF, Pusztai L (2005) Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(23):8315-20.
- Rudrabhatla P, Pant HC (2011) Role of protein phosphatase 2A in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 8(6):623-32.
- Ruhrberg C, Hajibagheri MA, Simon M, Dooley TP, Watt FM (1996) Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *J Cell Biol*. 134(3):715-29.
- Ruhrberg C, Hajibagheri MA, Parry DA, Watt FM (1997) Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. *J Cell Biol*. 139(7):1835-49.
- Ruiz F, Krzywicka A, Klotz C, Keller A, Cohen J, Koll F, Balavoine G, Beisson J (2000) The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, eta-tubulin. *Curr Biol*. 2000 Nov 16;10(22):1451-4.
- Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 11(11):775-87.
- Sakaguchi T, Okada M, Kitamura T, Kawasaki K (1993) Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail. *Neurosci Lett*. 153(1):65-8.
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M (1998) Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett*. 436(1):6-10.
- Sanghavi P, Lu S, Gonsalvez GB (2012) A functional link between localized Oskar, dynamic microtubules, and endocytosis. *Dev Biol*. 367(1):66-77.

Sarcar B, Kahali S, Chinnaiyan P (2010) Vorinostat enhances the cytotoxic effects of the topoisomerase I inhibitor SN38 in glioblastoma cell lines. *J Neurooncol.* 99(2):201-7.

Sawa H, Murakami H, Kumagai M, Nakasato M, Yamauchi S, Matsuyama N, Tamura Y, Satone A, Ide W, Hashimoto I, Kamada H (2004) Histone deacetylase inhibitor, FK228, induces apoptosis and suppresses cell proliferation of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Acta Neuropathol.* 107(6):523-31.

Sawamura D, Li K, Chu ML, Uitto J (1991) Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J Biol Chem.* 266(27):17784-90.

Schmelz M, Franke WW (1993) Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *Eur J Cell Biol.* 61(2):274-89.

Schultz RM, Merriman RL, Andis SL, Bonjouklian R, Grindey GB, Rutherford PG, Gallegos A, Massey K, Powis G (1995) In vitro and in vivo antitumor activity of the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor, wortmannin. *Anticancer Res.* 15(4):1135-9.

Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA, Wright MW (2006) New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol.* 174(2):169-74.

Siegelin MD, Raskett CM, Gilbert CA, Ross AH, Altieri DC (2010) Sorafenib exerts anti-glioma activity in vitro and in vivo. *Neurosci Lett.* 478(3):165-70.

Simon JM, Toubiana T, Lang P, Taillibert S, Mazon JJ (2005) [Radiotherapy for glioblastomas: from radiobiology to concomitant chemotherapy]. *Cancer Radiother.* 9(5):322-31.

Sin WC, Chen XQ, Leung T, Lim L (1998) RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. *Mol Cell Biol.* 18(11):6325-39.

Skerrow CJ, Matoltsy AG (1974) Isolation of epidermal desmosomes. *J Cell Biol.* 63(2 Pt 1):515-23.

Skoufias DA, Wilson L (1992) Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry.* 31(3):738-46.

Song S, Landsbury A, Dahm R, Liu Y, Zhang Q, Quinlan RA (2009) Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *J Clin Invest.* 119(7):1837-48.

Soomets U, Lindgren M, Gallet X, Hällbrink M, Elmquist A, Balaspiri L, Zorko M, Pooga M, Brasseur R, Langel U (2000) Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta.* 1467(1):165-76.

Stanley JR, Alvarez OM, Bere EW Jr, Eaglstein WH, Katz SI (1981) Detection of basement membrane zone antigens during epidermal wound healing in pigs. *J Invest Dermatol.* 77(2):240-3.

Stearns T, Evans L, Kirschner M (1991) Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell.* 65(5):825-36.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 15(4):356-62.

Steffen W, Smith D, Simmons R, Sleep J (2001) Mapping the actin filament with myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(26):14949-54.

Strawn LM, Kabbavar F, Schwartz DP, Mann E, Shawver LK, Slamon DJ, Cherrington JM (2000) Effects of SU101 in combination with cytotoxic agents on the growth of subcutaneous tumor xenografts. *Clin Cancer Res.* 6(7):2931-40.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352(10):987-96.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):459-66.

Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, Ruoslahti E (2010) Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science.* 328(5981):1031-5.

Sun GY, Leung BS (1974) Phospholipids and acyl groups of subcellular membrane fractions from human intracranial tumors. *J Lipid Res.* 15(4):423-31.

Sunayama J, Sato A, Matsuda K, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C (2012) Dual blocking of mTor and PI3K elicits a prodifferentiation effect on glioblastoma stem-like cells. *Neuro-Oncology.* 12:1205–1219.

Swindell CS, Krauss NE, Horwitz SB, Ringel I (1991) Biologically active taxol analogues with deleted A-ring side chain substituents and variable C-2' configurations. *J Med Chem.* 34(3):1176-84.

Szeto HH, Schiller PW, Zhao K, Luo G (2005) Fluorescent dyes alter intracellular targeting and function of cell-penetrating tetrapeptides. *FASEB J.* 19(1):118-20.

Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WH, Lim YP, Lane EB (2008) The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat.* 29(3):351-60.

Takahashi M, Iwasaki S, Kobayashi H, Okuda S, Murai T, Sato Y (1987) Rhizoxin binding to tubulin at the maytansine-binding site. *Biochim Biophys Acta.* 926(3):215-23.

Takamiya Y, Brem H, Ojeifo J, Mineta T, Martuza RL (1994) AGM-1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Neurosurgery.* 34(5):869-75; discussion 875.

Tang DD (2008) Intermediate filaments in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294(4):C869-78.

Ter Haar E, Kowalski RJ, Hamel E, Lin CM, Longley RE, Gunasekera SP, Rosenkranz HS, Day BW (1996) Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. *Biochemistry.* 35(1):243-50.

Thiessen B, Stewart C, Tsao M, Kamel-Reid S, Schaiquevich P, Mason W, Easaw J, Belanger K, Forsyth P, McIntosh L, Eisenhauer E (2010) A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 65(2):353-61.

Thomas FC, Taskar K, Rudraraju V, Goda S, Thorsheim HR, Gaasch JA, Mittapalli RK, Palmieri D, Steeg PS, Lockman PR, Smith QR (2009) Uptake of ANG1005, a novel paclitaxel derivative, through the blood-brain barrier into brain and experimental brain metastases of breast cancer. *Pharm Res.* 26(11):2486-94.

Thorén PE, Persson D, Isakson P, Goksör M, Onfelt A, Nordén B (2003) Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 307(1):100-7.

Tian X, Ye J, Alonso-Basanta M, Hahn SM, Koumenis C, Dorsey JF (2011) Modulation of CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)-dependent DR5 expression by nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Biol Chem.* 286(33):29408-16.

Tolstonog GV, Wang X, Shoeman R, Traub P (2000) Intermediate filaments reconstituted from vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein selectively bind repetitive and

mobile DNA sequences from a mixture of mouse genomic DNA fragments. *DNA Cell Biol.* 19(11):647-77.

Tolstonog GV, Mothes E, Shoeman RL, Traub P (2001) Isolation of SDS-stable complexes of the intermediate filament protein vimentin with repetitive, mobile, nuclear matrix attachment region, and mitochondrial DNA sequence elements from cultured mouse and human fibroblasts. *DNA Cell Biol.* 20(9):531-54.

Torchilin VP (2007) Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* 24(1):1-16.

Tosi G, Costantino L, Rivasi F, Ruozi B, Leo E, Vergoni AV, Tacchi R, Bertolini A, Vandelli MA, Forni F (2007) Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. *J Control Release.* 122(1):1-9.

Toso RJ, Jordan MA, Farrell KW, Matsumoto B, Wilson L (1993) Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine. *Biochemistry.* 32(5):1285-93.

Trikalitis PN, Rangan KK, Bakas T, Kanatzidis MG (2001) Varied pore organization in mesostructured semiconductors based on the $[\text{SnSe}_4]^{4-}$ anion. *Nature.* 410(6829):671-5.

Trovik J, Wik E, Stefansson IM, Marcickiewicz J, Tingulstad S, Staff AC, Njolstad TS; MoMaTec Study Group, Vandenput I, Amant F, Akslen LA, Salvesen HB (2011) Stathmin overexpression identifies high-risk patients and lymph node metastasis in endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 17(10):3368-77.

Tsuruo T, Oh-hara T, Iida H, Tsukagoshi S, Sato Z, Matsuda I, Iwasaki S, Okuda S, Shimizu F, Sasagawa K, Fukami M, Fukuda K, Arakawa M (1986) Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines. *Cancer Res.* 46(1):381-5.

Tünnemann G, Martin RM, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F, Cardoso MC (2006) Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J.* 20(11):1775-84.

Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J (2009) Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *Eur J Pharm Biopharm.* 71(2):251-6.

Unterkircher T, Cristofanon S, Vellanki SH, Nonnenmacher L, Karpel-Massler G, Wirtz CR, Debatin KM, Fulda S (2011) Bortezomib primes glioblastoma, including glioblastoma stem cells, for TRAIL by increasing tBid stability and mitochondrial apoptosis. *Clin Cancer Res.* 17(12):4019-30.

Vallee RB, McKenney RJ, Ori-McKenney KM (2012) Multiple modes of cytoplasmic dynein regulation. *Nat Cell Biol.* 14(3):224-30.

van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben Hassel M, Schraub S, Hoang-Xuan K, Malmström PO, Collette L, Piérart M, Mirimanoff R, Karim AB; EORTC Radiotherapy and Brain Tumor Groups and the UK Medical Research Council (2005) Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. 366(9490):985-90.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 17(1):98-110.

Visnyei K, Onodera H, Damoiseaux R, Saigusa K, Petrosyan S, De Vries D, Ferrari D, Saxe J, Panosyan EH, Masterman-Smith M, Mottahedeh J, Bradley KA, Huang J, Sabatti C, Nakano I, Kornblum HI (2011) A molecular screening approach to identify and characterize inhibitors of glioblastoma stem cells. *Mol Cancer Ther*. 10(10):1818-28.

Vivès E, Brodin P, Lebleu B (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. 272(25):16010-7.

von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Hoell T, Chung RY, Martuza RL, Schoenfeld DA, Yaşargil MG, Wiestler OD, Seizinger BR (1992) Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 77(2):295-301.

von Schoultz E, Lundblad D, Bergh J, Grankvist K, Henriksson R (1988) Estramustine binding protein and anti-proliferative effect of estramustine in human glioma cell lines. *Br J Cancer*. 58(3):326-9.

Wang Q, Shoeman R, Traub P (2000) Identification of the amino acid residues of the amino terminus of vimentin responsible for DNA binding by enzymatic and chemical sequencing and analysis by MALDI-TOF. *Biochemistry*. 2000 Jun 6;39(22):6645-51.

Wang MY, Lu KV, Zhu S, Dia EQ, Vivanco I, Shackelford GM, Cavenee WK, Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS (2006) Mammalian target of rapamycin inhibition promotes response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells. *Cancer Res*. 66(16):7864-9.

Wang W, Sumiyoshi H, Yoshioka H, Fujiwara S (2006) Interactions between epiplakin and intermediate filaments. *J Dermatol*. 2006 Aug;33(8):518-27.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*. 93(9):2325-7.

Warwick OH, Darte JM, Brown TC, Beer CT, Cutts JH, Noble RL. (1960) Some biological effects of Vincalukoblastine, an alkaloid in *Vinca rosea* Linn in patients with malignant disease. *Cancer Res.* 20:1032-40.

Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997) Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res.* 3(4):523-30.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(5):1858-62.

Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 359(5):492-507.

Wen PY, Prados M, Schiff D, Reardon DA, Cloughesy T, Mikkelsen T, Batchelor T, Drappatz J, Chamberlain MC, De Groot JF (2010) Phase II study of XL184 (BMS 907351), an inhibitor of MET, VEGFR2, and RET, in patients (pts) with progressive glioblastoma (GB). *J Clin Oncol.* 28:15s.

West LM, Northcote PT, Battershill CN (2000) Peloruside A: a potent cytotoxic macrolide isolated from the new zealand marine sponge *Mycale* sp. *J Org Chem.* 65(2):445-9.

Wiche G, Krepler R, Artlieb U, Pytela R, Aberer W (1984) Identification of plectin in different human cell types and immunolocalization at epithelial basal cell surface membranes.

Wick W, Puduvalli VK, Chamberlain MC, van den Bent MJ, Carpentier AF, Cher LM, Mason W, Weller M, Hong S, Musib L, Liepa AM, Thornton DE, Fine HA (2010) Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J Clin Oncol.* 28(7):1168-74.

Wick W, Weller M, Weiler M, Batchelor T, Yung AW, Platten M (2011) Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro Oncol.* 13(6):566-79.

Wiedemeyer WR, Dunn IF, Quayle SN, Zhang J, Chheda MG, Dunn GP, Zhuang L, Rosenbluh J, Chen S, Xiao Y, Shapiro GI, Hahn WC, Chin L (2010) Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(25):11501-6.

Worman HJ (2012) Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol.* 226(2):316-25.

Xia S, Li Y, Rosen EM, Lattera J (2007) Ribotoxic stress sensitizes glioblastoma cells to death receptor induced apoptosis: requirements for c-Jun NH2-terminal kinase and Bim. *Mol Cancer Res.* 5(8):783-92.

Xie Z, Guan H, Chen X, Lu C, Chen L, Hu X, Shi Q, Jing X (2007) A novel polymer-paclitaxel conjugate based on amphiphilic triblock copolymer. *J Control Release.* 117(2):210-6.

- Xu Z, Marszalek JR, Lee MK, Wong PC, Folmer J, Crawford TO, Hsieh ST, Griffin JW, Cleveland DW (1996) Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. *J Cell Biol.* 133(5):1061-9.
- Yamanaka R (2008) Cell- and peptide-based immunotherapeutic approaches for glioma. *Trends Mol Med.* 14(5):228-35.
- Yamasaki H, Itakura C, Mizutani M (1991) Hereditary hypotrophic axonopathy with neurofilament deficiency in a mutant strain of the Japanese quail. *Acta Neuropathol.* 82(6):427-34.
- Yamasaki H, Bennett GS, Itakura C, Mizutani M (1992) Defective expression of neurofilament protein subunits in hereditary hypotrophic axonopathy of quail. *Lab Invest.* 66(6):734-43.
- Yang F, Brown C, Buettner R, Hedvat M, Starr R, Scuto A, Schroeder A, Jensen M, Jove R (2010) Sorafenib induces growth arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the dephosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3. *Mol Cancer Ther.* 9(4):953-62.
- Yang FY, Teng MC, Lu M, Liang HF, Lee YR, Yen CC, Liang ML, Wong TT (2012) Treating glioblastoma multiforme with selective high-dose liposomal doxorubicin chemotherapy induced by repeated focused ultrasound. *Int J Nanomedicine.* 7:965-74.
- Yang JT, Wu CS, Martinez HM (1986) Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 130:208-69.
- Yang X, Wang J, Liu C, Grizzle WE, Yu S, Zhang S, Barnes S, Koopman WJ, Mountz JD, Kimberly RP, Zhang HG (2005) Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Am J Pathol.* 167(3):705-19.
- Yates DM, Manser C, De Vos KJ, Shaw CE, McLoughlin DM, Miller CC (2009) Neurofilament subunit (NFL) head domain phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *Eur J Cell Biol.* 88(4):193-202.
- Yong WP, Innocenti F, Ratain MJ (2006) The role of pharmacogenetics in cancer therapeutics. *Br J Clin Pharmacol.* 62(1):35-46.
- Yoshida D, Cornell-Bell A, Piepmeier JM (1994) Selective antimetabolic effects of estramustine correlate with its antimicrotubule properties on glioblastoma and astrocytes. *Neurosurgery.* 34(5):863-7; discussion 867-8.
- Yukawa H, Kagami Y, Watanabe M, Oishi K, Miyamoto Y, Okamoto Y, Tokeshi M, Kaji N, Noguchi H, Ono K, Sawada M, Baba Y, Hamajima N, Hayashi S (2010) Quantum dots labeling using octa-arginine peptides for imaging of adipose tissue-derived stem cells. *Biomaterials.* 31(14):4094-103.

- Yun J, Sonabend AM, Ulasov IV, Kim DH, Rozhkova EA, Novosad V, Dashnaw S, Brown T, Canoll P, Bruce JN, Lesniak MS (2012) A novel adenoviral vector labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles for real-time tracking of viral delivery. *J Clin Neurosci.* 19(6):875-80.
- Yung WK, Vredenburgh JJ, Cloughesy TF, Nghiemphu P, Klencke B, Gilbert MR, Reardon DA, Prados MD (2010) Safety and efficacy of erlotinib in first-relapse glioblastoma: a phase II open-label study. *Neuro Oncol.* 12(10):1061-70.
- Ziegler A (2008) Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(4-5):580-97.
- Zhang CC, Yang JM, Bash-Babula J, White E, Murphy M, Levine AJ, Hait WN (1999) DNA damage increases sensitivity to vinca alkaloids and decreases sensitivity to taxanes through p53-dependent repression of microtubule-associated protein 4. *Cancer Res.* 59(15):3663-70.
- Zhang P, Hu L, Yin Q, Feng L, Li Y (2012) Transferrin-Modified c[RGDfK]-Paclitaxel Loaded Hybrid Micelle for Sequential Blood-Brain Barrier Penetration and Glioma Targeting Therapy. *Mol Pharm.* 9(6):1590-8.
- Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* 378(6557):578-83.
- Zhu H, Woolfenden S, Bronson RT, Jaffer ZM, Barluenga S, Winssinger N, Rubenstein AE, Chen R, Charest A (2010) The novel Hsp90 inhibitor NXD30001 induces tumor regression in a genetically engineered mouse model of glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Ther.* 9(9):2618-26.
- Zhu Q, Couillard-Després S, Julien JP (1997) Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol.* 148(1):299-316.
- Zochodne DW, Sun HS, Cheng C, Eyer J. (2004) Accelerated diabetic neuropathy in axons without neurofilaments. *Brain.* 127(Pt 10):2193-200.
- Zorko M, Langel U (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 57(4):529-45.
- Zou X, Conradsson T, Klingstedt M, Dadachov MS, O'Keeffe M (2005) A mesoporous germanium oxide with crystalline pore walls and its chiral derivative. *Nature.* 437(7059):716-9.

Thèse de Doctorat

Julien Balzeau

Utilisation de peptides dérivés des filaments intermédiaires pour leurs propriétés antitumorales et de ciblage des cellules de gliome

Résumé

Les travaux du laboratoire ont montré que les filaments intermédiaires, qui forment un des trois éléments essentiels du cytosquelette, peuvent lier la tubuline sur des sites spécifiques appelés TBS (Tubulin-Binding Site). Certains peptides correspondant à ces séquences sont capables d'inhiber *in vitro* la polymérisation des microtubules (MT). Les travaux présentés dans cette thèse consistent à poursuivre la caractérisation structurale et fonctionnelle de ces peptides. Ainsi, il a été possible de montrer qu'un peptide issu de la vimentine, Vim-TBS.58-81, est capable de rentrer dans les cellules de glioblastome humain T98G et de se localiser au niveau nucléaire. Une fois couplé à un peptide pro-apoptotique agissant au niveau nucléaire, il est capable d'inhiber la prolifération de ces cellules. Un autre peptide issu de la sous-unité légère des neurofilaments, NFL-TBS.40-63, est capable de rentrer dans toutes les lignées de gliome testées jusque-là, de déstabiliser leur réseau de MT et d'inhiber leur prolifération et leur migration sans affecter les cellules saines du cerveau (astrocytes et neurones). Injecté par stéréotaxie en intra tumoral chez des rats porteurs d'un gliome F98, ce peptide ralentit la croissance de la tumeur et reste localisé dans le tissu tumoral. Une analyse structure/fonction de ce peptide a mis en évidence des structures secondaires de type feuillet β et hélice α . Après greffage à la surface de nanocapsules lipidiques (NCL), ce peptide permet également l'amélioration de leur entrée dans les cellules de gliome *in vitro* et *in vivo*. Enfin, des NCL contenant du Paclitaxel ou du Ferrociphénol et recouvertes de peptide NFL-TBS.40-63 se sont révélées plus efficaces dans l'inhibition de la croissance tumorale dans un modèle de souris porteuse d'un gliome GL261 et dans un modèle de rat porteur d'un gliome 9L respectivement. L'ensemble de ces travaux révèle de nouvelles fonctions de ciblage et de pénétration cellulaire pour des peptides issus de filaments intermédiaires.

Mots clés

glioblastome, cytosquelette, microtubules, cell-penetrating peptides, nanocapsules lipidiques

Abstract

Works of our laboratory demonstrated that intermediate filaments, which are one of the three cytoskeleton elements, can bind tubulin dimers in specific sites named TBS (Tubulin-Binding Site). Some of these peptides corresponding to TBS sequences can inhibit *in vitro* tubulin polymerization in microtubules (MT). Works in this thesis consist of continuing the structural and functional characterization of these peptides. Thus, it has been possible to show that one of these peptides from vimentin protein, Vim-TBS.58-81, is able to enter in T98G human glioblastoma cells and to localize in the nucleus of the cells. When coupled to a pro-apoptotic peptide acting in the nuclear compartment, it is able to inhibit cell proliferation. Another peptide from the light neurofilament subunit, NFL-TBS.40-63, is able to enter in many glioma cell lines, to destabilize MT network and to inhibit cell proliferation and migration without affecting healthy cells of the brain (astrocytes and neurons). Injected by stereotaxy in the tumour of rat bearing F98 glioma, this peptide reduces glioma growth and stays localized in tumour tissue. A structural/functional analyze of this peptide highlights some secondary structures, β -sheet and α -helix. After grafting on lipid nanocapsules (LNC) surface, this peptide enhances their entrance in glioma cells *in vitro* and *in vivo*. Finally, LNC containing Paclitaxel or Ferrociphenol and grafted with NFL-TBS.40-63 peptide appeared to be more efficient to inhibit tumour growth in mice bearing GL261 glioma and in rat bearing 9L glioma respectively. All of this work presents new functions of targeting and cellular penetration for peptides from intermediate filaments.

Key Words

glioblastoma, cytoskeleton, microtubules, cell-penetrating peptides, lipid nanocapsules