



HAL
open science

Conception, synthèse et purification d'analogues de molécules de venin animal à action inhibitrice des cellules

Wassim Moslah

► To cite this version:

Wassim Moslah. Conception, synthèse et purification d'analogues de molécules de venin animal à action inhibitrice des cellules. Sciences du Vivant [q-bio]. AMU - Aix Marseille Université, 2022. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-04887349⟩

HAL Id: tel-04887349

<https://amu.hal.science/tel-04887349v1>

Submitted on 14 Jan 2025

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.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Université de Tunis ElManar
Dans le cadre d'une cotutelle avec l'université Aix-Marseille
le 27 septembre 2022 par

Wassim Moslah

**Conception, synthèse et purification d'analogues de molécules de
venin animal à action inhibitrice des cellules**

Discipline

Biologie santé

Spécialité

Oncologie

École doctorale

ED 62 : Science de la vie et de la santé

Laboratoire/Partenaires de recherche

Institut de neurophysiopathologie de
l'université Aix-Marseille/ Laboratoire
des biomolécules, venins et applications
théranostique de l'institut Pasteur de
Tunis/ institut de chimie radicalaire de
l'université Aix-Marseille

Composition du jury

Pr. Maxime LEHMANN	Rapporteur
Faculté de Pharmacie de Strasbourg	
Pr. Imed REGAYA	Rapporteur
ISSTE, université de Carthage	
Pr. Erwann LORET	Examineur
IMBE, université Aix-Marseille	
Pr. Raja MARRAKCHI	Présidente du jury
FST, université de Tunis Elmanar	
Pr. José LUIS	Directeur de thèse
INP, Université Aix-Marseille	
Pr. Najet SRAIRI-ABID	Co-directrice de thèse
Institut Pasteur de Tunis	
Dr. Kamel Mabrouk	Membre invité
ICR, Université Aix-Marseille	

Affidavit

Je soussigné, Wassim Moslah, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Pr. José Luis et la Pr. Najet Srairi-Abid, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Tunis, le 04 juillet 2022

MOSLAH



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

Strengthening Anti-Glioblastoma Effect by Multi-Branched Dendrimers Design of a Scorpion Venom Tetrapeptide

Wassim Moslah, Dorra Aissaoui-Zid, Soioulati Aboudou, Zaineb Abdelkafi-Koubaa, Marie Potier-Cartereau, Aude Lemettré, Ines ELBini-Dhouib, Naziha Marrakchi, Didier Gignes, Christophe Vandier, José Luis, Kamel Mabrouk, Najet Srairi-Abid.

AaTs-1: A Tetrapeptide from Androctonus australis Scorpion Venom, Inhibiting U87 Glioblastoma Cells Proliferation by p53 and FPRL-1 Up-Regulations

Dorra Aissaoui-Zid, Mohamed-Chiheb Saada, **Wassim Moslah**, Marie Potier-Cartereau, Aude Lemettré, Houcemeddine Othman, Marc Gaysinski, Zaineb Abdelkafi-Koubaa, Soumaya Souid, Naziha Marrakchi, Christophe Vandier, Khadija Essafi-Benkhadir, Najet Srairi-Abid.

2) Participation aux conférences et école d'été au cours de la période de thèse :

2016 Participation à la première édition du colloque jeune chercheur de l'institut Pasteur de Tunis.

2018 Participation et organisation de la deuxième édition du colloque jeune chercheur de l'institut Pasteur de Tunis.

2019 Participation à l'évènement organisé par le projet Inspire intitulé 'Ecole du printemps Inspires (renforcer les liens entre chercheurs et la société)'.

2019 Séminaire annuel du Cancéropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur, saint Raphaël Communication affichée 'Conception of new peptides based on sequence of antitumoral peptide from Tunisian scorpion venom'.

Résumé

Le glioblastome multiforme (GBM) demeure le cancer le plus agressif des cancers du cerveau. Malgré les progrès réalisés durant les dernières décennies dans la compréhension de la pathogenèse du GBM, les thérapies disponibles ne sont pas efficaces vis à vis de la malignité de la maladie, d'où la nécessité de trouver de nouveaux traitements plus efficaces. Dans ce contexte, l'exploitation du venin de scorpion tunisien *Androctonus australis hector* a permis d'isoler deux molécules de petites tailles dotées d'activités anticancéreuses sur les cellules U87 du glioblastome. La première molécule, nommée H8, agit sur la migration de ces cellules. L'exploration de la structure de ce peptide a donné 5 séquences possibles que nous avons synthétisées et testé leurs effets sur ces mêmes cellules. Un, parmi les cinq peptides synthétisés, a montré une activité proche du peptide natif mais toujours moins efficace. Ainsi nous avons conclu qu'aucune des molécules synthétisées ne correspond à H8. La deuxième molécule, nommé AaTs-1, est un tetrapeptide qui possède une activité antiproliférative sur les cellules U87 avec une IC50 de l'ordre de 0,5 mM. Afin d'augmenter l'efficacité de ce tetrapeptide, nous avons modifié sa structure en synthétisant des dendrimères multi-branchés AaTs-1-2B, AaTs-1-4B et AaTs-1-8B. Tous les dendrimères synthétisés ont montré une meilleure activité, qui augmente avec le nombre des branches, sur la prolifération des cellules U87. Fait intéressant, les dendrimères AaTs-1-4B et AaTs-1-8B ont aussi montré un effet inhibiteur sur la migration des cellules U87. L'étude du mécanisme d'action de AaTs-1-8B a montré qu'il agit en diminuant le taux calcique intracellulaire et en augmentant la phosphorylation des protéines ERK1/2 et AKT et l'expression de P53.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) remains the most aggressive brain cancers. Despite the progress made in recent decades in understanding the pathogenesis of GBM, the available therapies are not effective against the malignancy of the disease, hence the need to find new and more effective treatments. In this context, the screening of the Tunisian scorpion venom *Androctonus australis Hector* has allowed the identification of two small molecules with anticancer activities on U87 glioblastoma cells. The first native molecule, named H8, acts on the migration of these cells. Structural characterization of this peptide yielded 5 possible sequences that we synthesized and tested for their effects on the same cell line. One of the five peptides synthesized showed activity close to the native peptide but still less effective. Thus, we concluded that none of the molecules synthesized corresponds to H8. The second molecule, called AaTs-1, is a tetrapeptide that has an antiproliferative activity on U87 cells with an IC₅₀ of 0.5 mM. In order to increase the efficiency of this tetrapeptide we modified its structure by synthesizing multi-branched dendrimers AaTs-1-2B, AaTs-1-4B and AaTs-1-8B. All synthesized dendrimers have shown better activity, which increases with the number of branches, on the proliferation of U87 cells. Interestingly, the dendrimers AaTs-1-4B and AaTs-1-8B also showed an inhibitory effect on the migration of the U87 cells. The study of the mechanism of action of AaTs-1-8B showed that it acts by decreasing intracellular calcium levels and increasing phosphorylation of ERK1/2 and AKT proteins and P53 protein expression.

Dédicace

Je dédie ces travaux de recherches

*À la personne qui me manque le plus mon cher père **Abbes MOSLAH**, car ce travail est le fruit de ses sacrifices qu'il m'a consentis pour mon éducation et ma formation,*

*À ma chère mère **Fathia SELLOUETI**, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être,*

*À mon frère **Yassine MOSLAH**, son épouse **Maha ABDELADHIM**, ma sœur **Nesrine MOSLAH** et son époux **Charfeddine KROUNA**, en témoignage des liens solides et intimes qui nous unissent et qui donne toujours du sens et du goût à notre vie de famille,*

À tous mes oncles, mes tantes et toute ma famille auxquels je témoigne mon grand respect et ma grande reconnaissance. Merci pour vos encouragements,

À tous mes amis et mes collègues pour leur soutien moral et les moments inoubliables que nous avons partagé ensemble pendant ce cursus,

À mes professeurs de la licence fondamentale en science de la vie et du master en physiologie appliquée et physiopathologie, pour la formation enrichissante au quelle j'ai eu la chance d'assister,

À mes amis qui me sont chers,

Et enfin à toute personne qui a contribué à la réalisation de cette thèse de doctorat

Remerciement

Qu'il me soit permis de présenter ici mes remerciements aux personnes qui ont rendu possible le présent projet et qui ont contribué à son élaboration sous quelques formes que ce soit.

*Un grand merci à **Pr. SRAIRI-ABID Najet**, biologiste principale et cheffe du laboratoire des Biomolécules, Venins et Applications Théranostiques à l'institut Pasteur de Tunis, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui m'a encadré et guidé tout au long de mes travaux doctoral. Je voudrais saluer l'engagement et la disponibilité dont elle a fait preuve et qui m'ont permis d'avancer plus efficacement dans mes travaux de recherche.*

*J'adresse mes remerciements au **Pr. LUIS José**, Professeur au sein de l'institut de neurophysiopathologie de la faculté de médecine à l'université Aix-Marseille qui m'a encadré et guidé tout au long de ma thèse. Je voudrais saluer l'engagement et la disponibilité dont il a fait preuve et qui m'ont permis d'avancer plus efficacement dans mes travaux de recherche.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance au **DR. MABROUK Kamel**, docteur à l'institut de chimie radicalaire de l'université Aix-Marseille de m'avoir accueilli au sein de son équipe de m'avoir encadré dans le volet chimique de mes travaux de recherche.*

*Je tiens également à remercier **Pr. MARRAKCHI Raja**, Professeur à l'université de Tunis ElManar, **Pr. LEHMANN Maxime**, Professeur Université de Strasbourg, **Pr. REGAYA Imed**, professeur à l'université de Carthage et **PR. LORET Erwann**, Professeur à l'université Aix-Marseille qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger le présent travail et d'avoir consacré de leur temps pour son évaluation.*

*Je remercie également **Pr. MARRAKCHI Naziha**, professeur au sein du laboratoire des Biomolécules, Venins et Applications Théranostiques de l'institut Pasteur de Tunis pour son aide et pour l'attention qu'elle a apporté à ce travail durant tout mon cursus doctoral.*

*Je souhaite remercier **Dr. AISSAOUI Dorra**, postdoctorante au sein du laboratoire des Biomolécules, Venins et Applications Théranostiques de l'institut Pasteur de Tunis pour son aide précieuse et son implication importante dans la réalisation de ma thèse de doctorat.*

*Mes remerciements sont également adressés au **Pr. Ben Khadir-ESSAFI khadija**, biologiste principale au laboratoire d'Epidémiologie moléculaire et pathologie expérimentale appliquée aux maladies infectieuses l'Institut Pasteur de Tunis, pour leur collaboration pour la réalisation de ce travail.*

Je remercie Pr. GUIZENI TABBANE Lamia, biologiste principal au laboratoire de Parasitologie médicale, biotechnologie et biomolécules de l'Institut Pasteur de Tunis, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis de travailler dans son équipe.

Un grand merci au Dr. SAADA Mohamed Chiheb, Dr. ELBINI-Dhouib et Dr. ABDELKAFI-KOUBAA Zaineb pour leurs contributions dans la réalisation de ces travaux.

J'exprime des chaleureux remerciement au Dr. JEBALI Jed, Mme ABOUDOU Soioulat, Mme BOUABID cyrine, Mme BICHIOU Haifa, Mme MAGHRBI Olfa, Mr. BEN CHEIKH Ali, Mme YAAKOUBI Roukaya, Mme BCHIRI Soumaya et Mme GONZALEZ GARCIA Maria Cecilia pour leurs soutient permanent tout au long de mon cursus doctoral. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude pour les agréables moments passés ensemble.

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire des Biomolécules, venins et applications theranostiques, les membres de l'institut de neurophysiopathologie de l'université Aix-Marseille et l'institut de chimie radicalaire de l'université Aix-Marseille et une pensée particulière à Cyrine, Sayda, Sonia, Kaouther, Slim, Maram, Chedli, Faten, Amen-Allah, Thouraya, Rym, Asma, Wided et Walid et tous les stagiaires qui sont passé par le laboratoire durant ces six dernières années pour le soutien moral et l'amitié que nous avons noué lors de ces années doctorales.

Enfin, mes remerciements vont à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour mener à terme ces travaux de recherche.

Table des matières

Liste de publications et participation aux conférences.....	3
Introduction générale.....	1
<i>Chapitre I : Le Cancer</i>	4
I.1 Définition.....	4
I.2 L'Oncogenèse.....	4
I.3 Les caractéristiques du cancer.....	5
I.3.1 Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération.....	6
I.3.2 Insensibilité aux inhibiteurs de croissance cellulaire.....	6
I.3.3 Echappement aux mécanismes de mort cellulaire.....	7
I.3.4 Immortalité cellulaire.....	7
I.3.5 Induction de l'angiogenèse.....	8
I.3.6 Métastases et invasion tissulaire.....	8
I.3.7 Instabilité génomique et mutations.....	9
I.3.8 Reprogrammation du métabolisme énergétique.....	9
I.3.9 Induction de l'inflammation tumorale.....	10
I.3.10 Echappement au système immunitaire.....	10
I.3.11 Le déblocage de la plasticité phénotypique.....	11
I.3.12 La reprogrammation épigénétique non mutationnelle.....	12
I.3.13 Les microbiomes polymorphes.....	12
I.3.14 Les cellules sénescents.....	13
I.4 Les différents types du cancer.....	13
I.5 Les tumeurs cérébrales primaires.....	14
I.5.1 Définition.....	14
I.5.2 Les gliomes.....	14
I.5.3 Le glioblastome.....	16
<i>Chapitre II : Les venins de scorpions et leurs activités biologiques</i>	29
III. 1. Mode d'action des toxines de scorpion.....	29
III.1.1 Interaction avec les canaux sodium.....	31
III.1.2 Interaction avec les canaux potassiques.....	31
III.1.3 Interaction avec les canaux calciques.....	33
III.1.4 Interaction avec les canaux chlore.....	34
III.2 Implication des canaux ioniques dans la cancérogenèse.....	35
III.3 Activités anti cancéreuses des toxines de scorpion.....	36
III.3.1 Inhibition des voies d'angiogenèse et de la formation des métastases.....	36
III.3.2 Inhibition de la prolifération cellulaire et induction de l'apoptose.....	37
<i>Chapitre III : Conception de substance pharmacologiquement active</i>	40
IV.1 Introduction.....	40
IV.2 Les dendrimères.....	41
IV.2.1 Définition.....	41
IV.2.3 Les différents types de dendrimères.....	42
IV.2.4 Propriétés des dendrimères.....	45
IV.2.5 Les applications biomédicales des dendrimères.....	46
Contexte et objectifs du travail.....	50
I. Matériels biologiques.....	52
II. Extraction du venin de scorpion <i>Androctonus australis hector</i>	52

III. Méthodes chromatographiques de purification	52
III.1 Chromatographie liquide à basse pression en exclusion stérique	52
III.2 Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) en échange d'ions	53
III.3 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse.....	53
IV. Dosage protéique par la méthode BCA.....	54
V. Synthèse peptidique sur support solide.....	54
V.1 Liaison du premier acide aminé à la résine.....	55
V.2 Déprotection	55
V.3 Couplage.....	56
V.4 Acétylation	56
V.5 Clivage final	57
V.6 Oxydation des fonctions thiols.....	57
VI. La spectrométrie de masse	57
VII. Les tests biologiques	58
VII.1 Culture cellulaire	58
VII.2 Test de cytotoxicité : dosage de l'activité enzymatique du lactate déshydrogénase (LDH).....	58
VII.3 Test de viabilité et prolifération.....	59
VII.4. Test d'adhésion	59
VII.5. Test de migration cellulaire en chambre de Boyden	60
VII.6 Migration par vidéomicroscopie	61
VII.7 Dosage des espèces réactives de l'oxygène.....	61
VII.8 Western blot	62
VII.8.1 Préparation des lysats cellulaires.....	62
VII.8.2 SDS-PAGE et électro-transfert sur membrane.....	62
VII.8.3 Marquage des protéines et révélation.....	62
VII.9 Dosage du relargage calcique	63
VII.10 Test de toxicité <i>in vivo</i>	63
Chapitre I : Recherche, purification et caractérisation de molécules de faible masse moléculaire issues de venin du scorpion <i>Androctonus australis</i> , actives sur les cellules de glioblastome	65
I.1 Criblage de la fraction de faible masse moléculaire du venin de scorpion.....	65
Aa et purification de molécules actives sur le glioblastome	65
I.1.1 Chromatographie liquide à basse pression en exclusion stérique	65
I.1.2 Effet de la fraction M3 sur la prolifération et la migration des cellules U87	66
I.1.3 Chromatographie rapide (FPLC) par échange d'ions.....	67
I.1.4 Chromatographie à haute pression en phase inverse (RP-HPLC)	69
I.2 Caractérisation structurale de H8	72
I.2.1 Spectrométrie de masse.....	72
I.3 Synthèse des cinq peptides putatifs.....	73
I.4 Effet des peptides synthétisés sur les cellules U87	74
Chapitre II : Conception et synthèse d'analogues du térapeptide AaTs-1 agissant sur la prolifération des cellules U87 de glioblastome	75

II.1 Conception des analogues amidés et acétylés.....	76
II.1.1 Synthèse de AaTs-1 et les analogues amidés et acétylés.....	76
II.1.2 Analyse et purification des peptides synthétisés	77
II.1.3 Tests biologiques	81
II.2. Conception et caractérisation d'un analogue cyclique	84
II.2.1 Synthèse du peptide cyclique.....	85
II.2.2 Oxydation et purification du peptide cyclique.....	86
II.2.3 Effet du peptide cyclique sur la viabilité et la prolifération des cellules U87	88
II.3 Conception des dendrimères multi-branchés.....	89
II.3.1 Synthèse des dendrimères multi-branchés.....	89
II.3.2 Analyse et purification des dendrimères multi-branchés	91
II.3.3 Caractérisation pharmacologique des molécules multi-branchées.....	94

Table des figures

Figure 1: Les caractéristiques des cellules cancéreuses d'après Hanahan et Weinberg 2022	5
Figure 2 : Classification des gliomes diffus selon leurs tissus et les paramètres moléculaires d'après Louis et al., 2016	15
Figure 3 : Coupes histologiques et IRM de glioblastome	16
Figure 6: Principales approches thérapeutiques des patients atteints de glioblastome d'après (Wirsching et al., 2016).....	20
Figure 4 : Implication du calcium dans les caractéristiques des cellules cancéreuses via les canaux et les récepteurs calciques (Amir et al., 2020).....	23
Figure 5: Implication du SOCE dans la progression tumorale	25
Figure 7: Les propriétés du venin de scorpion (Ghosh et al., 2019).....	30
Figure 8 : Interaction entre une toxine de scorpion et un canal potassique.....	32
Figure 9: Alignement des séquences peptidiques des premiers membres de chaque famille des α -KTx (Srairi-Abid et al., 2019).....	33
Figure 10 : Alignement des séquences des peptides MCa, IpTxa, HCa et HdCa actifs sur le canal calcium RYR1 (Srairi-Abid et al., 2019).....	34
Figure 11 : Alignement des séquences peptidiques de la chlorotoxine et de ses homologues chlorotoxin-like (Srairi-Abid et al., 2019).....	35
Figure 13 : Les différents types de dendrimères (Kesharwani et al., 2014).....	43
Figure 14 : Les différentes étapes de la synthèse peptidique	56
Figure 15: Chromatographie sur gel séphadex G-50 du venin de scorpion <i>Androctonus australis hector</i>	65
Figure 16 : Histogramme représentatif de l'effet de la fraction M3 sur la prolifération des cellules U87	66
Figure 17: Effet dose réponse de la fraction M3 sur la migration des cellules U87	67
Figure 18: Chromatographie échangeuse d'ion (FPLC) de la fraction M3.....	68
Figure 19 : Effet des fractions FPLC sur la prolifération (A) et la migration (B) des cellules U87	68
Figure 20 : Chromatographie à haute pression HPLC de la fraction F3.....	69
Figure 21 : Effet de la fraction H9 sur la prolifération des cellules U87.....	70
Figure 22 : Effet des fractions purifiées par chromatographie à haute pression sur la migration des cellules U87	71
Figure 23 : Spectres de masse du peptide H8	72
Figure 24 : Schéma représentatif des peptides synthétisés. A) Peptide GFRS. B) Peptide GFFP amidé. C) Peptide GFSR. D) Peptide GFSGV. E) Peptide GRSF	73
Figure 25 : Effet des peptides synthétisés et du peptide purifié sur la migration des cellules U87 ..	74
Figure 26 : Schéma représentatif des molécules analogues synthétiques de AaTs-1	77
Figure 27 : les spectres de masse des peptides synthétisés.....	78
Figure 28 : Profils HPLC semi-préparatifs des peptides synthétisés	80
Figure 29 : Profils HPLC analytiques des peptides synthétisés	81
Figure 30 : Effet de AaTs-1 synthétique et de ses analogues sur la prolifération des cellules U87...	82
Figure 31 : Effet de AaTs-1 et ses analogues sur l'adhésion des cellules U87.	83
Figure 32 : Effet de AaTs-1 et des analogues sur la migration des cellules U87.....	84
Figure 33 : schéma représentatif du peptide cyclique	86

Figure 34 : Profils de HPLC analytique du peptide cyclique	87
Figure 35 : Spectre de masse du peptide cyclique oxydé.....	88
Figure 36 : Courbe représentative de l'effet du peptide cyclique sur la viabilité des cellules U87 ...	88
Figure 37 : Schémas représentatif des dendrimères multi-branchés	90
Figure 38 : Spectres de masse des molécules multibranchées	92
Figure 39 : Profils HPLC préparatifs des dendrimères multi-branchés	93
Figure 40 : Profils HPLC analytiques des dendrimères multibranchés.....	94
Figure 41 : courbes représentatives des effets de AaTs-1 et les molécules multi-branchées sur la viabilité et la prolifération des cellules U87	95
Figure 42 : Libération de LDH par les cellules U87 traitées par AaTs-1 et ses analogues multi-branchés.....	96
Figure 43 : Effet de l'AaTs-1 et des dendrimères multi-branchés sur la migration des cellules U87.	98
Figure 44 : Effet de l'application aiguë des molécules AaTs-1 et les dendrimères multi-branchés sur le relargage calcique du ER et l'amplitude de SOCE dans les cellules U87	99
Figure 45 : Analyse protéique par Western blot.....	101
Figure 46 : Dosage des espèces réactives de l'oxygène après traitement des cellules U87 avec AaTs-1 et les dendrimères multi-branchés	102

Liste des tableaux

**Tableau 1: Les acides aminés impliqués dans la liaison toxine-canal sodique.Erreur !
Signet non défini.**

**Tableau 2 : les masses molaires théoriques et les masses molaires expérimentales des
peptides synthétisés. 79**

Tableau 3 : Rendement des synthèses des molécules multi-branchées 91

Liste des abréviations

AaCTx	<i>Androctonus australis chlore toxin</i>
2-HG	Hydroglutarate
5-FU	Le 5-fluorouracile
Å	Ångström
Aah	<i>Androctonus australis hector</i>
ACN	Acétonitrile
ADAM21	<i>ADAM Metallopeptidase Domain 21</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Protéine kinase B
AMP	Peptides antimicrobiens
AMPD	Dendrimères peptidiques antimicrobiens
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF3	<i>Activating Transcription Factor 3</i>
ATP	Adénosine-triphosphate
ATRX	<i>Alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked</i>
Bad	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated x protein</i>
BCA	Acide bicinchoninique
Bcl-2	<i>B cell Lymphoma 2</i>
BKCa	<i>Large conductance calcium-activated potassium</i>
BmK AGAP	<i>Neurotoxin BmK AGAP-SYPU2</i>
BmKCT	<i>Chlorotoxin-like peptide</i>
BmP01	Toxine de scorpion BmP01
BSA	Albumine sérum bovine
Ca ²⁺	Ion calcium
Cav	Les canaux Ca ²⁺ à voltage dépendant
CCDL	Canaux calciques voltages indépendants
CCNU	Lomustine
CCR9	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 9</i>
CD53	<i>Leukocyte surface antigen gene</i>
Cdk2	La kinase 2 dépendante de la cycline
ChTX	La charybdotoxine
Cl	Chlore
CIC	Chloride channel
CITx	La chlorotoxine
CPT	La camptothécine
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4</i>
CuSO ₄	Sulfate de cuivre
DAB	Diaminobutane
DBTRG	<i>Denver brain tumor research group</i>
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCF	2'-7'dichlorofluoresceine

DCM	Dichlorométhane
DGA	Acide diglycolamique
DIPEA	N,N-Di-isopropylethylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNC6	<i>Dynactin subunit 6</i>
DO	Densité optique
DOX	Doxorubicine
E2F	Le facteur E2
EBV	Virus <i>d'Epstein-Barr</i>
EDA	Ethylènediamine
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
ERG	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI-Q-TOF	<i>Electrospray Ionization- Quadrupole Time of Flight</i>
FC	Les facteurs de croissance
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbone
Fn	Fibronectine
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FPRL-1	<i>Formyl peptide receptor like-1</i>
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GaTx1	<i>Toxin GaTx1</i>
GBM	Glioblastome multiforme
GIRK	<i>G protein-activated inward rectifier potassium channel (Kir3.1,)</i>
GLUT1	<i>Glucose transporter type 1</i>
GSC	Les cellules souches de glioblastome
Gy	Gray
H	Hydrogène
HA	Hémagglutinine
HBTU	<i>2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate</i>
HBV	Virus de l'hépatite B
HCa	Hemicalcine
HCO ₃ ⁻	Hydrogénocarbonate
HdCa	Hadrucalcine
HIF	Facteur indicible de l'hypoxie
HIV	virus de l'immunodéficience humaine
HMP	4-hydroxyméthylphénol
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPV	<i>Papillomavirus humain</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSV	Virus Herpès simplex

I-	IODE
IbTX	L'Iberiotoxin
IC50	Concentration inhibitrice médiane
ICV	Intracérébro-ventriculaire
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IP3	L'inositol trisphosphate
IP3R	Les récepteurs IP3
IpTxA	Imperatoxine A
IRM	Imagerie par résonance magnétique
J. C.	Jésus Christ
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
K+	Ion potassium
K2P	Canaux potassium à 2 pores
KCl	Chlorure de potassium
Kir	Les canaux à rectification entrante
KTxs	<i>Potassium channel toxin gamma</i>
Kv	<i>Voltage-gated potassium channel</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
LT	Lymphocytes T
LTH	<i>Lymphocytes T helper</i>
m	Masse
M	Mitose
MAP	<i>Multiple antigen peptide</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCa	La Maurocalcine mca
MDSC	Les cellules suppressives dérivées des myéloïdes
MEC	La matrice extracellulaire
MGMT	La O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase
MgTx	La margatoxine
mL	Milli Litre
mM	Milli molaire
MMP	Métalloprotéases
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
MTT	Sel de Tétrazolium
MTX	Le méthotrexate
N	Azote
NADH	Hydru de nicotinamide adénine dinucléotide
Nav	<i>Voltage-gated Sodium channels</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NMP	N-méthyl-2-pyrrolidone
NO-3	Nitrate
NOS	<i>not otherwise specified</i>
O	Oxygène
OMS	Organisation mondiale de santé

ORAI1	<i>Calcium release-activated calcium channel protein 1</i>
P21	Protéine 21
P2X	Les purinorécepteurs
P53	Protéine 53
PAMAM	Les dendrimères polyamido-amine
PBS	Tampon phosphate salin
PBST	Tampon phosphate salin tween
PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand-1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol 3</i>
PKC	La protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-l-lysines
PPI	Les dendrimères polypropylèneimine
pRb	La protéine rétinoblastome
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PTX	Le paclitaxel
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
Pyk2	<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i>
RAF	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
rBmK-CTa	<i>Recombinant chlorotoxin-like peptide</i>
RE	Le réticulum endoplasmique
ROS	Les espèces réactives de l'oxygène
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RP-HPLC	Chromatographie phase Liquide à Haute performance en phase inversée
rpm	Tour par minute
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
RYR1	<i>Ryanodine receptor 1</i>
SCN-	Thiocyanate
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFRT	La radiothérapie stéréotaxique fractionnée
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SIV	Virus de l'immunodéficience simienne
SOCE	<i>Store-operated ca²⁺ entry</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SPPS	Synthèse peptidique en phase solide
SRS	La radiochirurgie stéréotaxique
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STIM1	<i>Stromal Interaction Molecule</i>
SVF	Sérum de veau foetal
t-Bu	t-butyl
TEA	Le tétraéthylammonium
TERT	La transcriptase inverse de la télomérase
TET	<i>Ten Eleven Translocation</i>

TFA	Acide trifluoroacétique
TGF	<i>Transforming Growth factor</i>
TIIS	<i>Tri-Isopropyl Silane</i>
TM	Segments transmembranaires
TMZ	Témозолоide
Tregs	T régulateurs
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPC	Canaux TRP-canoniques
TRPM	TRP-mélastatine
TRPV	TRP-vanilloïdes
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	<i>Von Hippel–Lindau gene</i>
Vn	Vitronectine
z	Charge
α-KG	A-cétoglutarate

Introduction générale

Avec plus de 19 millions nouveaux cas et 10 millions de décès en 2020 par le cancer, cette maladie demeure selon l’OMS la deuxième cause de mortalité mondiale après les maladies cardiovasculaires. Malgré tous les efforts fournis pour la comprendre et la maîtriser, cette maladie reste très agressive et incontrôlée. Les cancers du poumon, du sein, du foie et de l’estomac ainsi que le cancer colorectal, sont les cancers qui causent le plus de décès. Le tabagisme, la consommation excessive d’alcool, l’obésité et la sédentarité sont les facteurs de risque les plus importants pour le développement de cette maladie.

Le cancer est caractérisé par la transformation des cellules saines, acquérant de nouvelles caractéristiques suite à des mutations incontrôlées. Ce processus peut durer plusieurs années, durant lesquelles plusieurs gènes mutés agissent d’une façon directe sur différentes fonctionnalités cellulaires. La viabilité et la migration cellulaire, sont les mécanismes les plus touchés, entraînant une perturbation de l’homéostasie générale des différents tissus (Hanahan et Weinberg 2000).

Depuis des décennies la recherche a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de différents cancers et de maîtriser certains d’entre eux, surtout aux stades primitifs. Malgré ces progrès, plusieurs types de cancers résistent fortement à toutes les thérapies proposées en l’occurrence, la chimiothérapie et la radiothérapie.

C’est le cas du glioblastome multiforme qui est la forme la plus sévère des tumeurs cérébrales. Il se caractérise par une forte résistance aux thérapies proposées et un développement multifactoriel très agressif, réduisant ainsi le pronostic de guérison aux personnes atteintes, avec une espérance de vie qui ne dépasse pas les 15 mois. Le pouvoir invasif des cellules du glioblastome dans les différentes régions cérébrales permet à cette tumeur de récidiver rapidement dans presque 90% des cas (Louis et al., 2016).

Actuellement, plusieurs études tentent de développer des stratégies alternatives pour lutter contre le glioblastome, telles que les thérapies ciblées et les thérapies cellulaires. Ces démarches consistent à cibler différents mécanismes du développement tumoral afin de réduire le développement de la maladie sans pour autant affecter les cellules saines. Pour ce faire les scientifiques se sont intéressés à une panoplie de molécules d’origine naturelle ou synthétique.

Parmi les molécules naturelles explorées et en cours d’étude, certaines sont issues des venins animaux. En effet, les venins animaux sont très riches en molécules, essentiellement des protéines, capables d’agir sur de nombreuses fonctions cellulaires. Ces molécules agissent

de façon très spécifique sur des récepteurs exprimés à la surface cellulaire, activant ainsi divers processus impliqués dans différentes maladies et en particulier le cancer.

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés aux molécules de petite taille issues du venin de scorpion tunisien *Androctonus australis hector*, pour lequel des travaux de notre équipe ont abouti à l'identification de plusieurs molécules capables d'inhiber le développement de différentes lignées de cellules cancéreuses. Ces composés agissent en modulant des canaux ioniques, comme les canaux potassium (Aissaoui et al., 2018), sodium (BenAissa et al., 2020) ou chlore (Rjeibi et al., 2011), ainsi que des intégrines ou des récepteurs ioniques tel que le récepteur modulateur des ions calcium FPRL-1 (Aissaoui et al. 2021).

Les molécules de petite taille présentent un champ de travail très intéressant puisqu'elles sont facilement synthétisables et surtout parce que l'on peut modifier leur structure afin d'améliorer leur activité. Pour la conception de molécules thérapeutiques, plusieurs formes de modifications structurales telles que les modèles des dendrimères multi-branchés peuvent être appliquées aux petites molécules afin d'améliorer leur stabilité dans l'organisme ainsi qu'augmenter leur affinité et leur sélectivité vis-à-vis de leurs cibles.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Le Cancer

I.1 Définition

Le cancer a été décrit pour la première fois au cinquième siècle avant J. C. par le médecin grec Hippocrate qui l'a nommé « Karkinos » en le comparant au crabe, mais ce n'est que dans dernières décennies et après des recherches approfondies que les scientifiques ont réussi à mieux le comprendre et à le définir correctement.

Il s'agit d'un ensemble de maladies qui peut affecter (ou atteindre) n'importe quel tissu de l'organisme (Hannahan 2001). Il se caractérise par un long processus au cours duquel des cellules saines subissent de nombreuses modifications au niveau de leur génome et leurs fonctions vitales. Ces transformations permettent aux cellules d'échapper aux différents mécanismes de contrôle corporels devenant ainsi une source de danger perturbant le tissu d'origine et, à long terme, d'autres tissus de l'organisme (Hanahan et Weinberg, 2011).

I.2 L'Oncogenèse

L'oncogenèse est un processus qui s'étend sur plusieurs années au cours desquelles, et suite à de nombreux facteurs physiques, chimiques et génétiques, les cellules tumorales subissent plusieurs modifications leur permettant d'acquérir de nouvelles caractéristiques influençant ainsi leurs fonctions de départ. Cette transformation débute par une phase d'initiation qui se caractérise par un ensemble de mutations qui touchent plusieurs gènes, essentiellement les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (Willis, 2016). Une fois les cellules initiées, un environnement pré-tumoral peut être créé et la phase de promotion peut commencer. En effet, sous l'influence des agents dits promoteurs, les cellules déjà initiées peuvent assimiler de nouveaux pouvoirs comme la prolifération incontrôlée, l'immortalité et l'échappement à l'apoptose. À ce stade, le développement tumoral n'est encore stable et les changements observés demeurent encore réversibles et non détectable et ne présente pas d'agressivité. Une dernière étape est nécessaire pour finaliser le développement final d'une masse cancéreuse locale, c'est la progression. Pendant cette étape, la masse de cellules transformées augmente suite aux stimuli par de nombreux agents, elles deviennent incontrôlables et échappent aux différents mécanismes de contrôle de l'organisme. Ces cellules acquièrent d'autres aspects, comme la capacité à induire l'angiogenèse ou à former des métastases, qui leur permettent de se développer au sein du tissu d'origine et d'envahir d'autres tissus de l'organisme.

I.3 Les caractéristiques du cancer

La croissance de la masse tumorale se caractérise par une grande instabilité génomique des cellules qui entraîne l'apparition de nouvelles mutations reflétant des changements fonctionnels au niveau des cellules néoplasiques. Plusieurs études se sont focalisées sur les altérations génétiques des cellules saines en cours de transformation. Ces études ont montré que ce phénomène déclenche l'apparition de huit caractéristiques fondamentales pour la transformation maligne (Hanahan and Weinberg, 2011a) (figure 1).

- i- l'indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération,
- ii- l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance cellulaire,
- iii- l'échappement à l'apoptose,
- iv- l'immortalité cellulaire,
- v- l'induction de l'angiogenèse,
- vi- la métastase et invasion tissulaire
- vii- l'instabilité génomique et mutations
- viii- la reprogrammation du métabolisme énergétique

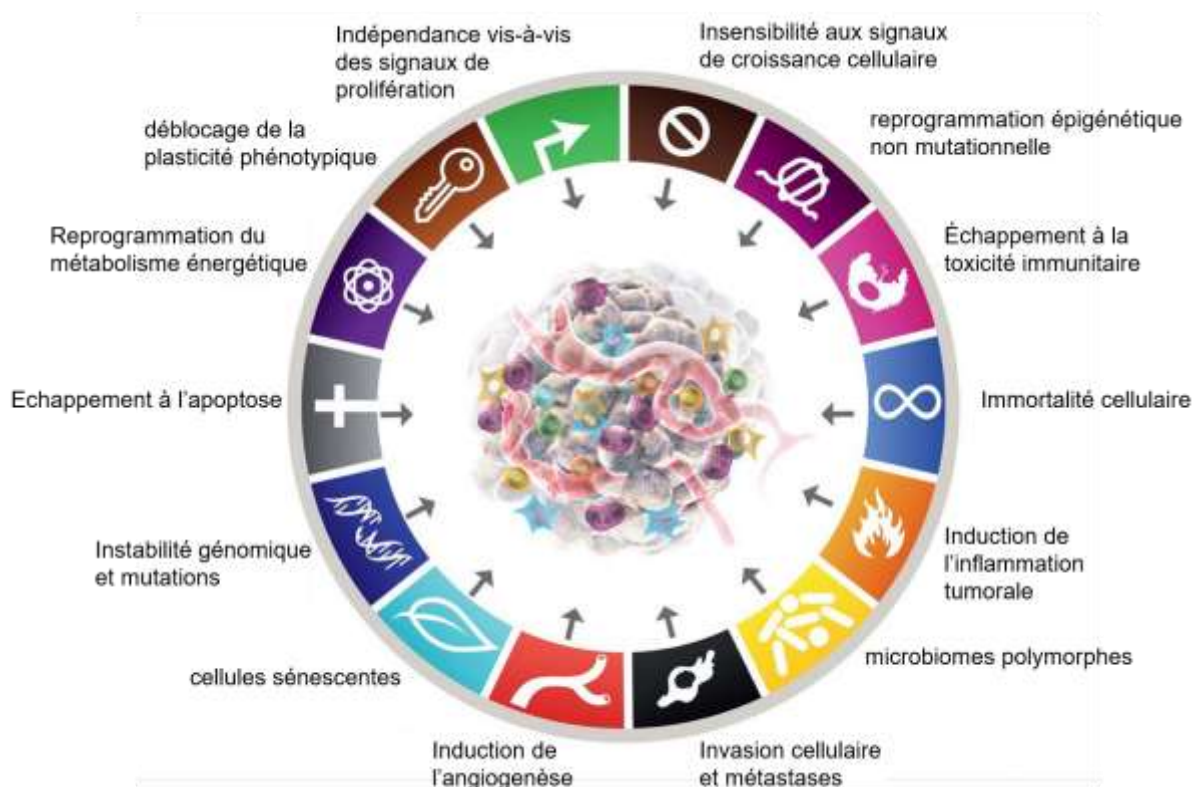


Figure 1: Les caractéristiques des cellules cancéreuses d'après Hanahan et Weinberg 2022

Outre les caractères acquis par les cellules tumorales liés essentiellement aux mutations génomiques, d'autres capacités oncogéniques sont liées aux modifications de l'environnement tumoral. En effet, les cellules tumorales peuvent survivre et influencer leur

environnement en s'adaptant aux mécanismes de défense. Ainsi, deux autres caractéristiques possèdent une influence capitale au cours du développement tumoral :

- ix- l'induction de l'inflammation tumorale
- x- l'échappement au système immunitaire

I.3.1 Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération

Les cellules normales n'ont tendance à entamer un cycle cellulaire qu'après avoir reçu des signaux de prolifération comme les facteurs de croissance (Fc), les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et les molécules d'adhésion cellulaire. Cependant, les cellules cancéreuses ont la capacité de proliférer indépendamment des signaux de prolifération cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2000). Ainsi, les cellules tumorales peuvent créer des mécanismes d'autostimulation grâce notamment à :

- Une synthèse excessive des Fc et stimulation autocrine ou paracrine (St. Louis and Bohjanen, 2017),
- Une synthèse massive de récepteurs transmembranaires qui assurent la traduction du signal des Fc ou de récepteurs altérés ou tronqués (dépourvus d'une grande partie de leur domaine extracellulaire, par exemple), ce qui permet ainsi une suractivité proliférative (Hanahan and Weinberg, 2011a),
- Des mutations activatrices dans la voie SOS-RAS-RAF-MAP kinase, qui est la cascade principale de la prolifération cellulaire. En effet, 25% des tumeurs humaines présentent une mutation de la protéine RAS, libérant ainsi un flux de signaux mitogènes dans la cellule indépendamment de la stimulation externe (Martinelli et al., 2017).
- L'inhibition des mécanismes de contrôle négatif des signaux de prolifération qui permettent de stopper le processus de division cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2011a).

I.3.2 Insensibilité aux inhibiteurs de croissance cellulaire

L'homéostasie tissulaire est un processus essentiel qui requiert la présence des inhibiteurs de la croissance cellulaire. Lors de la cancérogenèse, l'effet de ces inhibiteurs est bloqué ce qui permet une croissance anarchique des cellules tumorales (Hanahan et Weinberg, 2011).

Ces inhibitions sont marquées par des mutations des deux allèles des gènes de :

- la protéine rétinoblastome (pRb) qui, quand elle est activée dans sa forme hypophosphorylée, inhibe le cycle cellulaire en se fixant sur la protéine E2F, un

facteur de transcription essentiel à la transition des phases G1/S (Weinberg, 1995). Dans les cellules tumorales, pRb est hyperphosphorylée, libérant ainsi E2F et permettant le passage G1/S sans contrôle.

- Le TGF- β qui inhibe la prolifération cellulaire en régulant l'expression de plusieurs gènes favorisant l'arrêt du cycle cellulaire comme le gène de p15INK4B et p21, deux protéines capables d'inhiber respectivement le complexe cycline D/Cdk4 ou 6 et la cycline E ou A/Cdk2 (Imamura et al., 2012).

I.3.3 Echappement aux mécanismes de mort cellulaire

L'apoptose est la mort programmée des cellules. Elle semble jouer un rôle complémentaire mais opposé à la mitose. Elle peut être déclenchée ou inhibée par différents stimuli, à la fois physiologiques et pathologiques (Kerr et al., 1972). Afin d'échapper aux mécanismes de l'apoptose, les cellules cancéreuses subissent des mutations sur les gènes de :

- La protéine P53, ou le gardien du génome, qui a la capacité de détecter les anomalies de l'ADN. Les mutations au niveau de cette protéine permettent l'échappement à l'apoptose en inhibant les caspases initiatrices et effectrices, c'est la voie intrinsèque apoptotique (Thornberry et Lazebnik, 1998).
- Des protéines de la famille Bcl-2 (oncogènes) permettant leur activation et l'inhibition des protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bad, Bak... (suppresseurs de tumeurs) (Hanahan and Weinberg, 2000).

I.3.4 Immortalité cellulaire

Les trois aspects des cellules cancéreuses décrits précédemment (indépendance vis-à-vis des signaux de proliférations, insensibilité aux inhibiteurs de croissance, échappement à l'apoptose), ne suffisent pas au développement tumoral. L'immortalité cellulaire demeure l'aspect qui permet l'expansion tumorale car elle inhibe la sénescence, définie comme le vieillissement cellulaire. C'est l'arrêt irréversible de la croissance cellulaire.

La sénescence cellulaire est un phénomène basé non pas sur le temps mais sur le nombre de divisions effectuées par cellule. En effet, toutes les cellules humaines sont dotées, à leurs extrémités chromosomiques, de télomères qui sont des répétitions de 6 bases d'ADN non codantes (TTAGGG) qui stabilisent et protègent la structure génomique. A cause de l'incapacité de l'ADN polymérase à reproduire complètement extrémités de l'ADN chromosomique au cours de chaque phase S, la cellule perd de 50 à 100 paires de base par cycle cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2000).

Les cellules cancéreuses échappent à la sénescence cellulaire via deux voies distinctes mais complémentaires. La première voie consiste en la synthèse de télomérase, l'enzyme qui synthétise les télomères, ce qui permet une stabilité permanente de l'ADN (figure 3). La deuxième voie passe par l'inhibition des protéines Rb et P53 qui induisent le vieillissement cellulaire indépendamment des télomères (Carnero et al., 2015).

I.3.5 Induction de l'angiogenèse

L'angiogenèse est l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la vascularisation déjà existante. L'angiogenèse est primordiale au développement métastatique. Elle est due au manque d'oxygène (ou hypoxie) qui résulte de la croissance excessive de la masse tumorale. Cette situation d'encombrement cellulaire entraîne le déclenchement de la voie HIF (facteur inductible par l'hypoxie). La protéine HIF est composée de deux sous-unités HIF- α , et HIF- β . La sous-unité α est, en condition normale (normoxie), est vite dégradée par le protéasome après son interaction avec l'agent suppresseur de tumeur VHL, alors que la sous-unité β est libre. En condition d'hypoxie, HIF- α est libérée de son inhibiteur puis transloquée au noyau. Ainsi, le système HIF est complété par l'association des deux sous-unités qui recrutent différents co-activateurs induisant l'expression des gènes responsables de l'angiogenèse (facteurs pro-angiogéniques) tels que les facteurs de croissance VEGF, PDGF, TGF α , FGF et leurs récepteurs ainsi que les angioprotéines 1 et 2. La synthèse de ces facteurs provoque un déséquilibre de la balance des facteurs pro et anti-angiogéniques (en normoxie les facteurs anti-angiogéniques tels que la thrombospondine, endostatine et angiostatine sont prépondérants par rapport aux facteurs pro-angiogéniques) conduisant ainsi à un switch angiogénique (Carmeliet et Jain, 2000).

I.3.6 Métastases et invasion tissulaire

Les métastases représentent l'une des caractéristiques les plus complexes des cellules cancéreuses et sont souvent associées à un mauvais pronostic. Leurs processus comportent plusieurs étapes et nécessitent l'intervention de différents mécanismes intra et extracellulaires.

Quatre étapes nécessaires à la formation des métastases (Coussy et al., 2019):

- L'acquisition des cellules tumorales de la capacité de se détacher de la tumeur primitive et d'envahir le tissu adjacent.
- La capacité d'atteindre soit la circulation sanguine soit la circulation lymphatique et l'échappement aux mécanismes de contrôle du système immunitaire.

- Trouver un organe secondaire où les cellules migrantes peuvent se dissimiler et demeurer inactive pendant quelques temps.
- Ré-entamer de nouveau leurs proliférations pour former des foyers secondaires.

Chacune de ces étapes nécessite l'activation de certains mécanismes afin de permettre aux cellules d'acquérir la nouvelles capacités invasives et migratoires. Durant le process métastatique, plusieurs familles de molécules sont soit activés ou inhibé selon le besoin telles que les molécules d'adhésion cellulaire, de remodelage de la matrice extracellulaire, de facteurs de croissances, des inhibiteurs des réactions inflammatoires, des molécules angiogéniques et bien d'autres acteurs mobilisés par les cellules tumorales afin de finaliser cette étapes très agressives de l'oncogenèse (Hanahan and Weinberg, 2000).

I.3.7 Instabilité génomique et mutations

Les cellules possèdent un système de réparation génomique déclenché après le cycle cellulaire pour remédier aux imperfections de la réplication (Negrini et al., 2010). C'est un système efficace mais très lent (Hanahan and Weinberg, 2011a). Les cellules tumorales peuvent détourner ce programme correctionnel en multipliant le nombre de mutations par une sensibilité accrue aux agents mutagènes et en contournant les systèmes de surveillance de l'intégrité génomique qui contraignent les cellules génétiquement endommagées à la sénescence ou l'apoptose (Jackson and Bartek, 2009). Les protéines impliquées dans le système de réparation sont des supresseurs de tumeurs. La plus connue est la P53 (gardien du génome), une protéine très impliquée dans les mécanismes de réparation génomique et le déclenchement des mécanismes de mort cellulaire. P53 est inactivée dans 50% des cancers, engendrant une instabilité génomique (Mantovani et al., 2019).

I.3.8 Reprogrammation du métabolisme énergétique

La survie et la prolifération des masses tumorales nécessitent un approvisionnement énergétique énorme qui dépasse largement les réserves cellulaires habituelles. Pour ce faire les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme énergétique (Hanahan and Weinberg, 2011a). Dans les conditions de normoxie, les cellules cancéreuses reprogramment le métabolisme du glucose, et donc leur production de l'énergie, en limitant leur métabolisme énergétique en grande partie à la glycolyse, ce qui conduit à un état appelé "glycolyse aérobie". Ce mécanisme handicape les cellules tumorales dans la production de l'ATP par rapport à la phosphorylation oxydative mitochondriale. Mais cet handicap est corrigé par une expression accrue des transporteurs de glucose GLUT1, augmentant ainsi considérablement

son taux intracellulaire (Jones and Thompson, 2009). En hypoxie (taux insuffisant ou absence d'oxygène), la cellule tumorale régule à la hausse plusieurs transporteurs de glucose et plusieurs enzymes de la voie glycolytique (Jones and Thompson, 2009). L'oncoprotéine RAS et l'hypoxie augmentent considérablement le taux des protéines HIF-1 et HIF-2, régulateurs de la glycolyse (Semenza, 2010).

I.3.9 Induction de l'inflammation tumorale

Il a été reconnu, depuis plusieurs années, que des foyers néoplasiques sont entourés par des cellules immunitaires qui engendrent une réponse inflammatoire (Dvorak, 1986) qui est connu pour déclencher des réactions anti-tumorales. Paradoxalement, durant la dernière décennie, plusieurs études ont montré que ces réponses inflammatoires favorisent la stabilité tumorale (Singh et al., 2019). En effet, les cellules inflammatoires secrètent des molécules telles que des facteurs de croissance, des facteurs de survie cellulaire et des facteurs pro-angiogéniques, qui peuvent contribuer à l'acquisition des caractères oncogéniques (DeNardo et al., 2010). Il est à noter que dans certains cas les inflammations qui entourent les tumeurs naissantes peuvent compléter leur développement néoplasique en secrétant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui favorisent une instabilité génomique et par conséquent une évolution de la tumeur plus rapide et très agressive (Grivennikov et al., 2010).

I.3.10 Echappement au système immunitaire

L'une des barrières essentielles dans la lutte naturelle contre le développement néoplasique est le système immunitaire. En effet, l'organisme est sous surveillance constante des cellules immunitaires, qui arrivent à neutraliser la formation des tumeurs (Hanahan and Weinberg, 2011a). Les personnes immunodéprimés sont plus prédisposés à développer des néoplasmes par rapport aux personnes immunocompétentes (Vajdic and van Leeuwen, 2009). En effet, les travaux réalisés chez les souris immunodéprimées ont montré le développement de plusieurs tumeurs. Les souris déficientes en lymphocytes cytotoxiques (LTC $CD8^+$), *lymphocytes helper* (LTH1) et les cellules *natural killer* (NK) sont les plus susceptibles à l'incidence tumorale (Kim et al., 2007; Teng et al., 2008). Les scientifiques ont réussi à comprendre la relation entre le système immunitaire et le développement tumoral. Cette relation est classée en 3 phases. La 1^{ère} est la phase d'élimination, lors de laquelle le système immunitaire est capable de reconnaître les nouvelles tumeurs et de les éliminer. La deuxième phase, la plus longue, est celle de la stabilisation. Le système immunitaire réussit à reconnaître les cellules tumorales et à les cerner dans un tissu, les empêchant de progresser,

mais n'arrive pas à les tuer. La troisième étape est l'échappement, où les cellules cancéreuses peuvent s'accroître et échapper aux acteurs du système immunitaire (Gasparri et al., 2017). Plusieurs mécanismes initiés par les cellules cancéreuses sont activés pendant ce processus, impliquant différents composants du système immunitaire. A titre d'exemple, la sécrétion de plusieurs facteurs antiinflammatoires tel que le TGF- β (*Transforming growth factor beta*), une cytokine qui inhibe le système immunitaire. Outre les molécules immunomodulatrices, Un mécanisme cellulaire est impliqué à savoir le recrutement de cellules immuno-modulatrices telles que T régulateurs (Tregs) et les cellules MDSC (myeloid-derived suppressor cells) qui ont pour rôle la suppression de l'action cytotoxique des lymphocytes (Hanahan and Weinberg, 2011a).

En plus des 10 caractéristiques énumérées précédemment, de nouveaux aspects habilitants la transformation des cellules cancéreuses ont été récemment décrits par Hanahan. Ces nouvelles caractéristiques (qui peuvent être communes entre plusieurs cancers ou spécifiques à un seul cancer) ont été établis par plusieurs travaux réalisés dans la dernière décennie et peuvent faire partie dans les prochaines années des capacités nécessaires aux transformations tumorales.

- xi- le déblocage de la plasticité phénotypique
- xii- la reprogrammation épigénétique non mutationnelle
- xiii- les microbiomes polymorphes
- xiv- les cellules sénescences

Le concept intégratif des caractéristiques de la transformation cancéreuse (figure 1) a permis la simplification de ce phénomène et l'atténuation de la complexité de cette pathologie (Hanahan, 2022).

I.3.11 Le déblocage de la plasticité phénotypique

Le développement tissulaire durant l'organogenèse, demande des cycles de différenciation des cellules souches. Une fois tous les tissus formés et bien organisés suivant l'homéostasie de chaque tissu, ces étapes de différenciations cessent de croître (parfois définitivement) (Hanahan, 2022). Ce phénomène d'arrêt de croissance (blocage de la plasticité phénotypique) est considéré comme étant une barrière antiproliférative nécessaire à la croissance néoplasique (Yuan et al., 2019).

Le déblocage de la plasticité phénotypique est de plus en plus observé dans le développement tumorale (Yuan et al., 2019). En effet, certaines recherches ont mis le point sur trois formes de déblocage décrits jusqu'à maintenant :

- La dédifférenciation : certaines cellules saines différenciées se transforment en cellules tumorales et acquièrent la capacité de se dédifférencier en cellules progénitrices (Perekatt et al., 2018).
- Le blocage de la différenciation : quand des cellules souches deviennent tumorales et se multiplient tout en circuitant leurs différenciations et par conséquent elles peuvent garder une forme progénitrice peut différenciée (de Thé, 2018).
- La transdifférenciation : c'est la capacité des cellules souches tumorales à se transformer en des cellules différenciées différentes en acquérant des caractéristiques spécifiques aux tissus qui n'étaient pas prédestinées par leurs cellules d'origine normales (Yuan et al., 2019).

I.3.12 La reprogrammation épigénétique non mutationnelle

L'implication génétique dans le développement tumoral ne se résume pas seulement sur les mutations des gènes engagés dans l'oncogenèse, mais aussi les changements épigénétiques non mutationnelles font partie prenante du processus néoplasique (Baylin and Jones, 2016).

Les modifications épigénétiques représentent le mécanisme central du développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et l'organogenèse (hanahan 2022). Certaines publications ont montré une influence directe des modifications épigénétiques non mutationnelles sur l'acquisition des cellules cancéreuses de leurs caractéristiques néoplasiques (Darwiche, 2020). En effet, plusieurs mécanismes peuvent induire des modifications génomiques non mutationnelles tel que l'hypoxie qui provoque des changements épigénétiques en réduisant l'activité de la TET déméthylase engendrant ainsi des changements dans le méthylome tel que l'hyperméthylation (hanahan 2022).

I.3.13 Les microbiomes polymorphes

Les écosystèmes créés par les bactéries et les champignons résidents, appelés microbiomes, ont un impact profond sur la santé et les maladies.

Pour le cancer, les études ont mis l'accent sur l'impact de la variabilité polymorphe des microbiomes et le phénotype du cancer qui varie selon les individus. Les agents pathogènes microbiens sont les agents étiologiques de 15 à 20 % des cas de cancer (HPV, HBV, EBV, *Clonorchis sinensis*, *Schistosoma haematobium*), mais le microbiote commensal a une influence plus générale sur l'initiation, la progression de la tumorigenèse et la réponse au traitement (Bhatt et al., 2017). En effet, la dysbiose, qui est la perturbation de la composition du microbiome, peut augmenter la représentation de microbiotes délétères

produisant des métabolites et des antigènes nocifs entraînant des réponses immunitaires inadaptées. Ces perturbations sont particulièrement pertinentes en oncologie, étant donné que la dérégulation du métabolisme et l'inflammation sont reconnues comme des caractéristiques du cancer (Hanahan, 2022).

I.3.14 Les cellules sénescentes

La sénescence est une forme de mortalité cellulaire qui survient lors du cycle cellulaire en réponse à plusieurs formes de stress. Elle est considérée comme étant une réponse cellulaire face au développement de plusieurs pathologies telles que le cancer et une forme de régulation de l'homéostasie tissulaire (Calcinotto et al., 2019).

Par ailleurs, ça a été démontré que dans certaines situations, les cellules sénescentes peuvent agir de manière bénéfique pour le tissu tumoral. En effet, les cellules cancéreuses en sénescence peuvent envoyer plusieurs signaux aux autres cellules cancéreuses adjacentes et même les cellules néoplasiques qui se situent dans tout le microenvironnement tumoral (Hanahan, 2022). Cette communication cellulaire permet aux cellules cancéreuses non sénescentes d'acquiescer des capacités tumorales telles que la résistance à l'apoptose, la prolifération cellulaire, induction de l'angiogenèse et des métastases ainsi que la résistance au système immunitaire (Faget et al., 2019; Lee and Schmitt, 2019; Wang et al., 2020).

I.4 Les différents types de cancer

On peut distinguer 4 types de cancer d'après l'organisation mondiale de la santé :

- les cancers solides qui représentent plus de 90% des cancers et qui sont divisés en 2 groupes :

i- Les carcinomes : qui représentent la grande partie des cancers solides et qui sont issus du tissu épithélial, comme le cancer du sein, cancer du poumon, cancer gastrique... (Sherman et al., n.d.).

ii- Les sarcomes : qui sont moins fréquents et sont issus du tissu conjonctif comme les cancers des os, du muscle lisse ... (Sherman et al., n.d.).

- les cancers liquides ou cancers sanguins.

iii- Les leucémies : qui représentent les cancers du sang et de la moelle osseuse.

iv- Les lymphomes : c'est les cancers des systèmes lymphoïdes, les ganglions, la rate ou le foie (Campo et al., 2011).

Tous ces types de cancer peuvent aboutir à des métastases ou cancers disséminés qui sont très dangereux et souvent incurables puisqu'ils sont capables d'envahir des foyers secondaires via les voies sanguines ou bien les voies lymphatiques et se disperser dans tout l'organisme, échappant ainsi aux traitements proposés (Phan and Croucher, 2020).

Dans notre travail, nous allons nous intéresser à un cancer primaire dérivant d'un cancer cérébral, le glioblastome.

I.5 Les tumeurs cérébrales primaires

I.5.1 Définition

Les tumeurs cérébrales primaires représentent un ensemble de pathologies hétérogènes regroupant toutes les tumeurs du système nerveux central (Lapointe et al., 2018). Plus de 200 tumeurs peuvent se développer à partir du système nerveux central. Ces tumeurs peuvent être bénignes, composées par des cellules non cancéreuses et qui ne sont pas agressives dans leur majorité; ou malignes, qui sont très agressives et dont les plus fréquentes sont les gliomes (Lapointe et al., 2018). Les anciennes classifications des tumeurs cérébrales étaient surtout basées sur la nature tissulaire des cellules. Cependant, en 2016 l'OMS a effectué des changements conventionnels au niveau de la nouvelle classification en prenant compte des modifications moléculaires (Wesseling and Capper, 2018). La nouvelle classification, basée sur les aspects phénotypiques et génomiques, permet un meilleur diagnostic et une meilleure prise en charge des patients.

I.5.2 Les gliomes

Les gliomes sont les tumeurs issues des cellules gliales d'origine neuro-ectodermale. Les cellules gliales saines (astrocytes, oligodendrocytes, épendymocytes et les cellules microgliales) forment, avec les neurones, le tissu cérébral. Elles ont été longtemps présentées comme de simples cellules de soutien aux neurones. Cependant, ces dernières années plusieurs études ont montré qu'elles jouent un rôle très important, voire primordial, au bon fonctionnement des neurones et à leur survie, ainsi qu'à l'homéostasie générale du tissu cérébral. Les cellules gliales ont plusieurs fonctions, comme la formation de la barrière hémato-encéphalique, la phagocytose des pathogènes, la régénération et dégénérescence du système nerveux central (en cas de maladie), l'accélération du flux nerveux, la réparation des fentes synaptiques, la maintenance du métabolisme des neurotransmetteurs et la nutrition des neurones. La transformation des cellules gliales est un phénomène très diversifié donnant naissance à plusieurs tumeurs différentes à l'échelle phénotypique et génomique (Guttenplan

and Liddelw, 2019; Jessen, 2004). Les gliomes sont classés en astrocytomes, oligodendrogliomes et épendymomes, Ils représentent 75% des cancers primitifs du tissu cérébral chez les personnes adultes. Ils sont répartis selon la nouvelle classification en deux groupes :

- i- Les gliomes localisés, qui représentent les tumeurs bénignes, ainsi que les tumeurs de grade I. Ils sont généralement curables avec une intervention chirurgicale.
- ii- Les gliomes diffus, qui sont plus agressifs et renferment plusieurs groupes de grades supérieurs. On peut distinguer l'astrocytome diffus, l'oligodendrogliome, l'oligoastrocytome (grade II), l'oligodendrogliome anaplasique, l'astrocytome anaplasique, l'oligoastrocytome anaplasique (grade III) et le glioblastome (grade IV). Leur prise en charge est plus compliquée et leur pronostic est souvent défavorable. L'attribution des grades est fondée sur les critères anatomopathologiques, l'état d'avancement et l'influence de la tumeur sur son environnement (angiogenèse, nécrose) (Louis et al., 2016) (Figure2).

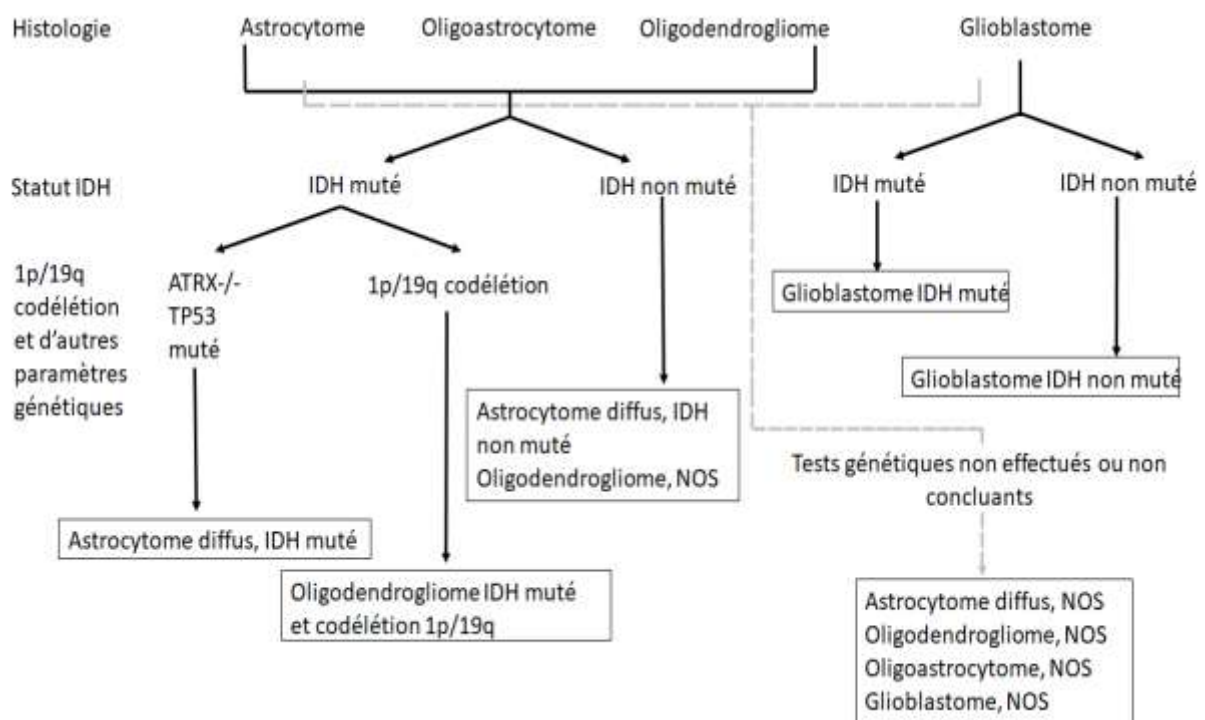


Figure 2 : Classification des gliomes diffus selon leurs tissus et les paramètres moléculaires d'après Louis et al., 2016

IDH: Isocitrate déshydrogénase, NOS: *not otherwise specified*, ATRX: *alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked*

Des altérations génomiques ont été décrites chez plusieurs patients atteints de différents gliomes diffus. C'est pour cela que la nouvelle classification a spécifié toutes ces modifications pour un meilleur diagnostic, surtout pour les médecins radiologues qui jouent un rôle décisif dans le suivi des patients. Cependant, le glioblastome demeure la forme la plus redoutable face à laquelle les thérapies conventionnelles restent limitées.

I.5.3 Le glioblastome

I.5.3.1 Définition

Le glioblastome multiforme (GBM) est la forme la plus fréquente des gliomes diffus. La fréquence des nouveaux cas chaque année (qui varie selon les pays), est de 3 à 5 personnes sur 10^5 habitants. Le pronostic de survie ne dépasse pas les 15 mois en moyenne. Les hommes sont plus atteints par le glioblastome que les femmes (1,6 : 1) et les personnes d'origine caucasiens sont plus susceptibles de le développer que les personnes d'origine africaine (2 : 1) (Wirsching et al., 2016). Le glioblastome est présent sous deux formes. Une forme primaire (90%) quand la tumeur est directement formée sans l'apparition de lésions préalables et une forme secondaire (10%) lorsqu'elle survient à partir d'un gliome de bas grade (Wen and Huse, 2017). Les coupes histologiques et les images d'IRM faites sur les glioblastomes montrent que c'est une tumeur très infiltrante, mal limitée, marquée par une forte activité mitotique et qui forme des zones nécrotiques centrales, associées à un aspect angiogénique dû aux phénomènes d'hypoxie (figure 3).

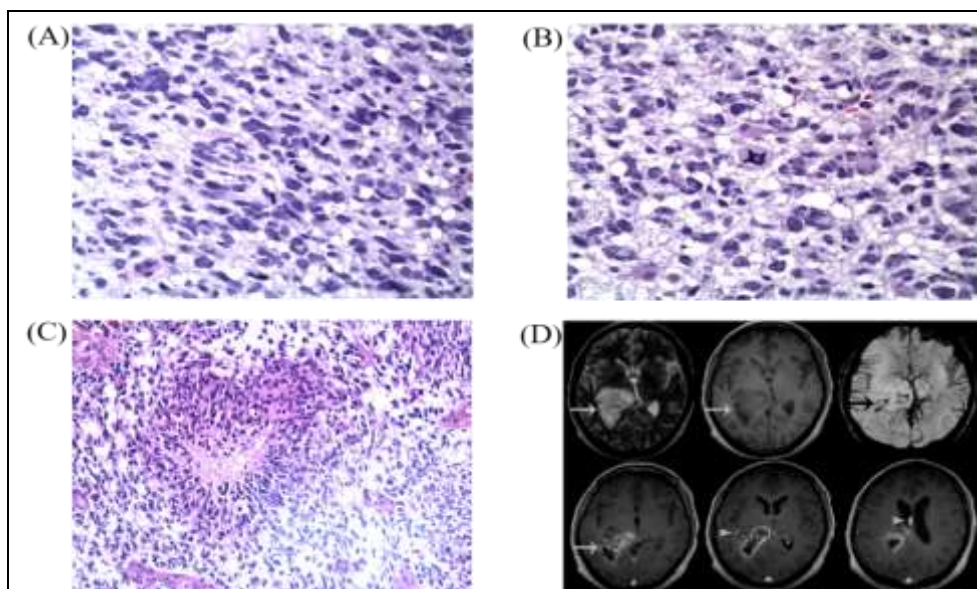


Figure 3 : Coupes histologiques et IRM de glioblastome
(A) cellules présentant une atypie cytonucléaire, (B) cellules en mitose, (C) foyers nécrotiques, (D) image IRM d'un glioblastome localisé au niveau de la région intraventriculaire (Darlix, 2013 ; Khandwala et al., 2021)

I.5.3.2 Les marqueurs moléculaires du glioblastome

Le diagnostic du glioblastome a été longtemps relié principalement aux changements histopathologiques observés sur les coupes histologiques et les radios. Toutefois, ces dernières années, plusieurs études ont souligné l'importance des changements moléculaires constatés dans les cellules de glioblastome et l'environnement tumoral. En effet, plusieurs altérations génétiques touchant des gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies majeures de prolifération, de migration, d'invasion, d'angiogenèse, du contrôle du cycle cellulaire et du métabolisme cellulaire, ont été décelées chez les patients atteints de glioblastome. En se basant sur la présence ou l'absence de ces mutations, les médecins peuvent présenter un meilleur diagnostic. C'est pour cette raison que l'OMS a introduit ces marqueurs moléculaires dans sa récente classification des tumeurs du système nerveux central.

I.5.3.2.1 Dérégulation de la protéine P53

La protéine P53 est un suppresseur de tumeurs, aussi nommée gardien du génome. En effet, cette protéine joue un rôle très important dans le maintien de la stabilité génomique et l'induction de l'apoptose durant le cycle cellulaire. Elle est aussi capable d'inhiber l'angiogenèse et fait partie des agents régulateurs du métabolisme cellulaire, de l'autophagie, l'invasion cellulaire, les métastases, le microenvironnement cellulaire et le système immunitaire (Zhang et al., 2018). La mutation du gène TP53 est fréquente dans plusieurs cancers et en particulier chez les patients atteints de glioblastome (22%). Son impact est directement lié aux mécanismes de dérégulation de la prolifération et de la migration cellulaire, ainsi que du déséquilibre métabolique (Yue et al., 2017). L'inactivation de la P53 dans le glioblastome est associée à une invasion cellulaire, une inhibition de l'apoptose, une prolifération anarchique et une résistance aux thérapies conventionnelles (Zhang et al., 2018). Bien que la mutation de TP53 engendre une multitude de réactions favorisant le développement et le maintien du glioblastome, son impact direct sur un pronostic défavorable n'est toujours pas prouvé. En effet, jusqu'à maintenant on n'arrive pas à distinguer précisément le moment exact de la survenue de la mutation et son rôle réel dans la formation du glioblastome (England et al., 2013; Zhang et al., 2018).

I.5.3.2.2 Méthylation du promoteur du gène de la O6-MéthylGuanine-DNA Méthyl Transférase (MGMT)

Certains agents cancérigènes agissent sur l'ADN en alkylant (méthylation) certaines régions, provoquant ainsi une génotoxicité et l'apparition de mutations. Les systèmes de réparation de l'ADN font alors intervenir un groupe de protéines qui réparent les zones

touchées, soit par excision des régions méthylées, soit directement par déméthylation, grâce notamment à l'enzyme l'O6-MéthylGuanine-MéthylTransférase (MGMT). Cette enzyme agit spécifiquement sur les groupes méthyles situés sur la position O6 des guanines (O6MeG) (Mansouri et al., 2019). Chez certains patients présentant un glioblastome, le site promoteur de l'enzyme MGMT subit une hyperméthylation, entraînant l'inactivation de l'enzyme ainsi qu'une meilleure réponse à la chimiothérapie par l'agent Témazolomide (TMZ) (Jha et al., 2010). En effet, plusieurs études ont montré que la présence de la protéine MGMT active, dans les cellules du glioblastome, entraîne une résistance aux thérapies conventionnelles et que les patients qui ont un statut non méthylé de l'enzyme MGMT, possèdent une moyenne de survie inférieure aux autres patients (Binabaj et al., 2018).

I.5.3.2.3 Mutations des gènes codant pour les protéines IDH1 et IDH2

Les protéines isocitrate déshydrogénase (IDH) 1 et 2 sont des enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire puisqu'elles catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate (α -KG) avec le NADH comme co-facteur. Les mutations d'IDH observées dans les cellules de GBM entraînent un déséquilibre du métabolisme énergétique au niveau du cycle de Krebs et de la synthèse des acides gras (Rajaratnam et al., 2020). Elle entraîne aussi une diminution du taux de α -KG contre une augmentation du niveau d'hydroglutarate (2-HG), un oncométabolite qui inhibe certaines enzymes telles que les histones déméthylases, responsables du remodelage de la chromatine, et qui provoque des modifications génomiques (Dang and Su, 2017; Idbaih, 2011). Les mutations des gènes IDH sont souvent associées à un mauvais pronostic et sont plus présentes dans les GBM secondaires que les GBM primaires. En effet, une étude réalisée en 2008 par Parsons et ses collaborateurs a montré que 12% des patients de GBM portent la mutation IDH1, dont 90% étaient des GBM secondaires contre 10% de GBM primaires. Ces données ont permis de considérer la mutation IDH comme marqueur de GBM secondaire.

I.5.3.2.4 Mutation du promoteur du gène de la transcriptase inverse de la télomérase (TERT)

La transcriptase inverse de la télomérase (TERT) est une enzyme ADN polymérase ARN-dépendante, qui assure la synthèse du télomère. l'expression de la protéine TERT chez les cellules somatiques entraîne une inhibition du contrôle du cycle cellulaire conduisant à une immortalité des cellules, signe de la transformation oncogénique (Dratwa et al., 2020). Le gène codant pour la protéine TERT est souvent muté chez les patients atteints de glioblastome. En effet, une large étude réalisée sur les marqueurs génomiques du

glioblastome a montré que 21 patients sur les 25 étudiés présentent au moins une mutation des deux sites promoteurs du gène codant pour TERT. Les quatre patients qui ne présentaient pas cette mutation sont tous porteurs d'une autre mutation touchant le gène ATRX qui code pour une protéine qui assure le remodelage de la chromatine et qui joue un rôle très important dans la stabilité génomique. La présence de la mutation ATRX est généralement associée aux mutations des gènes P53 et IDH1 (Liu et al., 2012). La mutation de ces deux gènes favorise la maintenance des régions télomériques chez les patients atteints de glioblastome et favorise la malignité de la tumeur (Brennan et al., 2013).

I.5.3.2.5 Mutations au niveau des voies des MAPK et PI3K/AKT

Les voies des MAPK et PI3K/AKT sont des voies de signalisation initiées généralement par des facteurs de croissance, très impliquées dans plusieurs mécanismes oncogéniques tels que la prolifération, la migration et l'invasion, favorisant ainsi la malignité des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011a). Des études menées sur les changements génomiques de nombreux cancers, dont le glioblastome, ont révélé que les mutations peuvent provoquer la phosphorylation des protéines des voies MAPK et PI3K/AKT, entraînant ainsi une dérégulation des mécanismes régis par ces voies (Daniel et al., 2018).

Le programme de recherche international connu sous le titre «*The Cancer Genome Atlas*», a mené une étude en 2008 sur plus de 206 biopsies de glioblastome prélevés chez des patients et a révélé la présence d'altérations somatiques au niveau de la voie RTK/RAS/PI3K (regroupant les voies MAPK et PI3K/AKT), touchant jusqu'à 88% des cas (TCGA, 2008). En outre, il a été rapporté que certains récepteurs tels que EGFR, un autre médiateur de la voie MAPK, est muté dans 50% des glioblastomes (Daniel et al., 2018).

I.5.3.3 Stratégies thérapeutiques du glioblastome

Plusieurs stratégies de traitement de glioblastome sont adaptées selon l'état d'avancement de la maladie et la recevabilité du patient. La stratégie la plus communément adaptée actuellement chez les patients atteints de glioblastome consiste en la chirurgie, en premier lieu, pour enlever la grande partie de la tumeur, suivie de la chimiothérapie associée à la radiothérapie. (Müller et al., 2019; Schipmann et al., 2019). La figure 6 résume les principales stratégies de thérapie du glioblastome, selon l'âge du patient et les caractéristiques de sa tumeur (Wirsching et al., 2016).

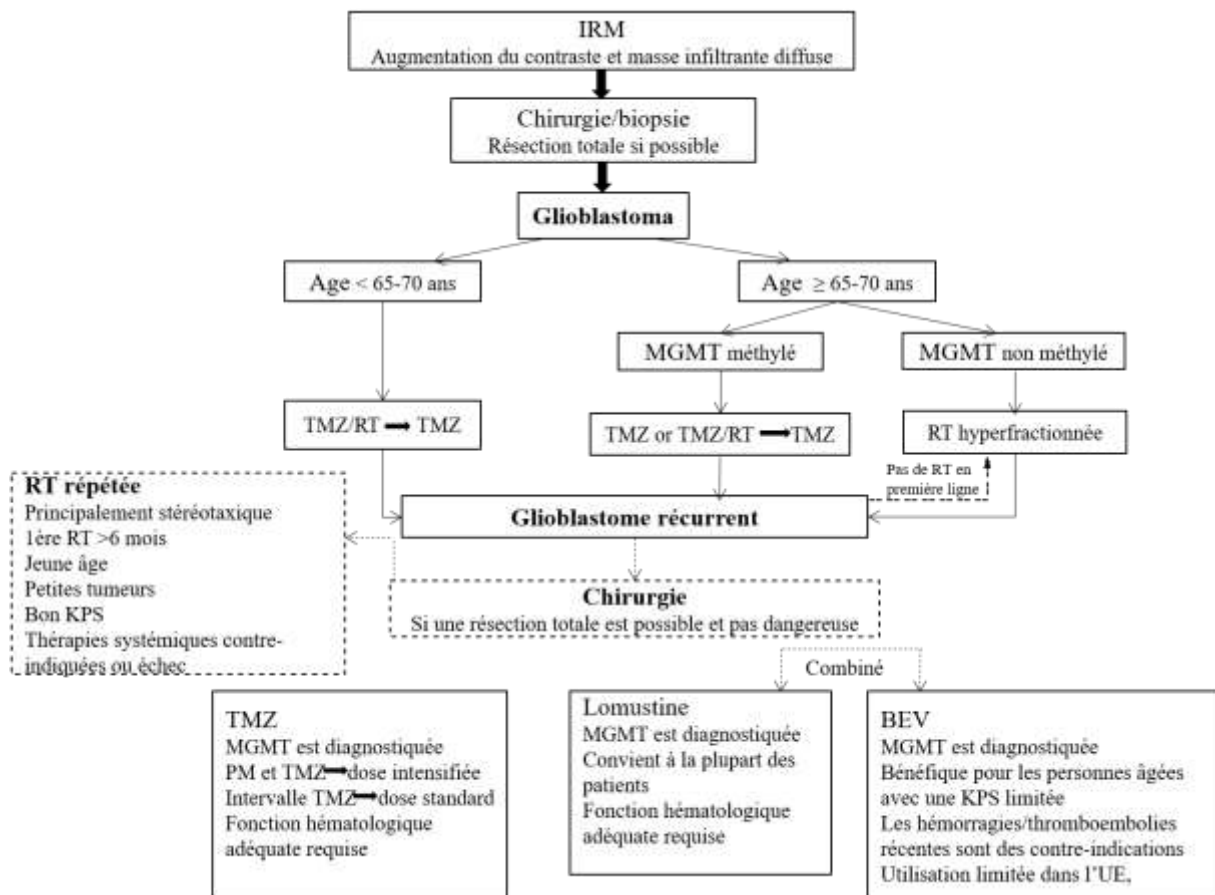


Figure 4: Principales approches thérapeutiques des patients atteints de glioblastome d'après (Wirsching et al., 2016)

I.5.3.3.1 La chirurgie

C'est une étape primordiale qui permet non seulement l'exérèse de la tumeur mais aussi l'analyse histopathologique (Tamimi and Juweid, 2017). Il est très important de suivre les différentes parties extraites pendant l'intervention chirurgicale afin de ne pas nuire aux régions saines aux alentours de la tumeur. Pour ce faire, les chirurgiens utilisent souvent un agent fluorescent pour une meilleure visibilité de la tumeur. Actuellement, avec l'avancement des techniques d'imagerie, la chirurgie est pratiquée en temps réel utilisant les spectroscopies Raman, la microscopie confocale ou des méthodes de fluorescence ciblée (Schipmann et al., 2019). Il a été démontré qu'une exérèse totale de la masse tumorale permet une meilleure efficacité de la radiothérapie et de la chimiothérapie (Stupp et al., 2009).

I.5.3.3.2 La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional qui consiste en l'utilisation de radiations (rayonnements) qui ciblent les cellules tumorales pour les détruire ou bien réduire la masse tumorale en stoppant son évolution. Deux formes d'irradiations sont envisageables,

la radio chirurgie stéréotaxique (SRS), qui consiste en l'administration d'une seule dose importante de rayonnement intracrânien avec guide stéréotaxique ou la radiothérapie stéréotaxique fractionnée (SFRT), qui consiste en l'administration de plusieurs doses de rayonnement fractionnées sur plusieurs séances d'injection (Balasubramaniam et al., 2007). Selon l'état d'avancement de la maladie, une dose de rayonnements de 60 Gy est fractionnée sur 30 injections durant 6 semaines (5 injections de 2 Gy par semaine) (Li et al., 2021).

Les patients atteints de glioblastome suivent des séances de radiothérapie SFRT associée au témozolomide (TMZ) comme agent chimiothérapeutique. Cette stratégie a permis d'augmenter la durée de vie des patients traités (Stupp et al., 2005). Néanmoins, la radiothérapie présente plusieurs effets secondaires comme la fatigue, les intenses douleurs de la tête, la perte des capacités cognitives, les pertes de concentration, les vertiges et les réductions des capacités mentales (Papsdorf et al., 1999).

I.5.3.3.3 La chimiothérapie

La chimiothérapie regroupe toutes les molécules qu'on administre aux patients atteints de glioblastome, afin de tuer les cellules cancéreuses et réduire la masse tumorale. L'agent chimiothérapeutique le plus souvent utilisé contre le glioblastome est le TMZ, qui est généralement administré en association avec la radiothérapie. Le TMZ est un agent alkylant qui agit en méthylant les sites N⁷ et O⁶ des résidus guanine de l'ADN, induisant une rupture des mécanismes de réparation génomique et provoquant ainsi l'apoptose (Duwa et al., 2019). Sa posologie dépend du statut de la méthylation du site promoteur de la protéine MGMT et de l'âge du patient.

Pour les personnes de moins de 65 ans, plusieurs doses et durée d'administrations sont adaptées selon l'état d'avancement de la maladie :

- 40 à 50 mg/m²/jour en continu pendant 3 semaines.
- 75 à 100 mg/m²/jour pendant une période qui varie de 4 à 10 semaines.
- 80 à 150 mg/m²/jour pendant 4 semaines en alternant les semaines (Chua et al., 2019).

Les nitrosourées (carmustine, lomustine [CCNU] ou nimustine) étaient souvent utilisées pour le traitement des glioblastomes avant d'être supplantées par le TMZ sauf pour les glioblastomes récurrents où ils sont toujours prescrits (Weller and Le Rhun, 2020). C'est une famille d'agents alkylant l'ADN qui passent facilement la barrière hémato-encéphalique grâce, notamment, à leur caractère très lipophile. Ces molécules ne sont plus utilisées que rarement, souvent en deuxième ligne en combinaison avec le TMZ (Weller et al., 2013).

I.5.3.3.4 L'immunothérapie

Le système immunitaire représente la barrière essentielle entre notre corps et toute menace externe ou interne, dont les cancers. Les cellules tumorales arrivent à déjouer le système immunitaire grâce à un processus immuno-modulateur. En effet, certaines cellules cancéreuses arrivent à échapper aux points de contrôle immunologiques, qui sont des systèmes intrinsèques qui reconnaissent et distinguent les antigènes du soi du non-soi, en activant les voies des points de contrôle (ensemble de mécanismes immunitaires intrinsèques qui maintiennent la tolérance du soi) telles que la voie des protéines PD-1 (*programmed cell death protein-1*), PD-L1 (*programmed death ligand-1*) et CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*). Le développement des inhibiteurs des points de contrôle immunologiques représente l'une des stratégies prometteuses en immunothérapie. En effet, la synthèse des anticorps monoclonaux anti-PD-1 et anti-CTLA-4 a montré son efficacité contre plusieurs tumeurs solides. Ces anticorps monoclonaux sont encore en essai clinique contre le glioblastome, mais les premiers résultats sont encourageants (Medikonda et al., 2021).

Actuellement, un seul anticorps monoclonal, le bevacizumab, est approuvé par la FDA pour lutter contre le glioblastome. Il est dirigé contre le VEGF et inhibe sa liaison avec son récepteur VEGFR à la surface des cellules endothéliales, ce qui a pour effet de réduire la vascularisation tumorale et son expansion (Cohen et al., 2009).

A cause de la malignité et le pronostic vital souvent engagé des patients du glioblastome, les recherches s'accroissent ces dernières décennies, afin de trouver des solutions thérapeutiques. En effet, les stratégies adoptées actuellement pour remédier à cette tumeur sont plus inefficaces, voire palliatives, que curatives, d'où la nécessité de rechercher de nouvelles alternatives.

Dans ce contexte, des ressources biologiques sont investiguées afin d'identifier des molécules potentiellement efficaces contre le glioblastome. En effet, les venins animaux dont le venin de scorpion ont montré leur efficacité contre plusieurs aspects oncogéniques de différentes lignées de cellules cancéreuses. Les molécules des venins de scorpion qui agissent principalement sur les canaux ioniques sont dotées d'activités anti tumorales et peuvent être des potentielles molécules thérapeutiques.

I.5.3.4 La signalisation calcique et son implication dans le développement du glioblastome

La signalisation calcique est probablement l'un des moyens les plus connus et les plus courants, du point de vue de l'évolution, par lequel le signal peut être transmis de l'environnement cellulaire aux effecteurs cytoplasmiques. Le signal calcique est rapide et est

considéré comme étant un modulateur crucial, influençant le comportement des cellules. L'ion calcium est également une molécule de signalisation intracellulaire clé qui fonctionne comme un messenger secondaire/facteur de transcription dans de multiples voies. Le calcium commande un vaste réseau de régulateurs de signalisation qui déterminent le sort des cellules. Une signalisation calcique exagérée, résultant d'une activation accrue des canaux et récepteurs calciques, peut conduire à la transformation des cellules astrocytaires en glioblastomes en favorisant le changement du métabolisme, de la prolifération, de l'invasion, de la migration et de l'angiogenèse cellulaires (Figure 4). La signalisation calcique permet aussi la régulation des voies associées à l'hypoxie. En effet, plusieurs protéines de transport du Ca^{2+} interagissent avec HIF-1, qui est le principal régulateur des réponses transcriptionnelles de l'hypoxie (Azimi, 2018).

L'homéostasie calcique intracellulaire est commandée par plusieurs récepteurs, canaux et pompes. Les principaux canaux calciques décrits dans les cellules du glioblastome sont les canaux Ca^{2+} à voltage dépendant (Cav), de type L (Cav1.1-1.4), de type N (Cav2.2), de type T (Cav3.1-3.3), de type R (Cav2.3) et de type P/Q (Cav2.1). On trouve aussi les récepteurs purinergiques et les canaux ioniques perméables au Ca^{2+} de la famille des récepteurs TRP (*Transient Receptor Potential*) (Morrone et al., 2016).

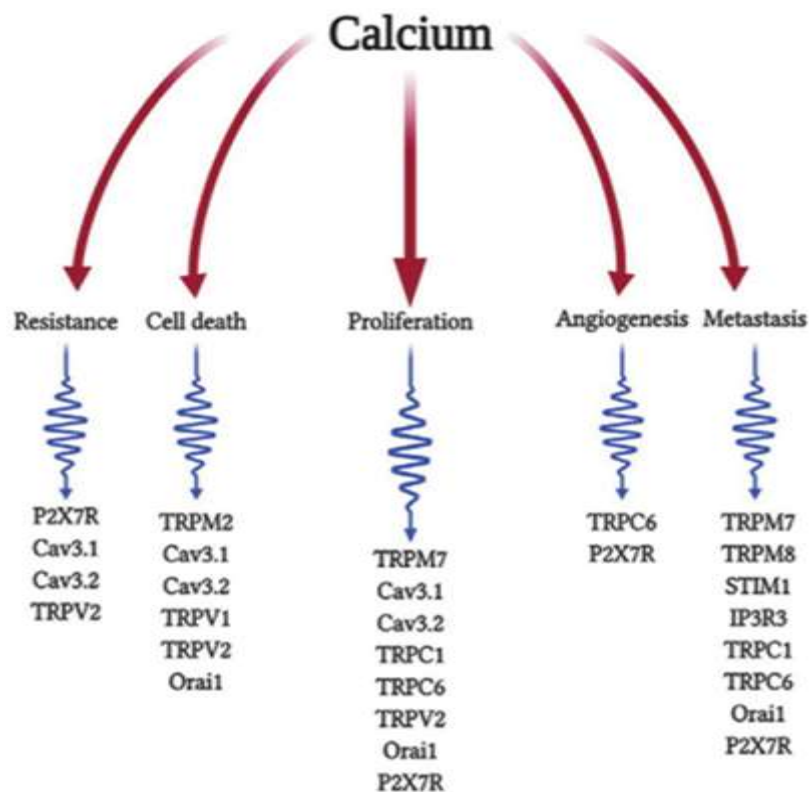


Figure 5 : Implication du calcium dans les caractéristiques des cellules cancéreuses via les canaux et les récepteurs calciques (Amir et al., 2020).

I.5.3.4.1 Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE)

Le SOCE est un processus d'influx de Ca²⁺ nécessaire pour rattraper l'équilibre en ion calcium dans le réticulum endoplasmique (RE) après son épuisement. Ce processus est initié lorsqu'une réduction du niveau de Ca²⁺ dans le RE est détectée par la molécule d'interaction stromale 1 (STIM1, pour *STromal Interaction Molecule*). La réduction en calcium conduit à l'oligomérisation de STIM1 et à son interaction avec le canal Ca²⁺ ORAI1 (*Calcium release-activated calcium channel protein 1*) sur la membrane plasmique, entraînant l'ouverture du canal et l'afflux de Ca²⁺ (Azimi et al., 2018). Ce phénomène reflète directement l'implication de l'équilibre calcique sur plusieurs aspects de l'oncogénèse (Figure 5).

Des niveaux plus élevés d'expression d'ORAI1 ont été observés dans les cellules de glioblastome humain par rapport aux astrocytes primaires humains non-malins. Alors que l'inhibition d'ORAI1 (mais pas de STIM1) à l'aide de siRNA interférents, réduit légèrement la prolifération cellulaire, l'inhibition simultanée d'ORAI1 et de STIM1 réduit considérablement l'invasion des cellules de glioblastome (Motiani et al., 2013). Dans une autre étude, l'inhibition pharmacologique de SOCE et l'extinction d'ORAI1 ont conduit à une diminution de la prolifération cellulaire et à l'induction de l'apoptose dans les cellules de glioblastome (Liu et al., 2011, p. 1).

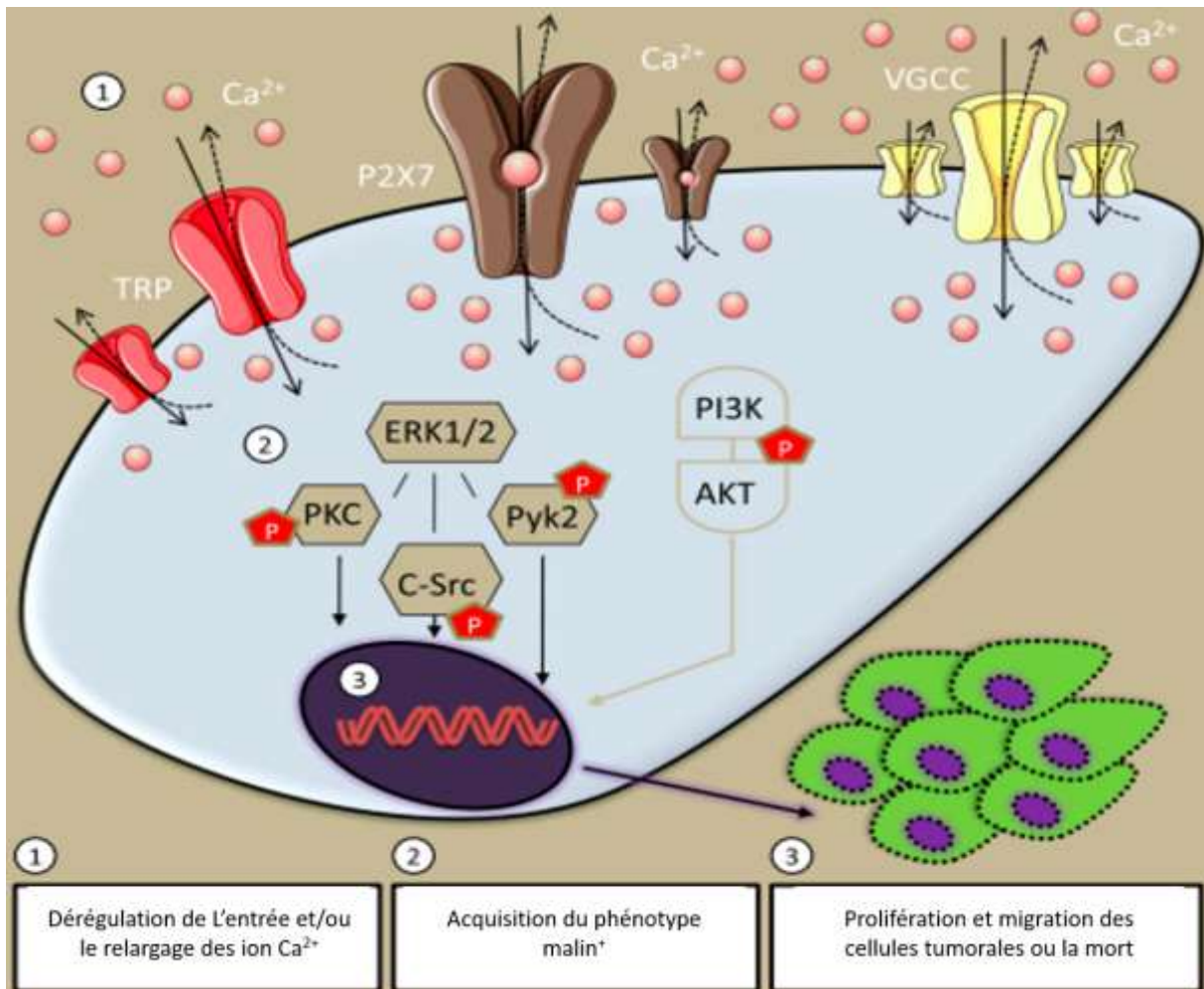


Figure 6: Implication du SOCE dans la progression tumorale

I.5.3.4.2 Les canaux calcium voltage-dépendants (Cav) dans le glioblastome

Dans les neurones, le flux calcique est régulé, en partie, par les Cav. L'ouverture de ces canaux permet l'augmentation du niveau de Ca²⁺ intracellulaire aboutissant à l'activation de certains processus tels que la libération de neurotransmetteurs, la croissance des neurones et l'expression génétique de diverses protéines (Simms and Zamponi, 2014). Les Cav sont divisés en trois principales catégories: (i) les canaux activés par un potentiel élevé (y compris les canaux de type P/Q, de type N et de type L), les canaux de type R activés par un potentiel intermédiaire et les canaux de type T activés par un faible potentiel (canaux Cav3) (Li et al., 2014). Les canaux Ca²⁺ de type T contrôlent certains processus tels que la prolifération et la différenciation cellulaires en régulant les niveaux calciques à faible potentiel au repos, par la création d'un courant calcique entrant.

Une expression aberrante des canaux calcium de type T a été observée dans différents types de tumeurs (Santoni et al., 2012). Dans les cellules de glioblastome humain, le mibefradil, un inhibiteur des canaux Ca²⁺ de type T, avec une faible activité d'inhibition des

canaux de type L (Abernethy, 1997) et la régulation à la baisse par siRNA de Cav3.1 et Cav3.2 ont permis de réduire la prolifération cellulaire et provoqué une mortalité cellulaire par apoptose et de sensibiliser les cellules aux rayonnements ionisants via la voie AKT/mTORC2 (Valerie et al., 2013). D'autre part, il a été démontré que le traitement par le mibefradil, améliore l'efficacité du témozolomide post-administré à des xénogreffes de glioblastome humain dans des souris immuno-déficientes (Keir et al., 2013). Plus récemment, il a été démontré que l'inhibition de Cav3.2 par un shRNA ou par le traitement au mibefradil, inhibe la prolifération et la survie des cellules souches de glioblastome. Il a été démontré que cette régulation est médiée par l'inhibition de la voie de survie AKT/mTOR, la promotion des voies pro-apoptotiques, et la modulation de l'expression d'un certain nombre d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (Zhang et al., 2017).

I.5.3.4.3 Les canaux TRP (Transient receptor potential)

Les canaux TRP sont exprimés dans un certain nombre de tissus où ils contrôlent diverses fonctions cellulaires, telles que la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose. Ils sont activés par des stimuli chimiques ou physiques, ainsi que par des modifications du microenvironnement cellulaire (Chen et al., 2014).

De nombreuses études ont montré le rôle important des canaux TRP dans la progression des glioblastomes. En effet, le traitement des cellules de glioblastome D54MG, avec le SKF96365 (un bloqueur non sélectif des canaux TRP-canoniques (TRPC)), a conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la cytodivision (Bomben and Sontheimer, 2008). Dans une autre étude, la suppression de TRPC1 par shRNA, ou le traitement avec SKF96365 de ces mêmes cellules, a entraîné une inhibition de la prolifération cellulaire et une division cellulaire incomplète (Bomben and Sontheimer, 2008). D'autres travaux ont démontré que la motilité des cellules D54MG stimulées par le facteur de croissance épidermique (EGF) est régulée par les canaux TRPC1, d'une manière qui dépend des protéines des couches lipidiques (Bomben et al., 2011).

Le TRPC6, un autre membre des TRPC, joue un rôle crucial dans la croissance cellulaire, dans le pouvoir clonogénique ainsi que dans la transition du cycle cellulaire en phase G2/M. Il a été démontré que son inhibition augmente les effets antiprolifératifs de la radiothérapie (Chigurupati et al., 2010). L'inhibition de TRPC6, par shRNA ou par l'expression de son mutant dominant-négatif (DNC6), abolit l'accumulation de la protéine HIF-1 α induite par l'hypoxie dans les cellules de glioblastome humain U251, via la promotion de son hydroxylation (Li et al., 2015, p. 6). Il a également été démontré que l'activation

hypoxique de TRPC6 contribue au métabolisme cellulaire via la régulation de l'expression du transporteur de glucose 1 (GLUT1) et de l'absorption du glucose (Li et al., 2015, p. 6). Dans une autre étude, la régulation hypoxique de l'expression de TRPC6 (via la signalisation Notch) a entraîné l'activation du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT), un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse des cellules de glioblastome (Chigurupati et al., 2010).

D'autre part, il a été montré qu'un certain nombre de canaux TRP-mélastatine (TRPM) sont impliqués dans la progression des glioblastomes. En effet, le canal TRPM7 favorise la prolifération et la migration des cellules de glioblastome A172, probablement par l'activation des voies de signalisation JAK2/STAT3 et Notch (Liu et al., 2014, p. 7). C'est aussi le cas du canal TRPM8 qui régule la migration des cellules de glioblastome DBTRG, via l'activation des canaux K^+ activés par le Ca^{2+} à grande conductance (ou canaux BKCa) membranaires (Wondergem and Bartley, 2009).

Les canaux TRP-vanilloïdes (TRPV) ont également des fonctions importantes dans les glioblastomes. En effet, l'activation du TRPV1 par la capsaïcine conduit à un influx de Ca^{2+} et à l'induction de l'apoptose dans les cellules de glioblastome humain U373, *via* l'activation de la MAPK p38 (Amantini et al., 2007). Il est à noter que dans le cadre d'une réponse anti-tumorigène, les cellules précurseurs de neurones migrent vers les cellules d'astrocytome de haut grade et activent les canaux TRPV1, hautement exprimés sur ces cellules, en libérant des endovanilloïdes. Cette activation entraîne la mort des cellules cancéreuses via l'activation du facteur de transcription 3 (ATF3) dépendant de la voie de stress du RE (Amantini et al., 2007, p. 1). L'activation du canal TRPV2 par le cannabidiol (molécule issue de la plante de cannabis) potentialise la chimio-sensibilité à la carmustine, au temozolomide et à la doxorubicine des cellules U87MG (Nabissi et al., 2013). Une autre étude a montré que TRPV2 régulait négativement la prolifération et la survie des cellules de glioblastome, ainsi que la résistance à l'apoptose induite par Fas et dépendante de la kinase ERK (Nabissi et al., 2010, p. 2).

I.5.3.4.4 Les récepteurs de l'inositol triphosphate (IP3)

Le récepteur IP3 (IP3R) est un récepteur-canal calcique situé sur la surface de réticulum endoplasmique qui, suite à des stimuli intracellulaires, active le relargage calcique vers le cytosol (Yoshida and Imai, 1997, p. 5). Dans les cellules de glioblastome, l'inhibition pharmacologique d'IP3R3 par la caféine, réduit l'invasion et la migration des cellules, et augmente la survie des sujets.

I.5.3.4.5 Les purinorécepteurs (P2X)

Il a été démontré que les membres des récepteurs P2X jouent un rôle dans différents types de cancer (Adinolfi et al., 2015). Dans les gliomes, plusieurs études ont mis en évidence le rôle des récepteurs P2X7. En effet, dans les cellules C6 de gliome de rat l'activation des récepteurs P2X7 favorise la migration cellulaire et l'expression de facteurs pro-inflammatoires (Wei et al., 2008). Dans une autre étude sur ces mêmes cellules, la suppression de l'activité des récepteurs P2X7 par l'utilisation d'antagonistes ou de shRNA induit la signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et la croissance des cellules *in vitro* et *in vivo*, ainsi que l'angiogenèse dans des modèles *in vivo* transplantés chez le rat (Fang et al., 2013). Curieusement, l'activation du récepteur P2X7 dans les cellules M059J radiosensibles, entraîne une augmentation de la mort cellulaire, amenant à le proposer comme gène prédictif de la radiosensibilité et de la probabilité de survie des patients atteints de glioblastome (Gehring et al., 2012, p. 7). D'autre part, il a été démontré que le récepteur P2X7 active la phosphorylation de ERK1/2 *via* l'activation de la tyrosine kinase Pyk2, de Src, de la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) et de la protéine kinase C (PKC), dans les cellules d'astrocytome 1321N1 (Gendron et al., 2003).

Chapitre II : Les venins de scorpions et leurs activités biologiques

Les venins de scorpion sont composés d'une variété de molécules dont des peptides, des protéines, des lipides, des nucléotides et des composés hétérocycliques (figure 7A). Les molécules responsables de la toxicité du venin de scorpion sont des peptides de 30 à 70 acides aminés, appelés toxines. Les toxines de scorpion peuvent interagir avec plusieurs cibles physiologiques, et de ce fait, elles peuvent exercer diverses activités pharmacologiques. En effet, à part le pouvoir neurotoxique des venins de scorpion, il a été démontré qu'ils contiennent des molécules qui possèdent de potentiels pouvoirs thérapeutiques, tels que des effets antiviral, antibactérien, antifongique, antiépileptique et anti-cancéreux (figure 7B) (Ghosh et al., 2019). En effet, depuis plusieurs décennies les recherches menées sur plusieurs toxines issues du venin de scorpion ont montré des activités très intéressantes sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses, en ayant comme cible des protéines impliquées dans la formation des tumeurs et leur survie.

III. 1. Mode d'action des toxines de scorpion

Les toxines de scorpion sont neurotoxiques. Grâce à leur grande affinité et à leur spécificité pour les canaux ioniques, elles peuvent troubler l'excitabilité des cellules nerveuses et provoquer des lésions neuronales importantes pouvant provoquer la mort. En effet, ces toxines ont montré des effets pharmacologiques, essentiellement *via* la modulation et/ou le blocage des canaux ioniques présents sur la surface de toutes les cellules excitables et non excitables. On peut classer les toxines de scorpion selon leur mode d'action et leurs cibles cellulaires. Nous pouvons distinguer quatre familles de canaux ioniques ciblées par les toxines de scorpion, à savoir les canaux sodium, les canaux potassium, les canaux calcium et les canaux chlore.

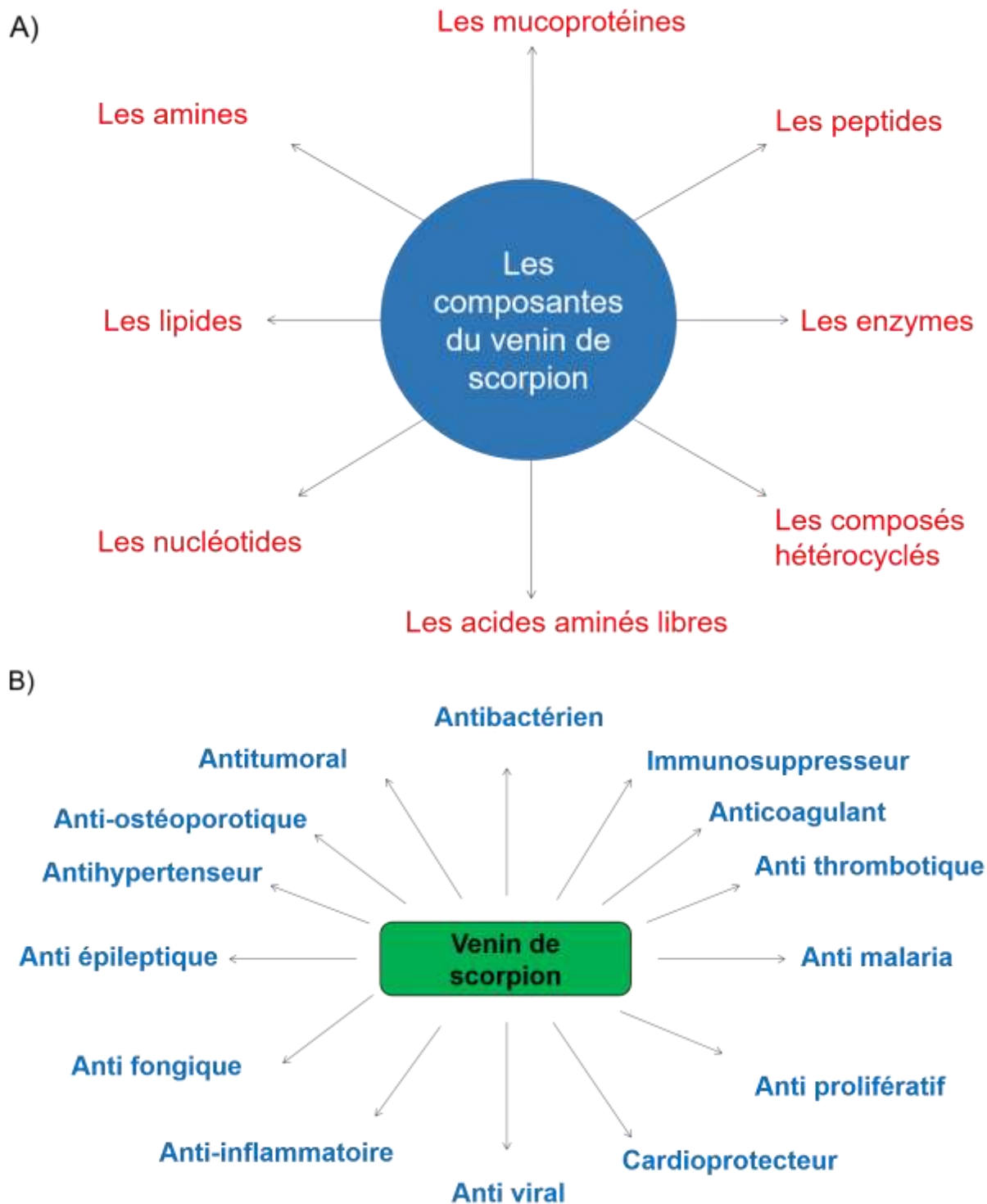


Figure 7: Les propriétés du venin de scorpion (Ghosh et al., 2019)

(A) Les composantes du venin de scorpion (B) les potentiels effets thérapeutiques du venin de scorpion

III.1.1 Interaction avec les canaux sodium

L'effet neurotoxique des toxines de scorpion est dû essentiellement à la perturbation des canaux sodiques. La famille des canaux sodiques est formée de neuf membres Nav1.1-Nav1.9. Ils forment un groupe de protéines très important chez les cellules excitables. En effet, leur activation dépolarise la membrane cellulaire et initie le passage du potentiel d'action dans les cellules neuronales (Kasimova et al., 2016). Les canaux sodiques sont constitués d'une sous-unité α associée à une ou deux sous-unités β , formant le pore du canal. Chaque sous-unité α a quatre domaines répétés, notés de I à IV, chacun contenant six segments transmembranaires (S1 à S6). Le segment S4 hautement conservé et riche en acides aminés basiques (chargés positivement), joue le rôle de capteur de voltage du canal (Isom, 2001).

Les toxines de scorpion qui ont une affinité pour les canaux sodiques sont appelées toxines longues car elles sont constituées de plus de 60 acides aminés. Elles sont divisées en deux groupes selon leur site d'interaction sur le canal : les toxines α qui se lient au site 3 impliquant des résidus du capteur de voltage du domaine IV et qui affectent principalement l'inactivation et les toxines β qui agissent sur le site 4 situé près du capteur de voltage du domaine II et qui affectent l'inactivation du canal et bloquent la progression du potentiel d'action.

III.1.2 Interaction avec les canaux potassiques

Les canaux potassiques sont présents chez pratiquement toutes les espèces, à l'exception de certains parasites. Ils possèdent des domaines transmembranaires (TM) qui traversent la bicouche lipidique et jouent un rôle crucial dans les cellules excitables et non excitables en transportant les ions K^+ des compartiments intra et extracellulaires. On peut classer les canaux potassiques en trois groupes selon leur structure et leur fonction : (i) les canaux dépendant du potentiel (Kv) (six TM), (ii) les canaux à 2 pores (K2P) (quatre TM) et (iii) les canaux à rectification entrante (Kir) (deux TM). Il y a aussi les canaux sensibles à des ligands (ligand gated K^+ channels), qui possèdent deux ou six TM et sont stimulés par divers messagers (Kuang et al., 2015).

Depuis des décennies, les chercheurs ont étudié l'interaction entre certaines toxines de scorpion et les canaux potassiques. Ces études ont permis aux chercheurs de mieux explorer les structures des canaux potassiques et leur classification (Zhao et al., 2019). Les bases de données protéiques décrivent plus de 250 toxines de scorpion qui agissent sur les canaux potassiques. L'interaction toxine-canal potassique repose principalement sur les interactions

électrostatiques et hydrophobes au niveau du pore de conduction du canal, plus précisément au niveau de l'embouchure externe ou la tourelle (figure 8) (Khan et al., 2018). Cette dernière est aussi le site de fixation de plusieurs bloqueurs chimiques tels que le tétra-éthyl-ammonium (TEA) (Meuser et al., 1999). En se fixant, la toxine inhibe le passage des ions à travers le canal, perturbant ainsi l'équilibre ionique et rompant la transmission des signaux électriques. Les toxines actives sur les canaux potassiques sont divisées en trois familles : (i) α -KTx (20-40 résidus), (ii) β -KTx (45-75 résidus) et (iii) γ -KTx, qui affectent un sous-ensemble particulier de canaux Kv, appelés canaux ERG.

La première famille, α -KTx, est celle qui regroupe le plus de toxines (plus de 200). Celles-ci présentent des similitudes structurales tel que l'emplacement des résidus cystéine qui forment les ponts disulfures et surtout le résidu lysine en position 27 qui semble jouer le rôle d'imitateur de l'ion K^+ et aide les toxines à se fixer dans le canal (Mouhat et al., 2008; Srairi-Abid et al., 2005; 2019) (figure 9).

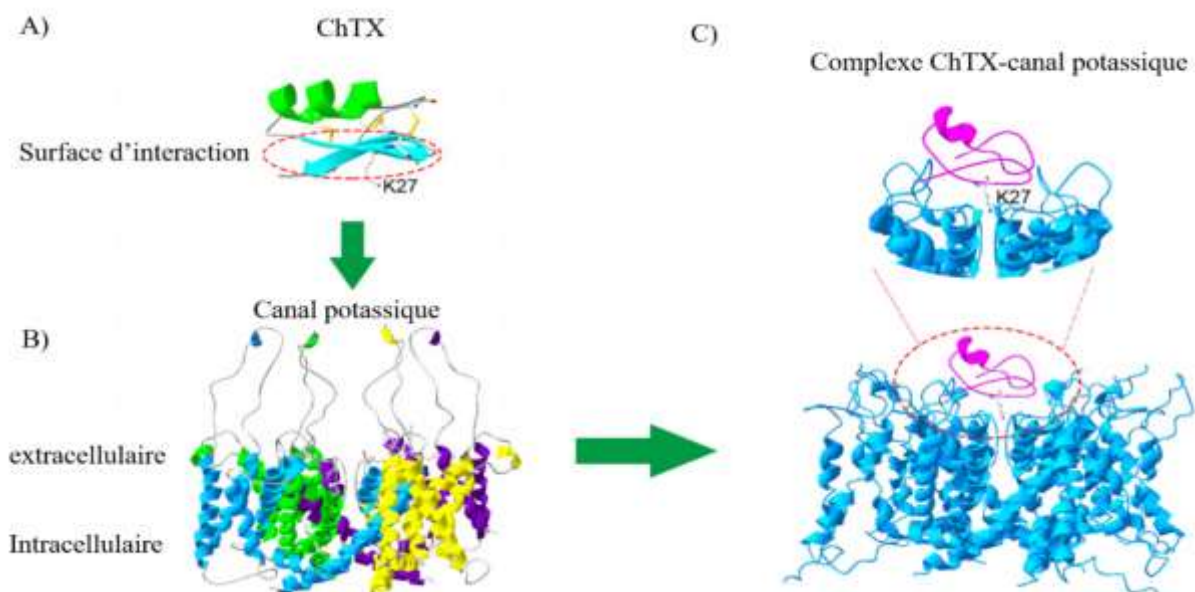


Figure 8 : Interaction entre une toxine de scorpion et un canal potassique
 (A) La charybdotoxine (ChTx) et sa surface d'interaction avec la lysine 27 (B) Le canal potassique avec tous ses domaines intra et extracellulaires (C) Formation du complexe ChTx-canal potassique.

```

α-Ktx1.1    ---QFTNVS TTSKE WSV QRL---HNTSR-GK-----MN--KK R YS-----
α-Ktx2.1    ---TIINVK TSPKQ SKP KEL---YGSSAGAK-----MN--GK K YNN-----
α-Ktx3.1    --GVEINVK SGSPQ LKP KDA---GMRFGK-----MN--RK H TPK-----
α-Ktx4.1    ---VFINAK RGSPE LPK KEA---IGKAA-GK-----MN--GK K YP-----
α-Ktx5.1    -----AF NLRM QLS RSL---GLL-GK-----IG--DK E VKH-----
α-Ktx6.1    -----LVK RGTSD GRP QQQ---TG PN-SK-----IN--RM K YG-----
α-Ktx7.1    -----TIS TNPKQ YPH KKE---TGYPN-AK-----MN--RK K FGR-----
α-Ktx8.1    -----VS ---ED PEH STQ---K---AQAK-----DN--DK V EPI-----
α-Ktx9.1    -----VG ---EE PMH KGK---N---AKPT-----DD--GV N NV-----
α-Ktx10.1   -----AV -VYRT DKD---KRRGYRS-GK-----IN--NA K YPYGK---S
α-Ktx11.1   --DEEPKES -SDEM VIY KGE---E---YSTG-----V DGPQ-K K SD-----
α-Ktx12.1   W ST LDLA GASRE YDP FKA---FGRAH-GK-----MN--NK R YT-----
α-Ktx13.1   -----A ---GS RKK---KGS-GK-----IN--GR K Y-----
α-Ktx14.1   ---TPFAIK ATDAD SRK-----PGN-PS-----RN--GF A T-----
α-Ktx15.1   --QNETNKK QGGS ASV RRV---IGVAA-GK-----IN--GR V YP-----
α-Ktx16.1   --DLIDVK ISSQE WIA KKV---TGRFE-GK-----QN--RQ R Y-----
α-Ktx17.1   -----QTQ QSVRD QQY-----LTP-D-----R SY--GT Y KTTGK-----
α-Ktx18.1   --TGPQTT -QAAM EAG---KGLGKSM-ES-----QG--DT K KA-----
α-Ktx19.1   -----AA -YSSD RVK---VAMGFSS-GK-----IN--SK K YK-----
α-Ktx20.1   -----G -TPEY SMW KVK---VSQ-NY-----V---KN K PGR-----
α-Ktx21.1   ---GKFGK -KPNI AKT QTE---KGKGM-GY-----NK--TE V SEW-----
α-Ktx22.1   EVDGRTATF -TQSI EES KRQ---NKN-GR VIEAEGSLIY--HL K Y-----
α-Ktx23.1   ---AAAIS VGSPE PPK RAQ---G KN-GK-----MN--RK K YY-----
α-Ktx24.1   -----VAK -STSE GHA QQ---AG RN-SG-----RY--GS I VG-----

α-Ktx26.1   --NFKVEGA --SKP RKY IDKGARN-GK-----IN--GR H YY-----
α-Ktx27.1   --QIDINVS RYGS D AEP KRL---K LLP-SK-----IN--GK T YPSIKIKNS
α-Ktx28.1   -----A VTHED TLL YDT---I---GT-----VD--GK K M-----
α-Ktx29.1   ---EGD PISEAIK VEK KEK-----VEV EP--GV K SG-----
α-Ktx30.1   ---EDKLK TKTDD AKY SQF-----TDVHPA LG--GY E LRWEGGIS-
α-Ktx31.1   ---AGSMDS SETGV MKA SER-IRQ-----VENDNK PA--GE I TT-----

```

Figure 9: Aligment des séquences peptidiques des premiers membres de chaque famille des α -KTx (Srairi-Abid et al., 2019)

III.1.3 Interaction avec les canaux calciques

L'équilibre de l'homéostasie calcique intracellulaire est primordial à la survie de la cellule. Cet équilibre est assuré grâce à deux phénomènes : l'échange calcique entre les compartiments intra et extracellulaire, assuré par les canaux calciques, et le relargage intracellulaire du calcium par le réticulum endoplasmique. Les canaux calciques peuvent être classés en deux familles : les canaux calciques voltage dépendants (Cav), dont l'activation dépend du potentiel membranaire et les canaux calciques voltage indépendants (CCDL), dont l'activation dépend de la fixation de ligands spécifiques (Spedding and Paoletti, 1992). Les Cav, qui comptent plus de 30 récepteurs répartis en six familles, sont les plus sensibles aux toxines des scorpions. En effet, quatre toxines ont été décrites actives sur le canal RyR1 (*Ryanodine receptor1*), qui sont l'Imperatoxine A (IpTxA), la Maurocalcine (MCa), l'Hemicalcine (HCa) et la Hadrucalcine (HdCa) issues des venins des scorpions *Pandinus Imperator* (el-Hayek et al., 1995), *Scorpio maurus palmatus* (Fajloun et al., 2000), *Hemiscorpius Lepturus* (Shahbazzadeh et al., 2007) et *Hadrurus gertschi* (Schwartz et al., 2009) respectivement. Toutes ces molécules présentent de grandes similitudes de séquence,

sont constituées de 33 à 35 acides aminés, réticulées par 3 ponts disulfures et présentent un caractère basique (figure 10) (Srairi-Abid et al., 2019).



Figure 10 : Aligment des séquences des peptides MCa, IpTxa, HCa et HdCa actifs sur le canal calcium RYR1 (Srairi-Abid et al., 2019).

D'autre part, on note aussi deux tetrapeptides issus du venin de scorpion *pandinus imperator* qui agissent sur le canal TRPC3, perturbant l'équilibre calcique intracellulaire (Shalabi et al., 2004). Un autre peptide (BmP01) du venin de scorpion *Mesobuthus Martensii* a montré une affinité pour le canal TRPV1 (Hakim et al., 2015).

III.1.4 Interaction avec les canaux chlore

Les canaux Cl⁻ sont activés par plusieurs stimuli intra et extracellulaires tels que l'excitabilité membranaire, le volume cellulaire, des ligands extracellulaires (GABA et glycine), des ions intracellulaires cationiques et anioniques et/ou par phosphorylation de résidus par des kinases intracellulaires (Saberbaghi et al., 2019). Ils permettent la perméabilité cellulaire aux ions chlore, ainsi que le passage d'autres anions tel que les ions HCO₃⁻, I⁻, SCN⁻ et NO₃⁻. Plusieurs études ont montré l'implication des différents canaux chlore dans des pathologies humaines telles que les maladies musculaires, rénales, osseuses et neuronales (Jentsch and Pusch, 2018)

Les canaux chlore possèdent 10 à 12 domaines transmembranaires structurés en hélices α et un segment intracellulaire. Les segments transmembranaires s'organisent pour former un canal fonctionnel qui permet l'entrée et la sortie des ions. Neuf canaux ClC ont été identifiés chez l'homme, répartis en 3 sous-familles selon leur localisation cellulaire, leurs propriétés de transport et leur homologie de séquence. La première sous-famille regroupe les canaux ClC-1, ClC-2, ClC-Ka et ClC-Kb, exprimés à la membrane plasmique. Les deux autres sous-familles regroupent des échangeurs 2Cl⁻/H⁺ exprimés dans les vésicules intracellulaires. La deuxième sous-famille regroupe les canaux ClC-3, ClC-4 et ClC-5 (80% d'homologie) situés sur les endosomes et les vésicules synaptiques et la troisième sous-famille regroupe les canaux ClC-6 et ClC-7 (45% d'homologie) qui se situent au niveau des lysosomes (Jentsch and Pusch, 2018; Verkman and Galiotta, 2009).

La première toxine identifiée comme bloqueur des canaux chlore est la chlorotoxine (ClTx) issue du venin de scorpion *Leirus quikestriatus*. Il s'agit d'un peptide de 36 acides aminés avec 4 ponts disulfures (Cohen-Inbar and Zaaroor, 2016). Depuis, plusieurs autres molécules appartenant à la famille des chlorotoxines (*chlorotoxin-like*) ont été identifiées, telle que AaCTx, BmK-CTa et GaTx1, issues respectivement des venins de scorpions *Androctonus australis* (Rjeibi et al., 2011), *Buthus martenzii* (Fu et al., 2005) et *Leiurus quinquestriatus* (Fuller et al., 2007). Ces toxines présentent de fortes similarités de séquence avec la ClTx (figure 11).

```

CTX      MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR---
ACTX     MCIPCFTTNPNMAAKCNACCGSR-RGSCRGPQCIC----
P2       -CGPCFTTDPYTDSKCATCCGGRGK--CVGPQCLCNRI-
I5A      MCMPCFTTDPNMAKKCRDCCGGNGK--CFGPQCLCNR--
BDI5     MCMPCFTTDPNMANKCRDCCGGGKK--CFGPQCLCNR--
IsI1    MCMPCFTTRPDMAQQCRACCKGRGK--CFGPQCLCGYD-
BDI4     MCMPCFTTDHNMAKKCRDCCGGNGK--CFGPQCLCNR--
BDI3     MCMPCFTTDHQTARRCRDCCGGRGRK-CFG-QCLCGYD-
GaTx1    -CGPCFTTDHQMDQKCADCCGGIGK--CYGPQCLCNR--
Bs-8     RCKPCFTTDPQMSKKCADCCGGKGGKCYGPQCLC----
Lqh8/6   RCGPCFTTDQQMTKKCYDCCGGKGGKCYGPQCICAPY-
BTIT X3  RCPPCFTTNPNMEADCRKCCGGRGY--CASYQCICPGG-
Bs 14    -CGPCFTKDPDTDKKCATCCGGIGR--CFGPQCLNRRGY
BTCh12  RCGPCFTTDPQTQAKCSDCCGRKGGV-CKGPQCI CGIQY
Bm12     -CGPCFTTDANMARKCRDCCGGIGK--CFGPQCLCNRI-
Bm12b   -CGPCFTTDANMARKCRDCCGGNGK--CFGPQCLCNRD-

```

Figure 11 : Alignement des séquences peptidiques de la chlorotoxine et de ses homologues chlorotoxin-like (Srairi-Abid et al., 2019)

III.2 Implication des canaux ioniques dans la cancérogenèse

L'équilibre ionique, assuré par les canaux a été rapportée dans plusieurs mécanismes physiopathologiques et surtout en oncologie. Certains chercheurs considèrent même que le cancer est une *channelopathie* (maladie très influencée par le fonctionnement des canaux ioniques). En effet, depuis la découverte de l'implication des canaux ioniques dans la cancérogenèse, plusieurs recherches ont mis la lumière sur l'importance des différents canaux dans le développement tumoral (Prevarskaya et al., 2018).

Ces études ont montré que certains gènes qui codent pour les canaux ioniques sont altérés lors d'une transformation oncogénique. Tel est le cas du cancer du sein (Ko et al., 2013), de l'adénocarcinome du poumon (Ko et al., 2014) et du gliome (Wang et al., 2015), où on a pu identifier 30, 37 et 18 gènes de canaux ioniques, respectivement, exprimés de façon différentielle par rapport aux tissus normaux et contribuant à des degrés divers aux caractéristiques physiopathologiques de chacun de ces cancers.

En outre, l'altération des gènes codant pour les canaux ioniques provoque des changements électrochimiques favorisant la transformation et la survie des cellules cancéreuses. Ainsi, plusieurs études ont montré que la survie, la prolifération, le volume cellulaire, l'adhésion et la migration des cellules tumorales sont directement régulés par les canaux ioniques. En particulier, il a été démontré que le mécanisme de croissance et d'invasion des cellules de gliome, passe principalement par l'efflux électrochimique de Cl^- et de K^+ , sous la forme de KCl , ainsi que par le relargage des molécules d'eau. Ceci entraîne un rétrécissement de la cellule, lui permettant d'envahir le tissu cérébral (McFerrin and Sontheimer, 2006). De même, la surexpression des GIRK (*G protein-activated inward rectifier potassium channel* (Kir3.1,)), une sous-famille des canaux K^+ , a également été démontrée dans les carcinomes mammaires humains primaires et dans des lignées cellulaires de cancer du poumon (Dhar and Plummer, 2006; Plummer et al., 2005). En effet, il a été démontré que la croissance des cellules du cancer du sein, dépend de la voie de signalisation des β -adrénorécepteurs, en raison de son couplage fonctionnel avec les canaux GIRK1 (Prevorskaya et al., 2010). House et al. ont montré que la sur-expression des canaux Nav1.5 dans le cancer du côlon favorise l'expression de plusieurs gènes tels que ADAM21, CCR9, et CD53, qui sont impliqués dans l'invasion cellulaire (House et al., 2010).

Cette forte influence des canaux ioniques et leur relation directe avec les toxines de scorpion suggèrent que ces toxines peuvent être des potentielles molécules thérapeutiques pour lutter contre différents types de cancer.

III.3 Activités anti cancéreuses des toxines de scorpion

Les travaux menés sur les toxines de scorpion ont montré d'importantes activités anti-tumorales *in vitro* et *in vivo*. Ces effets touchent différents aspects de la tumorigenèse telle que l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et/ou les voies de migration, d'adhésion, d'invasion et de la formation des métastases.

III.3.1 Inhibition des voies d'angiogenèse et de la formation des métastases

L'angiogenèse et la formation de métastases sont des phénomènes très importants dans le processus oncogénique puisqu'elles permettent aux cellules tumorales de migrer vers d'autres tissus et rendent le pronostic vital des personnes atteintes. Plusieurs molécules issues des venins de scorpion ont montré des activités intéressantes sur la migration, l'invasion et l'adhésion (facultés nécessaires à l'angiogenèse et à la formation de métastases) dont KAaH1 et KAaH2, deux peptides de 58 acides aminés chacun, purifiés du venin de scorpion

Androctonus australis hector (Srairi-Abid et al., 2005). Ce sont deux bloqueurs des canaux Kv1. KAaH1 est actif sur Kv1.1 et Kv1.3 et inhibe la migration et l'adhésion des cellules U87, tandis que KAaH2 est actif uniquement sur le canal Kv1.1 et inhibe la prolifération de U87 via la voie de signalisation de l'EGFR (Aissaoui et al., 2018). La chlorotoxine (ClTx), qui agit sur les canaux chlore (DeBin et al., 1993), a montré une capacité à inhiber la migration et l'invasion des cellules gliomateuses (Ullrich et al., 1998). Il est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et les barrières tissulaires pour se lier aux cellules de glioblastome sans affecter les cellules saines aux alentours. La chlorotoxine fait partie des molécules issues de venins animaux qui sont en phase clinique (Dardevet et al., 2015). Des études bien avancées ont montré que cette toxine peut se fixer sur la MMP-2. En effet, il semble qu'un complexe ClTx, canal ClC-3 et MMP-2 se forme et s'internalise à l'intérieur de la cellule dans une vésicule. Ce complexe réduit le nombre des canaux chlore sur la surface cellulaire et en même temps réduit le remodelage de la matrice cellulaire (phénomène nécessaire aux déplacements cellulaires), induisant l'inhibition de la migration et de l'invasion des cellules de glioblastome (Deshane et al., 2003; Othman et al., 2017). A ce jour, plusieurs peptides de type chlorotoxine, appelés aussi chlorotoxin-like, actifs sur les cellules gliomateuses ont vu le jour. Entre autres, l'AaCTx, isolé du venin de scorpion *Androctonus australis*, est un peptide de 34 acides aminés qui présente 70% de similarité avec la ClTx. Cette molécule inhibe la migration et l'invasion des cellules U87 en interagissant avec le canal ClC-3 et la MMP-2 (Othman et al., 2017; Rjeibi et al., 2011). BmKCT, du venin de scorpion *Buthus martensii Karsch* est une chlorotoxin-like qui agit sur la prolifération dans un modèle *in vivo* de glioblastome et prévient le développement des métastases. Le marquage de la BmKCT au Cy5.5 révèle que ce peptide attaque la masse tumorale *in situ* sans affecter le tissu sain (Fan et al., 2010).

III.3.2 Inhibition de la prolifération cellulaire et induction de l'apoptose

Plusieurs venins de scorpion tels que ceux de *Androctonus crassicauda*, *Androctonus bicolor*, *Androctonus australis*, *Leiurus quinquestriatus*, *Odontobuthus doriae*, et *Rhopalurus junceus* ont été testés sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses et ont montré un effet inhibiteur sur leur prolifération, soit par arrêt du cycle cellulaire soit par induction de l'apoptose. De même, le fractionnement de ces venins a permis l'identification des molécules responsables de ces effets (Mikaelian et al., 2020). On peut citer à titre d'exemples :

- La BmK AGAP, un peptide isolé du venin *Mesobuthus martensii*, qui a montré un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules SW480 d'adénocarcinome du colon humain, en

induisant l'apoptose. Il était capable de réguler positivement l'expression de p27 conduisant à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire. Il inhibe également l'activation de Bcl-2, de la PI3K et de Akt, et améliore la production de Bax et de PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) dans les cellules SW480 (Dueñas-Cuellar et al., 2020).

- La BmKn-2, un autre peptide du même venin, inhibe la viabilité des cellules squameuses orales (HSC-4) en induisant l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par l'activation de la caspase initiatrice 9 et les caspases effectrices 7 et 3 et en désactivant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Tong-ngam et al., 2015).
- La Gonearrestide est un peptide de 18 acides aminés isolé du venin *Androctonus mauritanicus* qui agit sur la prolifération des cellules HCT116 du cancer du côlon. Cette toxine induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, en activant les molécules PIP3 et PTEN entraînant l'inhibition de la voie Akt (Li et al., 2018).
- L'Iberitoxin (IbTX) du venin de scorpion *Buthus tamulus* induit l'arrêt de la prolifération des cellules Hela et A2780 du cancer de l'ovaire humain en bloquant les canaux potassium activés par le calcium (KCNMA1) (Han et al., 2007; Ramírez et al., 2018).
- La Margatoxine (MgTx) est une α -KTx de 39 acides aminés purifiée à partir de venin de scorpion *Centruroides margaritatus*. Ce peptide agit sur la prolifération des cellules A549 de l'adénocarcinome des poumons en bloquant les canaux Kv1.2 et Kv1.3. Le blocage de Kv1.3 par MgTx provoque également une réduction du volume tumoral dans un modèle de xénotgreffe utilisant des souris nude (Jang et al., 2011).
- La tamapine, isolée du venin *Mesobuthus tamulus*, agit sur les canaux KCa2.2 et sa forme recombinante induit l'apoptose chez les lignées cellulaires Jurkat E6-1 (cellules T lymphoblastiques) et les cellules MDA-MB-231 du cancer du sein. Elle induit aussi une légère toxicité sur les cellules saines lymphocytaires aux mêmes concentrations (Ramírez-Cordero et al., 2014).

Toutes ces molécules présentent des activités intéressantes qui peuvent être exploitées dans les thérapies anti-cancéreuses. Néanmoins, leur structure moléculaire peut être handicapante une fois injectées dans l'organisme. En effet, des paramètres thérapeutiques essentiels comme le temps de demi-vie, le pouvoir de passer la barrière hématoencéphalique, la possibilité d'entrer dans le compartiment intracellulaire et bien d'autres caractéristiques sont primordiales pour certaines molécules afin d'exercer leurs effets convenablement. D'autre part, les fournir en quantité importante présente un handicap sérieux pour leur utilisation à des fins thérapeutiques car leur synthèse chimique ou génétique ne permet souvent pas de retrouver la même activité. Très récemment, un tetrapeptide désigné AaTs-1, a été isolé du

venin de scorpion *Androctonus australis* (Aissaoui et al., 2021). Ce peptide inhibe la prolifération des cellules U87 avec une IC_{50} de 0,5 mM sans montrer de cytotoxicité. AaTs-1 bloque le récepteur FPRL-1 (*Formyl Peptide Receptor like-1*), entraînant une diminution du calcium intracellulaire. En effet, le récepteur FPRL-1 est un médiateur des ions calcium et son inhibition entraîne un blocage de la voie PLC/IP3, provoquant une diminution du relargage calcique au niveau du réticulum endoplasmique. Le peptide AaTs-1 a montré une meilleure activité antiproliférative sur la lignée U87 que sur d'autres lignées de glioblastome, en augmentant significativement l'expression de P53 faiblement exprimée dans cette lignée cellulaire. En plus, ce peptide agit sur la phosphorylation des protéines ERK1/2, P38 ET JNK. La diminution de la phosphorylation de ces protéines provoque une inhibition des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire.

Malgré son effet intéressant contre le glioblastome qui est une maladie qui demeure incurable, et le fait qu'il représente l'un des rares antagonistes des récepteurs FPRL-1, AaTs-1 demeure un peptide faiblement actif, en comparaison d'autres peptides de scorpion. En effet, son IC_{50} sur la prolifération des cellules U87 est de l'ordre du millimolaire. En plus il présente une faible affinité pour son récepteur par rapport aux autres molécules agonistes et antagonistes de FPRL-1, tels que la molécule WKYMVm qui est un agoniste qui agit à $1\mu\text{M}$ (Bae et al., 2003). Ainsi, des modifications structurales s'imposent pour améliorer son activité.

Cette approche est une étape très importante dans le domaine du « drug design » ou conception de médicament. Elle inclut plusieurs disciplines qui sont en perpétuel développement. Nous allons aborder dans le paragraphe suivant une des stratégies suivies dans cette discipline.

Chapitre III : Conception de substance pharmacologiquement active

IV.1 Introduction

La conception de substance pharmacologiquement active est un processus qui passe par plusieurs phases d'activité complémentaires tels que les modèles computationnels, expérimentaux et cliniques (Zhou and Zhong, 2017). Les molécules naturelles peuvent montrer des activités *in vitro* intéressantes, mais présenter souvent des défauts structuraux qui peuvent conduire à une inefficacité dans les modèles animaux ou même dans les étapes d'essai clinique. Afin de remédier à ces obstacles, plusieurs stratégies peuvent être adoptées. Certaines modifications structurales peuvent être introduites aux molécules naturelles afin d'améliorer leur stabilité dans l'organisme, augmenter leur affinité pour leur cible et renforcer leur sélectivité (Ferreira et al., 2018). Ce processus se base sur la structure de molécules déjà identifiées.

L'une des méthodes utilisées dans la synthèse des agents thérapeutiques est la conception des peptidomimétiques. Ce sont des composés qui imitent un peptide ou une protéine naturelle et qui conservent la capacité d'interagir avec la cible biologique et de produire la même activité biologique (Vagner et al., 2008). Les molécules peptidomimétiques peuvent se présenter sous plusieurs formes. Leur classification est basée sur les similarités structurales et fonctionnelles avec la molécule naturelle. Leur structure peut varier de molécules strictement similaires avec la molécule native à des molécules tout à fait différentes des peptides naturels, mais qui montrent une activité pharmacologique similaire (Lenci and Trabocchi, 2020).

Une autre méthode de conception des molécules thérapeutiques a montré son efficacité dans l'amélioration des molécules naturelles et nous intéresse dans notre étude. Il s'agit de la synthèse des molécules de types dendrimères. Ce sont des molécules hyperbranchées dans lesquelles on peut ancrer différentes molécules, soit pour multiplier le motif actif d'une molécule, soit pour associer différents motifs de plusieurs molécules actives. Les dendrimères ont une structure spatiale unique qui leur permet d'acquérir les différents aspects des autres molécules. Cela leur permet une meilleure diffusion dans les tissus corporels, une résistance aux enzymes dégradantes et la faculté à se lier aux cellules. Tous ces avantages ont accru l'intérêt scientifique des dendrimères dont l'utilisation ne cesse d'augmenter depuis plusieurs décennies (Sapra et al., 2019).

IV.2 Les dendrimères

IV.2.1 Définition

Le mot dendrimère a une origine grecque, « *dendron* » qui signifie arbre. Ce sont des macromolécules de polymères globulaires possédant une structure tridimensionnelle ramifiée dont la synthèse fut introduite pour la première fois par Buhleier qui les a défini de "molécules de cascade" (BUHLEIER et al., 1978). Pendant les années 80, Tomalia a mis en place les poly(amidoamines) ou PAMAM qu'il a nommés dendrimères. Depuis, leur chimie a été explorée par plusieurs chercheurs et d'autres modèles de dendrimères ont été mis en place (Tomalia et al., 1985). Les dendrimères ont une structure différente des molécules linéaires puisqu'ils sont organisés en branchements. Ils sont composés de l'intérieur vers l'extérieur : (i) d'un cœur central qui peut être formé par un seul résidu ou une séquence de molécules liées (ii) un ensemble de groupements répétitifs qui forment les branchements nécessaires (appelés dendrons) qui définit le nombre de générations de la molécule (iii) et une dernière partie qui forme l'extrémité de la molécule qui comporte des séquence répétitive d'une

molécule précise (Sapra et al., 2019). Le nombre de générations (maximum 13) est proportionnel au nombre de résidus terminaux, à la taille et à la masse de la molécule. A partir de la troisième génération, le dendrimère peut prendre une forme sphérique (Lazniewska et al., 2012a).

IV.2.3 Les différents types de dendrimères

Les dendrimères représentent une grande famille qui regroupe plusieurs types de molécules (figure 13). Ces molécules sont utilisées dans diverses applications thérapeutiques et biomédicales et présentent des propriétés distinctes dues à leur structure unique. Les familles les plus communément utilisées dans le domaine biomédical sont les polyamidoamines (PAMAM), les polypropylèneimines (PPI), les poly-L-lysines (PLL) (Lazniewska et al., 2012b, p.).

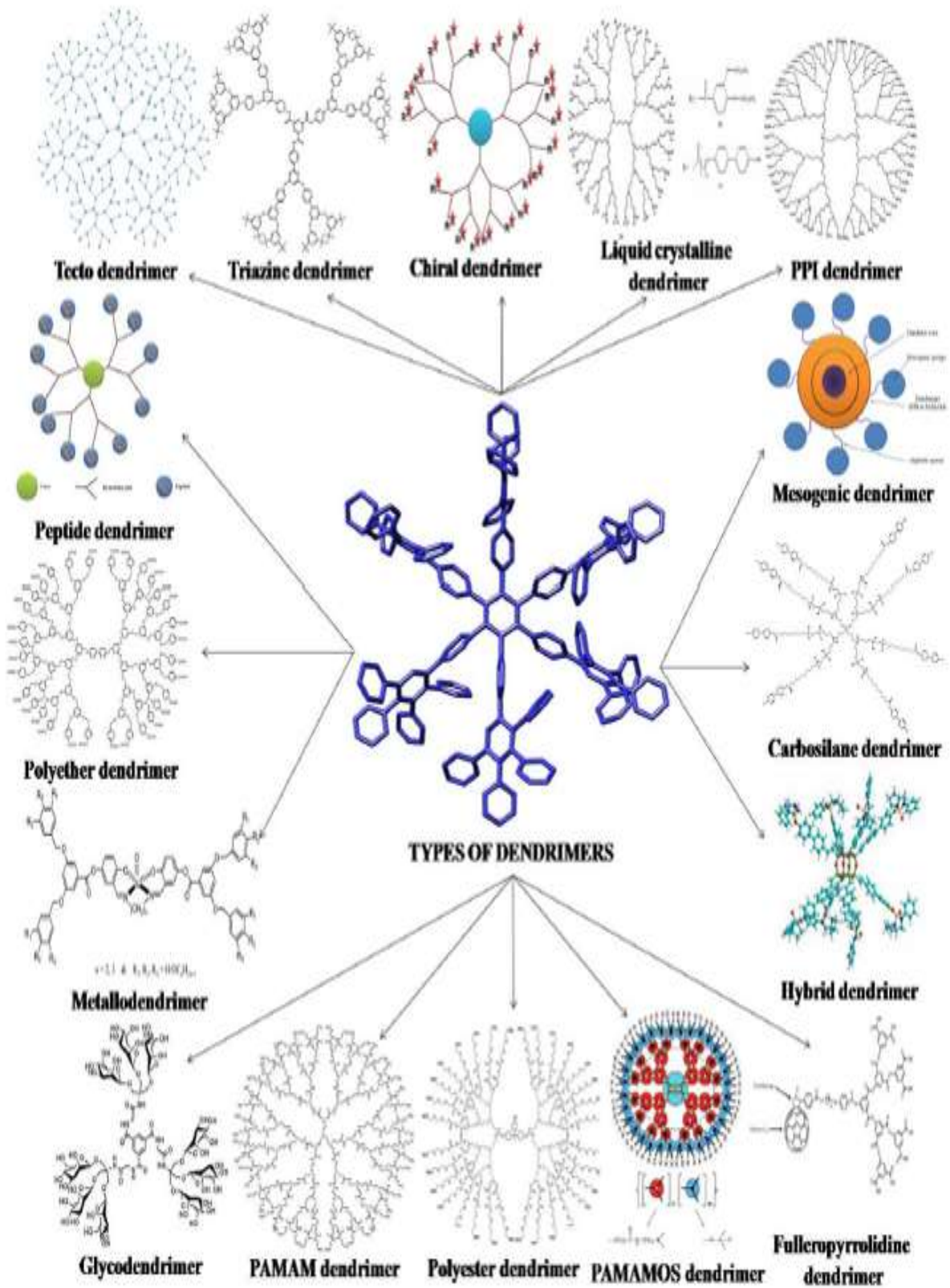


Figure 12 : Les différents types de dendrimères (Kesharwani et al., 2014)

IV.2.3.1 Les dendrimères de type polyamido-amine

Les dendrimères de polyamido-amine (PAMAM) ont été mis au point par Tomalia et ses collaborateurs au début des années 1980 en utilisant la méthode divergente. Ces polymères sont les plus étudiés. Depuis leur première synthèse, un large éventail d'applications potentielles des PAMAM est rapidement apparu. Leur structure est généralement basée sur un noyau d'ammoniac ou d'éthylène diamine auquel des branches monomères sont attachées, tandis que les groupes fonctionnels sont situés à la périphérie de la macromolécule. Les générations complètes (G1, G2, G3, etc.) de dendrimères PAMAM sont terminées par des groupes NH₂ et portent une charge positive donnant à la molécule un caractère anionique (Medina and El-Sayed, 2009). Depuis l'apparition de la structure PAMAM typique, de nombreuses modifications ont été apportées à l'architecture de ces dendrimères. En effet, plusieurs fonctions, à savoir le diaminobutane (DAB), le diaminohexane, le diaminododécane et la cystamine sont également utilisés comme noyau (Svenson and Tomalia, 2005). La surface des PAMAM peut être fonctionnalisée pour modifier leurs caractéristiques. À titre d'exemple, la conjugaison avec le PEG réduit la génération de ROS, la perturbation du potentiel de la membrane mitochondriale et l'apoptose des cellules traitées induites par le PAMAM (Wang et al., 2009). En outre, des études sur l'extinction des gènes par le PAMAM G5 ont révélé que l'acétylation de ce dendrimère conduit à une diminution de sa cytotoxicité envers les cellules du glioblastome U87. Il est important de noter que les PAMAM acétylés présentent une efficacité de diffusion ciblée du siARN comparable à celle des PAMAM non modifiés (Waite et al., 2009).

IV.2.3.2 Les dendrimères de type polypropylèneimine

Les dendrimères polypropylèneimine (PPI) sont les plus prometteurs comme molécules thérapeutiques potentielles. Les premières synthèses ont été initiées en 1978 par Buhleier et ses collaborateurs, mais ce n'est qu'à partir de 1993 que leur synthèse à grande échelle a été possible (de Brabander-van den Berg and Meijer, 1993). Leurs noyaux sont généralement composés soit de EDA, soit de DAB et leurs terminaisons peuvent se composer de fonctions amines ou de fonctions carboxyliques. L'efficacité des dendrimères PPI a été prouvée en tant que molécules de transport et leur modification par d'autres résidus peut améliorer leurs effets et réduire leur potentielle toxicité. Par exemple, les dendrimères PPI enrobés de galactose et conjugués au phosphate de primaquine (médicament anti-paludique) ont montré une meilleure efficacité sur les cellules hépatiques que les dendrimères non enrobés et un meilleur effet que le médicament seul. Ce système a montré de meilleures

capacités d'encapsulation et une toxicité moins évidente que les dendrimères non enrobés de galactose (Bhadra et al., 2005).

IV.2.3.3 Dendrimères à base de poly-lysine

Les dendrimères à base de poly-lysine sont des polymères peptidiques, dont la synthèse est basée sur un échafaudage de poly-lysine. Avec ses groupes α - et ϵ -amino sur la chaîne latérale, la lysine est un monomère idéal pour créer des points de ramification (branchements) sur lesquels les séquences peptidiques des épitopes peuvent être attachées (figure 12). Généralement les dendrimères poly-lysine ne dépassent pas les 3 générations du fait de leur toxicité dues aux charges positives dominantes de ces molécules. Ce type de polymère a été introduit par J.P. Tam dans les années 1980 (J. P. Tam, 1988) et est utilisé pour de nombreuses applications biologiques. Comme les autres dendrimères, les poly-lysines peuvent être synthétisées en utilisant aussi bien la stratégie divergente que convergente. La première approche s'appuie entièrement sur la méthode SPPS, tandis que la seconde utilise diverses formes de conjugaison chimique, par exemple les ligations thioéther, oxime ou hydrazone (Kowalczyk et al., 2011).

IV.2.4 Propriétés des dendrimères

IV.2.4.1 La biocompatibilité

Les dendrimères ont apporté des progrès considérables dans le domaine des thérapies basées sur les molécules synthétiques grâce notamment à leur taille, de l'ordre du nanomètre (entre 1 et 100 nm). Ainsi, ils peuvent interagir efficacement et spécifiquement avec les composants de la cellule tels que les membranes plasmiques, les organites cellulaires (endosomes, mitochondries, noyau). Ils présentent la capacité de se lier aux membranes cellulaires et nucléaires grâce aux charges positives sans apporter un effet cytotoxique ni des réactions immunigènes. Ils sont généralement dotés de propriétés hydrophiles et liposolubles (Munavalli et al., 2019).

IV.2.4.2 Propriétés pharmacocinétiques

Les propriétés pharmacocinétiques d'une molécule sont évaluées suite à son administration dans l'organisme et représentent l'ensemble des propriétés physico-chimiques lui permettant d'exercer son effet suivant la posologie adaptée. En plus des effets pharmacologiques intéressants, les molécules thérapeutiques doivent aussi présenter des propriétés qui leurs permettent d'échapper aux mécanismes de défenses de l'organismes. Les dendrimères ont la capacité de renforcer les propriétés pharmacocinétiques des molécules

reliées, mais aussi peuvent les altérer dans certains cas. Ainsi, Il est nécessaire, après la conjugaison des molécules à un système dendrimérique, de vérifier leur activité (Abbasi et al., 2014).

IV.2.4.3 La multivalence

Les groupements terminaux ajoutés aux molécules dendrimériques sont divers et sont responsables des propriétés du polymère. Ils forment une gaine de groupements fonctionnels permettant à la molécule d'interagir avec l'environnement adjacent. Les dendrimères offrent aux ligands monomériques se trouvant à leur surface une possibilité de multi-présentation pour leur cible. Cette notion d'affinité est appelée avidité. Les dendrimères peuvent améliorer les activités observées chez les monomères en se fixant sur plusieurs cibles simultanément alors se fixer sur des types de récepteurs inadaptés pour des monomères (Hayder et al., 2011).

IV.2.5 Les applications biomédicales des dendrimères

Depuis leur conception, les dendrimères ont suscité un grand intérêt chez les chercheurs du fait de leur capacité à améliorer le pouvoir des monomères. Ils sont utilisés dans plusieurs domaines biologiques et possèdent des activités antivirales, antibactériennes et anticancéreuses. Leur utilisation peut se faire en tant que molécule de conjugaison, de systèmes de transport d'autres molécules incapables de circuler dans l'organisme ou bien de passer les différentes barrières biologiques, de.

IV.2.5.1 Applications antivirales

L'activité des dendrimères dans ce domaine repose principalement sur l'interférence ciblant les interactions virus-cellule hôte. En effet, les dendrimères présentant une activité antivirale ont généralement la faculté de se lier soit aux récepteurs de la membrane cellulaire, soit directement sur le virus, ce qui a pour effet d'empêcher le contact du virus avec la cellule hôtes et diminuer son infectivité.

Les glycodendrimères, qui ont des groupements résiduels de glucides à leurs extrémités, sont les plus couramment utilisés comme antiviraux (Ramos-Soriano and Rojo, 2021). Le virus pour lequel cette approche a été la plus étudiée est la grippe. L'hémagglutinine (HA) virale est le médiateur de l'attachement cellulaire du virus de la grippe à la membrane via les résidus d'acide sialique présents sur des glycoprotéines de surface. En effet, de nombreuses études ont mis le point sur la capacité de diverses molécules de glycodendrimers conjugués à des agents antiviraux d'inhiber la liaison de la HA aux cellules. Cette inhibition

est plus importante que celle observée avec les molécules antivirales monomériques. (Hatano et al., 2013; Niederhafner et al., 2008).

Un autre dendrimère de type poly-lysine sulfoné avec un noyau benzhydrylamine été évalué contre les virus intravaginaux HSV et le virus chimérique SIV/HIV. Ce dendrimère inhibe l'absorption, l'infection et la synthèse de l'ADN viral (Price et al., 2011; Viera et al., 2010). VivaGel®, un dendrimère connu aussi sous le nom SPL7013, contient une surface polyanionique responsable du contact avec le virus, bloquant ainsi la liaison/l'absorption du virus par les cellules et empêchant l'infection. Ce dendrimère anionique, de type G4-poly-lysine avec 32 groupes naphthalène disulfonate sur la surface, possède une puissante activité microbicide vaginale topique et empêche la transmission de l'herpès génital (HSV-2), du VIH et d'autres infections sexuellement transmissibles (p. papillomavirus) (Price et al., 2011; Viera et al., 2010). Cet agent (VivaGel®) est même utilisé dans les préservatifs vendus dans certains pays comme le Japon, l'Australie et le Canada, est aussi étudié pour son activité contre d'autres virus sexuellement transmissibles, tels que le virus Zika (Falanga et al., 2021).

IV.2.5.2 Applications antibactériennes

Une classe intéressante de dendrimères, possédant des propriétés antimicrobiennes efficaces, sont les dendrimères peptidiques antimicrobiens (AMPD) (Tabatabaei Mirakabad et al., 2019). L'un des caractères principaux de l'activité antibactérienne des dendrimères AMPD est l'interaction électrostatique entre les charges positives du dendrimère et la surface membranaire négative des bactéries qui engendre une perméabilisation progressive de la couche lipidique. Ils possèdent également des résidus hydrophobes pour l'ancrage et la désintégration de la membrane (Falanga et al., 2021). Il a été rapporté que les AMPD sont plus résistants à la protéolyse et entraînaient moins d'hémolyse que les peptides antimicrobiens (AMP) en raison de leur structure en forme de globule fondu (Tabatabaei Mirakabad et al., 2019). Plusieurs exemples de dendrimères antibactériens ont été étudiés et caractérisés. On peut citer, comme exemple, le dendrimère poly-lysine nommé G3KL, composé de lysines et de leucines, qui possède une activité intéressante sur des bactéries comme *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*, multi-résistantes aux antibiotiques (Stach et al., 2014).

La conjugaison d'antibiotiques aux dendrimères a aussi montré son efficacité. En effet, les travaux de Choi et al. ont montré que l'association de la vancomycine à un système de dendrimère PAMAM (G5) a augmenté l'avidité de l'antibiotique face aux bactéries Gram positif résistantes (Choi et al., 2013). Dans une autre étude, Shaunak et al. ont exploré

l'utilisation de la conjugaison dendrimère-glucosamine PETIM contre un large spectre de maladies diarrhéiques infectieuses, dont *E. coli*, *salmonella typhi* et *Clostridium difficile*. Ils ont aussi rapporté des propriétés inhibitrices du PETIM-DG sur les lésions épithéliales de la paroi intestinale induites par *Shigella* chez le lapin en minimisant l'invasion bactérienne et en réduisant l'expression locale des cytokines impliquées dans la réaction inflammatoire (Teo et al., 2012).

IV.2.5.3 Applications anti-tumorales

L'activité antitumorale des dendrimères est basée sur la conjugaison et le transport de molécules chimiothérapeutiques. En effet, cette capacité de transport offre aux dendrimères, un avantage et constitue une stratégie importante dans la thérapie du cancer. Certaines particularités des dendrimères sont dues à leurs structures différentes et aux fonctionnalités spécifiques de leurs surfaces. En effet, les propriétés physicochimiques des dendrimères, leurs permettent une solubilité et un accès assez facile aux différents tissus de l'organisme, font des dendrimères des supports idéaux pour divers médicaments anticancéreux (Chis et al., 2020).

Les dendrimères transportent des molécules actives en utilisant diverses stratégies telles que :

- i- les interactions physiques basées sur l'inclusion du principe actif dans la structure centrale du dendrimère par le biais d'associations non covalentes, liaisons hydrogène et interactions hydrophobes ou électrostatiques.
- ii- les interactions chimiques, impliquant la conjugaison covalente des médicaments avec les groupes terminaux fonctionnels des dendrimères.

Quelques exemples de complexes dendrimères/molécules anti-tumorales

Le paclitaxel (PTX), la camptothécine (CPT), le méthotrexate (MTX), le 5-fluorouracile (5-FU) et la doxorubicine (DOX), présentent une faible hydrosolubilité et une forte toxicité non spécifique, deux inconvénients majeurs pour l'effet anti-tumoral. Leur conjugaison avec des molécules de dendrimères a été considérée comme une stratégie prometteuse (Chis et al., 2020).

- La doxorubicine (DOX), utilisée dans le cancer du poumon et les tumeurs cérébrales, a été conjuguée à des dendrimères PAMAM de cinquième génération *via* des liaisons acylhydrazone à la surface du dendrimère. Cette conjugaison a permis d'augmenter l'efficacité thérapeutique et la spécificité d'action, en dirigeant le dendrimère DOX-PEG-PAMAM vers le site tumoral tout en augmentant sa biocompatibilité (Zhong and da Rocha, 2016).

- Le paclitaxel (PTX) a été conjugué à un dendrimère PAMAM G4 par l'intermédiaire d'un lien peptidique GFLG (glycine-phénylalanine-leucine-glycine) pour le traitement du cancer du sein. Le conjugué dendrimérique augmente la spécificité et la cytotoxicité par rapport à la molécule de PTX seule (Satsangi et al., 2014). Pour le cancer gastro-intestinal, le PTX a été conjugué à un dendrimère PAMAM-G4-DHA greffé de l'acide docasahexanoïque. Pour ce type de conjugaison, une augmentation de l'activité pharmacologique sur la lignée cellulaire AGS du cancer gastrique a été démontrée, par rapport à la molécule seule (Dichwalkar et al., 2017). D'autre part, l'activité cytotoxique sur le néoplasme ovarien d'un conjugué PAMAM dendrimère-PTX biotinylé a été évaluée sur des cellules OVCAR-3 et HEK293T. L'amélioration de l'efficacité du complexe par rapport au médicament seul a été démontrée. En effet, les résultats obtenus confirment que le complexe PAMAM dendrimère-PTX biotinylé améliore la pharmacocinétique en augmentant l'absorption cellulaire avec une cytotoxicité réduite (Yao and Ma, 2018).
- Le cisplatine (CIS), utilisé dans les néoplasmes mammaires et ovariens, a été conjugué à la molécule active d'herceptine et à l'acide diglycolamique (DGA) dans un complexe dendrimérique de type herceptine-DGA-G4-CIS. Des études *in vitro* de l'effet de ce complexe sur des lignées de cellules cancéreuses ovariennes humaines HER-2 ont montré que le complexe présente des caractéristiques remarquables, diminuant la concentration inhibitrice demi-maximale et augmentant l'apoptose des cellules néoplasiques, en corrélation avec l'augmentation de l'absorption cellulaire par rapport à la molécule CIS seule. Les résultats ont confirmé ainsi que l'association CIS herceptine dans ce conjugué offre une plus grande spécificité d'action que les deux molécules seules (Chis et al., 2020).

Contexte et objectifs du travail

La molécule la plus utilisée chez les patients de glioblastome est le TMZ, qui est un agent alkylant et qui agit en méthylant les sites N⁷ et O⁶ des résidus de guanine au niveau de l'ADN, provoquant ainsi l'apoptose des cellules cancéreuses (Duwa et al., 2019). Cette molécule, associée à la radiothérapie et la chimiothérapie, a montré une amélioration du pronostic vital des patients (Stupp et al., 2009). D'autres stratégies de traitement sont parfois adoptées telles que l'immunothérapie représentée par le bevacizumab qui agit spécifiquement sur le récepteur du VEGF. Toutefois ces molécules montrent une amélioration modeste de la médiane de survie. L'inefficacité des thérapies actuelles, traduite par le pourcentage de survie des patients qui demeure très faible, incite à chercher de nouvelles alternatives.

Les venins de scorpions représentent une source importante de molécules bioactives. En effet, plusieurs molécules telles que la chlorotoxine (en stade trois des essais cliniques) et ses homologues (chlorotoxines-like) ont montré une activité anti-invasive et anti-migratoire sur la lignée cellulaire U87 du glioblastome en interagissant avec le canal chlore CLC3 et avec la métalloprotéase MMP-2 (Dardevet et al., 2015). Ces molécules sont composées d'environ 40 acides aminés et réticulées par 4 ponts disulfure.

Deux objectifs sont visés par nos travaux de recherche :

- * le premier consiste en la recherche, la purification et la caractérisation des molécules de faibles masses moléculaires dans le venin de scorpion tunisien *Androctonus australis hector* actives sur la tumorigenèse des cellules U87 de glioblastome. En effet, les molécules de faible masse moléculaire présentent des propriétés physicochimiques leurs permettant d'avoir une stabilité dans l'organisme et de passer la barrière hématoencéphalique. En plus, leur synthèse est plus simple et aboutit à des molécules aussi actives que les natives.

- * le deuxième objectif consiste en la conception des molécules plus actives en se basant sur les structures des peptides isolés du venin de scorpion. En effet, l'ingénierie des molécules bioactives en apportant les modifications structurales comme l'amidation et les l'acétylation des terminaisons C et N terminales et les synthèses de nouveaux modèles tel que les dendrimères peuvent nous permettre de réaliser une étude de la relation structure- fonction et éventuellement améliorer l'activité de ces molécules.

Matériels et méthodes

I. Matériels biologiques

- Les scorpions *Androctonus australis hector* (Aah) proviennent de la région de Beni Khedach (Tunisie). Ils sont élevés au serpentarium de l'Institut Pasteur de Tunis, secteur de Sokra et leur venin est extrait par le service vétérinaire à l'aide de chocs électriques 15V et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.
- Les cellules U87 proviennent de l'*American Type Culture Collection* (ATCC), généreusement fournies par Pr. José Luis de l'institut de neurophysiopathologie de Marseille et Pr. Khadija Essafi-Benkhadir de l'Institut Pasteur de Tunis.
- Le sérum de veau foetal (SVF), la L-glutamine et la pénicilline/streptomycine sont achetées à la société GIBCO (Cergy-Pontoise, France).
- Le fibrinogène provient de Sigma-Aldrich et la fibronectine humaine est fournie par Chemicon.
- Les anticorps primaires anti-P-ERK, P-AKT, β -actine et vinculine proviennent de la compagnie *Cell signaling* ; P53 de chez R&D Systems (USA, Canada) et FPRL de Sigma-Aldrich. Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris sont fournis par Promega.
- Les acides aminés et les résines utilisés pour les synthèses peptidiques sont fournis par Sigma-Aldrich.

II. Extraction du venin de scorpion *Androctonus australis hector*

Le venin brut est traité à l'eau milliQ refroidie à 4°C (1V/4V). L'extrait est centrifugé à 3500 rpm pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est récupéré pour les étapes de purification protéique.

III. Méthodes chromatographiques de purification

III.1 Chromatographie liquide à basse pression en exclusion stérique

Principe : La chromatographie d'exclusion ou tamisage moléculaire, est une technique de séparation des protéines selon leur taille en utilisant une phase stationnaire composée d'un gel poreux.

Les protéines de grande taille sont exclues du gel, et donc éluées en premier, contrairement aux protéines de petite taille qui pénètrent dans les pores. Plus la taille de la protéine est grande plus le temps de l'exclusion est faible.

Protocole : Le venin brut *Androctonus australis hector* est fractionné dans une colonne (2,6 x 100 cm ; Pharmacia, Uppsala, Suède) remplie de gel Sephadex G50 et

équilibrée par l'acide acétique 10%. La colonne est reliée à une pompe péristaltique Pump P-1 (Amersham Biosciences, Piscataway, Etats-Unis d'Amérique) et à un collecteur automatique de fractions Frac-920 (Amersham Biosciences, Piscataway, Etats-Unis d'Amérique). Le débit de l'élution est de 18 ml/h et le volume de chaque tube collecté est de 3 ml.

Les différentes fractions sont dosées par lecture de la densité optique (DO) à 280 nm à l'aide d'un spectromètre Labomed (Spectro UV-Vis Double PC (Model UVD-2950)). L'acide acétique 10% est utilisé comme témoin.

III.2 Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) en échange d'ions

La fraction M3 issue du gel filtration est purifiée en premier par FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). Le système FPLC/HPLC utilisé (DIONEX Ultimate 3000 FPLC™) est équipé d'une colonne échangeuse de cation (RESOURCE™ S HR 5/5; 6 mL, 16 x 30 mm ; GE Health care) équilibrée par un tampon d'acétate d'ammonium à 0,05 M, pH 8,5 (tampon A). La fraction protéique est injectée dans le système et les protéines sont éluées par un gradient optimisé pendant 40 min durant lequel le tampon d'acétate d'ammonium à 0,5 M, pH 8,5 (tampon B) passe de 0 à 40%. Le débit d'élution est de 0,8 ml/min et l'absorbance est mesurée à 280 nm.

III.3 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse

Principe : La purification des peptides synthétiques et naturels et leur analyse sont faites par RP-HPLC (Chromatographie phase Liquide à Haute performance en phase inversée). Le principe de cette technique est de séparer les protéines selon leur polarité sur une colonne apolaire (C18 dans notre cas), qui forme la phase stationnaire. Cette colonne est remplie de silice greffée par des chaînes alkylées de 18 atomes de carbones. La phase mobile est un mélange polaire d'eau et d'acétonitrile (ACN) en proportion croissante d'ACN. La phase mobile est additionnée d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1%, afin de neutraliser les charges des molécules et éviter leur interaction avec la phase stationnaire. Ainsi, la présence de TFA dans le solvant permet d'augmenter l'hydrophobicité des molécules, en augmentant la force éluante de la phase mobile. La détection des molécules éluées se fait à 214 et 280 nm.

Protocole : La purification des molécules synthétiques est réalisée par une HPLC de marque Agilent. Le peptide AaTs-1 synthétique est purifié sur une colonne C18 semi-préparative MACHEREY-NAGEL (VP 250/10 NUCLEODUR 100-5) en utilisant deux

solvants : le solvant A est constitué de 0,1% TFA dans l'eau et le solvant B est constitué de 0,1 % TFA et 10% d'eau dans l'acétonitrile. L'élution est assurée par un gradient qui atteint 60% de solvant B en 60 min à un débit de 4 ml. Un volume de 10 ml contenant 50 mg du peptide dans H₂O est injecté à chaque étape de purification.

Les dendrimères multi-branchés et le peptide cyclique sont purifiés en utilisant une colonne C18 préparative Agilent (VP 250/21 NUCLEODUR 100-5) en utilisant les mêmes solvants A et B. L'élution est effectuée par un gradient qui atteint 80% de solvant B en 80 min à débit de 6 ml. Un volume de 10 ml contenant 50 mg du peptide dans H₂O est injecté à chaque étape de purification.

L'analyse et le suivi de la purification sont effectués sur 1mg/ml de molécules synthétiques, par HPLC (LC-2010AHT, Shimadzu), sur colonne C18 analytique avec les mêmes solvants et un débit qui ne dépasse pas 1 ml/min.

La purification et l'analyse du peptide H8 natif et de ses analogues synthétiques a été réalisée en utilisant une HPLC DIONEX sur une colonne C18 Waters (4,6x 250mm de 5 µm). La molécule est éluée par un gradient de 0 à 40% de solvant B (0,1% TFA dans l'Acétonitrile) dans A (0,1% TFA dans l'eau) pendant 60 min à un débit de 0,8 ml/min.

IV. Dosage protéique par la méthode BCA

Principe : La quantification des protéines est basée sur l'utilisation du réactif principal qui est l'acide bicinchoninique (BCA) ainsi que le sulfate de cuivre (CuSO₄) (Smith et al., 1985). Les ions cuivre Cu²⁺ sont réduits en Cu⁺ par les liaisons peptidiques et par les acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane, dans un milieu alcalin. Suite à cette réaction, une coloration violette apparaît. La quantification des protéines est mesurée par la lecture de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 560 nm.

Protocole : Une gamme étalon de différentes concentrations de BSA (albumine sérum bovine) allant de 0 à 2 mg/ml est préparée en duplicata dans une plaque de microtitration. Dans la même plaque on dépose 5 µl de fraction ou de la molécule à doser et on réalise des dilutions en cascade au 1/2 à partir de ces puits. Ensuite, une solution formée de 98% de BCA et 2% de CuCO₄ (Cuivre (II) Sulfate pentahydrate Solution ; SIGMA-ALDRICH®) est préparée et ajoutée dans tous les puits à raison de 100 µl par puits. La plaque est incubée à 37°C pendant une heure et la DO est mesurée à 560 nm.

V. Synthèse peptidique sur support solide

La synthèse peptidique en phase solide (SPPS), est une technique qui a été initiée par Merrifield en 1963 (Merrifield, 1963). Elle est basée sur l'enchaînement de cycles de

couplage des acides aminés constitutifs de la séquence à synthétiser, et dont le premier est lié par son extrémité C-terminale à un support solide insoluble polymérique (résine) (Figure 14). Cette méthode est plus simple à réaliser que la synthèse en solution. En plus, elle est plus rapide et permet d'avoir un meilleur rendement. Toutefois, la taille des peptides synthétisés par cette méthode est limitée à une cinquantaine d'acides aminés, en moyenne. La synthèse s'effectue en plusieurs étapes détaillées ci-dessous.

V.1 Liaison du premier acide aminé à la résine

Le choix de la résine est très important pour la synthèse peptidique. En effet, il existe plusieurs types de résines (Rink amide, HMPA, HMPB, SASRIN, MBHA...), pour différents types de synthèse. Dans notre cas, nous avons utilisé trois types de résines, une résine Wang pour les synthèses des peptides H8, la HMP (4-hydroxymethylphenol) à 0,56 mmol/g, qui permet la synthèse des molécules analogues de AaTs-1 non amidés en C-terminal et la Rink amide 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phénoxy à 0,80 mmol/g pour les peptides amidés.

La fixation du premier acide aminé sur le support solide pour le peptide carboxylé se fait en utilisant le DCC (Dicyclohexylcarbodiimide) qui est un agent de couplage, et le DMAP (Diméthylaminopyridine), un nucléophile catalyseur de la réaction d'estérification. Pour combler les sites OH libres sur la résine, on ajoute le l'anhydride benzoïque. Pour les peptides amidés, nous avons utilisé le DCC et le HBTU (2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) pour coupler le premier acide aminé à la résine Rink amide par une liaison peptidique.

V.2 Déprotection

Plusieurs groupements de protection sont utilisés dans la synthèse peptidique. Dans notre cas tous les acides aminés sont protégés par des fonctions Fmoc (Fluorénylméthoxycarbonyle)/t-butyl (t-Bu). La déprotection des acides aminés et de la résine Rink amide de la fonction protectrice fmoc se fait par une solution contenant la pipéridine 20% dans du NMP (N-méthyl2-pyrrolidone). La pipéridine est une base qui permet le clivage de la fonction fmoc sans agir avec les autres fonctions protectrices.

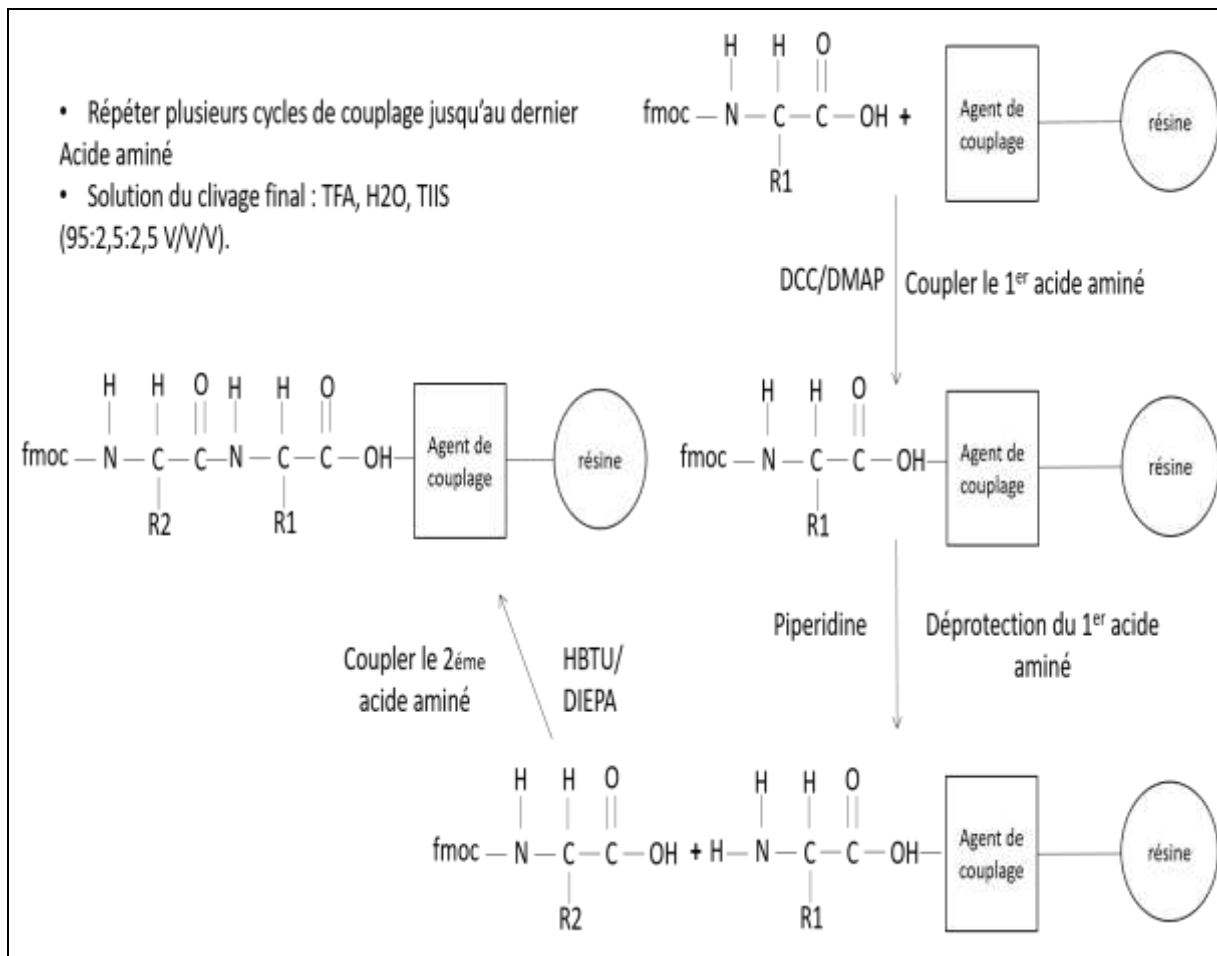


Figure 13 : Les différentes étapes de la synthèse peptidique

V.3 Couplage

Une fois la fonction amine du premier acide aminé clivée, nous procédons au couplage du deuxième acide aminé par sa fonction carboxylique. Une liaison peptidique sera formée entre la fonction amine- α du premier acide aminé et la fonction carboxylique- α du deuxième. Pour ce faire, on utilise des agents de couplage tel que le HBTU/HOBt (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate/ hydroxybenzotriazole) ou le BOP (benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphate) et une base qui est la DIPEA (N,N-Di-isopropylethylamine). Le rôle de la base est de réguler le pH du milieu réactionnel afin de rendre nucléophile l'azote de l'acide aminé déprotégé et d'activer le groupement carboxylique de l'autre acide aminé qui devient ainsi, un ester activé grâce à l'agent de couplage (HBTU/HOBt).

V.4 Acétylation

Avant le clivage final, 50% de chaque peptide synthétisé est récupéré pour être acétylé. Le synthétisat est tout d'abord traité par de l'anhydride acétique (10%) DCM- DIEPA

(5%) dans du DCM, pendant 15 minutes sous agitation, puis exposé à une solution contenant 10% d'anhydride acétique dans du DCM pendant 20 min sous agitation.

V.5 Clivage final

Le rendement de la synthèse peptidique sur support solide est calculé comme suit :

$R\% = \frac{M_f}{M_i} \times 100$ (masse de la résine produite à la fin de la synthèse) / M_i (masse initiale de la résine + masses des acides aminés).

Une fois tous les acides aminés couplés, le peptide est formé mais encore lié à la résine. On procède alors à un clivage final qui sert à séparer la molécule de la résine et des groupements protecteurs t-butyl encore présents. Pour ce faire, le synthétisé est mis dans une solution contenant 95% de TFA (acide trifluoroacétique), 2,5% de H₂O et 2,5% de Tri-Isopropyl Silane (TIS) comme piègeur chimique ou *scavenger*. Il s'agit d'une molécule nucléophile, qui sert à piéger les groupements protecteurs et éviter qu'ils ne se lient de nouveau avec le peptide. Pour les séquences qui contiennent les cystéines (le peptide cyclique) on ajoute 2 mg de phénol pour protéger les chaînes latérales soufrées.

On laisse agiter la solution pendant 2 h à température ambiante. Une fois le peptide clivé, la solution est filtrée et lavée plusieurs fois par le DCM pour récupérer le maximum de peptide et éliminer la résine et les groupements protecteurs. Le peptide est solubilisé par l'éther froid ensuite incubé pendant 15 min à -80 °C puis centrifugé pendant 15 min à 5500 rpm à 4 °C. Le culot contenant le peptide synthétisé est récupéré puis lyophilisé.

V.6 Oxydation des fonctions thiols

Le peptide cyclique doit être traité dans une solution oxydante pour former les ponts disulfures. Le peptide réduit est dissous à 10 mg/ml dans une solution contenant 70% de Tris-HCL (0.1 M, pH 8.3) et 30% d'acétonitrile. La solution est agitée à l'air libre jusqu'à oxydation. Le suivi de la réaction est fait par HPLC analytique et par spectrométrie de masse. Le temps d'oxydation peut durer quelques heures, voire plusieurs jours selon le peptide.

VI. La spectrométrie de masse

Principe : La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse chimique qui permet d'identifier la masse moléculaire des composés ainsi que leurs séquences. Son principe repose sur la transformation des molécules à analyser, de la phase solide en phase gazeuse et de l'état moléculaire à l'état ionique. L'analyse d'un composé par spectrométrie de masse est basée sur le calcul du rapport entre sa masse et sa charge (m/z)

Protocole : L'analyse du peptide H8 natif a été effectuée par LC-MS/MS par Mr. Gaysinsky de l'université de Nice. Le peptide a été injecté et séparé sur une colonne C18 à température stable (35 °C) (2,1 x 100 mm, 2,2 mm, 120 Å, Acclaim RSLC, PA2, Thermo Scientific), dans un système RS3000 RSLC (Thermo Scientific), en utilisant deux gradients linéaires successifs de 2% à 50% (38 min) et de 50% à 70% (10 min) CH₃CN/ 0,1% AF, à un débit de 0,4 mL/min. L'UPLC est connecté à un spectromètre de masse ESI-Q-TOF (microTOFQII, Bruker Daltonics). Les données ont été acquises en ionisation positive et en mode de balayage MS et MS/MS. La température de la source est de 195 °C, la tension de pulvérisation est de 5 kV et le débit de gaz sec (azote) est à 10 l/min et une pression réglée à 2,9 bars. L'acquisition d'un spectre de masse correspond à l'addition de 4000 balayages/s pour chaque spectre, sur une gamme de masse de 50-3000 m/z. Les données brutes LC-MS/MS ont été traitées avec le logiciel Data Analysis (ESI Compass 1.3, Bruker Daltonics).

Les analyses de l'AaTs-1 et de ses analogues synthétiques ont été réalisées par LC/MS ESI-quadrupole. Les produits sont injectés dans une colonne C18 analytique thermostatée. L'élution s'effectue avec un solvant constitué de 90% d'ACN, 10% de H₂O et 0,1% d'acide formique à un débit de 1 ml/min.

VII. Les tests biologiques

VII.1 Culture cellulaire

Les cellules cancéreuses doivent être cultivées et traitées sous une hotte à flux laminaire dans les conditions physiologiques. Pour cela, elles sont placées dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide et un taux de 5% de CO₂. Les cellules U87 sont cultivées dans un milieu EMEM (*Eagle's Minimal Essential Medium*) complété de 10% de SVF (sérum de veau fœtal), 1% de l-glutamine et 1% de mélange d'antibiotiques (streptomycine et ampicilline). Les cellules sont mises dans des flacons à surface traitée pour la culture cellulaire, stérilisés aux rayons Gamma. Quand les cellules atteignent une confluence de 80%, elles sont décrochées par la trypsine/EDTA 0,05% et passées dans un autre flacon de culture.

VII.2 Test de cytotoxicité : dosage de l'activité enzymatique du lactate déshydrogénase (LDH)

Principe : Le test de cytotoxicité par dosage de l'activité enzymatique de la protéine LDH est un test colorimétrique qui permet d'évaluer le degré de cytotoxicité engendré par nos molécules sur les cellules en dosant l'enzyme LDH qui est larguée par les cellules mortes dans le milieu extracellulaire suite aux dommages subis par la membrane.

Protocole : Les cellules U87 sont traitées par les molécules à tester dans une plaque à microtitration de 6 puits à raison de 3×10^5 cellules/puits pendant 24h. La quantité totale de LDH est déterminée par la lyse des cellules avec du Trixon-X100 à 0,1%. Le surnageant de chaque puits est ensuite récupéré et centrifugé pendant 10 minutes à 1000 rpm. Un volume de 100 μ l est prélevé de chaque surnageant et placé dans une plaque 96 puits. Le dosage de la LDH est réalisé en suivant le protocole fourni par le fabricant. La DO enregistrée à 490 nm est proportionnelle au taux de LDH présente dans la solution.

VII.3 Test de viabilité et prolifération

Principe : Le test MTT est un test colorimétrique permettant d'évaluer l'effet d'un échantillon brut ou d'une molécule purifiée sur la viabilité cellulaire. Dans une cellule vivante, le sel de Tétrazolium MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium) est réduit en formazan de couleur violette par l'enzyme succinate déshydrogénase. Ainsi, la lecture de la DO à 560 nm permet de quantifier les cellules vivantes.

Protocole : Les cellules U87 sontensemencées à raison de 10^4 cellules (pour une incubation de 24h) ou 5000 cellules (pour une incubation de 72h traduisant une prolifération cellulaire), dans 100 μ l de milieu par puits d'une plaque de microtitration (de 96 puits) et incubées toute une nuit à 37°C. Le deuxième jour, différentes doses des molécules à testées sont préparées dans du milieu de culture et ajoutées aux cellules. Après 24h (test de cytotoxicité) ou 72h (test de prolifération) d'incubation, les cellules sont traitées avec du MTT (10% dans du EMEM) pendant 3h à 37°C. Les cristaux formés suite à la réduction du MTT sont dissouts dans du DMSO et la DO est mesurée à 560 nm.

VII.4. Test d'adhésion

Principe : Toutes les cellules de l'organisme interagissent avec la matrice extracellulaire qui joue un rôle important dans la communication intercellulaire et dans le maintien des cellules. La matrice extracellulaire est composée de sels, d'eau, de polysaccharides et de protéines (collagènes IV, fibronectine, vitronectine, fibrinogène, laminine, élastine...) qui se lient à leurs récepteurs sur la membrane cellulaire, appelés intégrines (Bremnes et al., 2011). Le test d'adhésion consiste à étudier l'effet des molécules synthétisées sur l'adhésion des cellules U87 sur différentes protéines de matrice.

Protocole : Dans une plaque de microtitration à fond plat (Nunc), des solutions de fibronectine (Fn) (10 μ g/ml) ou de vitronectine (Vn) (2 μ g/ml) préparées dans du PBS/ Ca^{2+}

sont déposées et incubées toute une nuit à 4°C dans un milieu humide, puis une demie heure à 37°C. Les puits sont ensuite débarrassés de l'excès de la Fn et de la Vn et saturés par du PBS/BSA (0,5 g/ml) pendant une heure à 37°C. Entre temps, les cellules U87 sont décrochées par le PBS/EDTA (0,53 mM), pour préserver les intégrines intactes, comptées et traitées avec différentes doses des molécules à tester, préparées dans du tampon d'adhésion (pour 500 ml : EMEM 6,69 g, NaHCO₃ 0,6 g, BSA 1 g, HEPES 1,78 g). Après une agitation d'une demi-heure à température ambiante, les cellules sont déposées dans la plaque à raison de 5x10⁴ cellules par puits et incubées à 37°C pendant 1 à 2 heures.

Après incubation, plusieurs lavages sont effectués par le tampon d'adhésion afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes sont fixées avec 50 µl de glutaraldéhyde 1% par puits, pendant 10 min. Les cellules adhérentes sont ensuite lavées avec de l'eau distillée et colorées par le cristal violet pendant 30 min. Après lavage avec de l'eau, le colorant est solubilisé par 100 µl de SDS 1% et la DO est mesurée à 560 nm. L'adhésion spécifique est obtenue par soustraction de l'absorbance obtenue en absence du substrat d'adhésion (contrôle négatif).

VII.5. Test de migration cellulaire en chambre de Boyden

Principe : Ce test a pour but d'analyser la capacité des molécules à inhiber la migration cellulaire. La chambre de Boyden est un dispositif qui comporte deux compartiments (supérieur et inférieur) séparés par un filtre poreux en polycarbonate, permettant le passage des cellules. Les cellules migrent du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur par haptotaxie (migration dans un gradient de protéine immobilisée)

Protocole : La face inférieure du filtre est imbibée d'une solution de fibronectine (Fn) (10 µg/ml) préparée dans du PBS /Ca²⁺ et incubée à 4°C dans un milieu humide pendant 18 heures. Les puits du compartiment inférieur de la chambre de Boyden sont remplis avec du milieu EMEM contenant du SVF. Les cellules U87, sont décrochées du flacon de culture avec du PBS/EDTA (0,53 mM) et traitées avec différentes concentrations des molécules à tester. Après une agitation de 30 min à température ambiante, les cellules sont déposées dans les puits du compartiment supérieur à raison de 10⁵ cellules/puits et incubées pendant 6 heures à 37 °C. Les cellules qui sont restées à la surface du filtre sont éliminées délicatement par un coton-tige et le filtre est traité sur sa face inférieure par du glutaraldéhyde 1% pendant 10 minutes pour fixer les cellules qui ont migré. Ces dernières sont colorées avec du cristal violet 1% pendant 30 minutes. L'excès du colorant est éliminé avec de l'eau distillée. Les puits du filtre sont découpés soigneusement et mis dans une plaque de microtitration pour solubiliser le

cristal violet avec 100 µl de SDS 1% pendant 15 min, puis la DO de chaque puits de la plaque est mesurée à 560 nm.

VII.6 Migration par vidéomicroscopie

Les cellules de glioblastome humain sontensemencées sur des plaques de 24 puits prétraitées par la fibronectine à faible densité (10^4 cellules/puits). L'analyse de la migration des cellules à 37°C est réalisée en utilisant un microscope inversé Nikon (grossissement x10). Des images sont enregistrées chaque 5 min pendant 4 h avec un appareil photo HQ Coolsnap (Photometrics, Tucson, AZ) exploité par le logiciel NIS-Elements AR 2.30 (Nikon). Le suivi de la cinétique de migration des cellules est réalisé en utilisant le logiciel d'analyse d'image Metamorph® (Roper Scientific, Evr, France), comme décrit précédemment (Morjen et al., 2013).

Les paramètres de la migration de chaque cellule comprennent : la distance totale de migration, la distance à l'origine, la vitesse et la persistance. La distance totale de migration représente la somme des distances entre chaque mesure divisée par la période, qui est de 4 h. La distance à l'origine a été déterminée comme étant la translocation nette entre la position initiale et la position finale. La vitesse correspond à la somme des distances de migration divisée par 4 h. La persistance directionnelle est le rapport de la distance à l'origine divisée par la distance totale. Pour chaque paramètre, les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type à partir d'au moins 25 cellules individuelles.

VII.7 Dosage des espèces réactives de l'oxygène

Principe : Le dosage des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est effectué en utilisant une sonde fluorogène, CMH2DCF-DA (life technologie, Oregon, USA). Cette sonde est capable de se diffuser passivement à travers la membrane cellulaire. Une fois au compartiment intracellulaire, elle sera désacétylée par les estérases cellulaires. En présence des ROS, la sonde est oxydée pour se transformer en 2'-7'dichlorofluoresceine (DCF), qui est un composé fluorescent détectable par un fluorimètre, un cytomètre ou un microscope fluorescent, avec un spectre d'excitation à 492 nm et d'émission à 517 nm.

Protocole : Les cellules sontensemencées dans une plaque de 24 puits à raison de 10^5 cellules par puits. Après une incubation de 18 heures les cellules sont traitées par les molécules à tester et incubées pendant 24h. Ensuite, les cellules sont lavées par du PBS (1X), re-suspendues dans du milieu DMEM et traitées avec 10 µM de la sonde CMH2DCF-DA. La fluorescence est détectée par cytométrie en flux.

VII.8 Western blot

La détection des changements d'expression des effecteurs dans les cellules traitées par les différentes molécules utilisées est une étape très importante pour comprendre les voies de signalisation impliquées dans l'effet observé. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique du Western blot qui nous permet d'évaluer le degré d'expression de plusieurs protéines intra et extracellulaires et le degré de phosphorylation subi par ces molécules, en utilisant des anticorps spécifiques.

VII.8.1 Préparation des lysats cellulaires

Les cellules U87 sontensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 50×10^4 cellules par puits et incubées pendant 18h. Ensuite elles sont traitées par les molécules à tester pendant 30 min (phosphorylation des MAPKines) ou 24h pour (expression de FPRL-1 et P53). Les cellules sont lavées par du PBS froid et lysées dans un tampon de Laemmli (Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, 10% glycérol, 1% SDS). Après centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min, le surnageant est récupéré puis dosé par un kit BCA en utilisant une solution de BSA (1 mg/ml) pour la gamme étalon. Les lysats sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

VII.8.2 SDS-PAGE et électro-transfert sur membrane

Une quantité de 25 μg de protéines de chaque lysat cellulaire est ajouté dans une solution contenant un tampon de charge (tampon de Laemmli (1X) 100 mM de β -mercaptoéthanol et 0,01 % de bleu de bromophénol). Les protéines dénaturées à 100°C pendant 10 min et déposées dans un gel de polyacrylamide (10% ou 12% selon des protéines ciblées) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). La migration se fait dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 250 mM ; pH=8,3 ; 0,1 % SDS) à 80 V puis à 120V.

Après leur migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF activée dans de l'éthanol 100%. Le transfert est effectué dans un tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM ; glycine 192 mM et 20 % éthanol) à 90V pendant 1h30.

VII.8.3 Marquage des protéines et révélation

Les membranes sont saturées sous agitation pendant 1h à température ambiante par une solution de lait écrémé (5%) dans du PBS/0.2 % Tween pour bloquer les sites non spécifiques, ensuite lavées 3 fois pendant 15 min par une solution de PBS/Tween 20 0,1% (PBST). Les membranes sont incubées avec l'anticorps monoclonal spécifique de la protéine ciblée dans du lait écrémé (5%) dans du PBS/0.2 % Tween pendant une nuit à 4°C , lavées 3 fois au PBST et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplés à la HRP pendant une

1h à température ambiante. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois au PBST et révélées par chimioluminescence ECL (Millipore).

VII.9 Dosage du relargage calcique

Pour évaluer l'effet des molécules à tester sur le flux calcique, la concentration du calcium cytosolique a été mesurée en utilisant le colorant fluorescent ratiométrique Fura-2-AM (cette étude a été effectuée au laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer (N2C) à l'université de Tours par l'équipe du Pr. Vandier). Les cellules U87 sontensemencées à raison de 5×10^4 dans une plaque 96 puits pendant une nuit et traitées de façon aiguë avec la molécule à tester, puis chargées avec du Fura-2-AM ($1 \mu\text{M}$) pendant 45 min à 37°C . Un lecteur de microplaques Flexstation 3 (Molecular Devices) est utilisé pour quantifier la fluorescence (excitation 340 et 380 nm ; émission 510 nm). Afin de mesurer la libération du calcium cytosolique à partir du réticulum endoplasmique (RE), les cellules sont stimulées sans calcium extracellulaire, avec de la taspigargin ($4 \mu\text{M}$) à 100s d'enregistrement et ensuite $2 \mu\text{M}$ de CaCl_2 sont ajoutés à 500s pour mesurer l'entrée de calcium opérée par le stockage (SOCE). Après normalisation par rapport aux conditions de contrôle, l'amplitude de SOCE et la libération cytosolique par ER ont été mesurées en calculant le rapport $\Delta F/F_0$ (la variation de fluorescence par rapport à la fluorescence initiale). Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SoftMax Pro (version 5.4.6, Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

VII.10 Test de toxicité *in vivo*

La toxicité des molécules synthétisées a été testée sur des souris mâles C57/BL6 par voie intracérébro-ventriculaire (ICV). Des solutions fraîchement préparées contenant chaque molécule synthétique à 1 ou $4 \mu\text{g}$ dans $5 \mu\text{l}$ d'une solution de BSA (0,1% (p/v)) dans l'eau, ont été testées. Trois souris ont été utilisées par dose pour chaque molécule et trois autres (souris témoins) ont été traitées avec seulement 0,1% de BSA dans l'eau. L'administration ICV a été réalisée sous conditions d'anesthésie, selon la méthode décrite par (Galeotti et al., 2003).

Les souris ont été suivies pendant 24h afin de déterminer le taux de mortalité et/ou toute modification du comportement, notamment les tremblements, la léthargie et l'anxiété. Les expériences sur les souris ont été menées conformément à la Directive du Conseil de la Communauté Européenne (2010/63/EU) pour le soin des animaux expérimentaux, et toutes les procédures ont été approuvées par le Comité de Recherche Institutionnel de l'Institut Pasteur de Tunis.

Résultats et discussion

Chapitre I : Recherche, purification et caractérisation de molécules de faible masse moléculaire issues de venin du scorpion *Androctonus australis*, actives sur les cellules de glioblastome

I.1 Criblage de la fraction de faible masse moléculaire du venin de scorpion Aa et purification de molécules actives sur le glioblastome

I.1.1 Chromatographie liquide à basse pression en exclusion stérique

Le venin du scorpion *Androctonus australis* contient un ensemble de molécules dont des protéines et des peptides. Afin de rechercher et purifier des molécules actives sur les cellules de glioblastome, plusieurs étapes de fractionnement, suivies par une étude sur l'effet de chaque fraction sur les cellules U87 étaient nécessaires. La première étape est le tamisage moléculaire qui sépare les protéines selon leur masse moléculaire. Le venin brut (environ 300 mg), est injecté dans une colonne de chromatographie (2,6 x 100 cm) remplie d'un gel de Sephadex G-50. La colonne est pré-équilibrée par l'acide acétique (10%) et après l'injection du venin, les molécules sont éluées avec ce même solvant. La lecture de la densité optique à 280 nm a permis de tracer un chromatogramme traduisant l'élué de différentes fractions selon leur masse moléculaire.

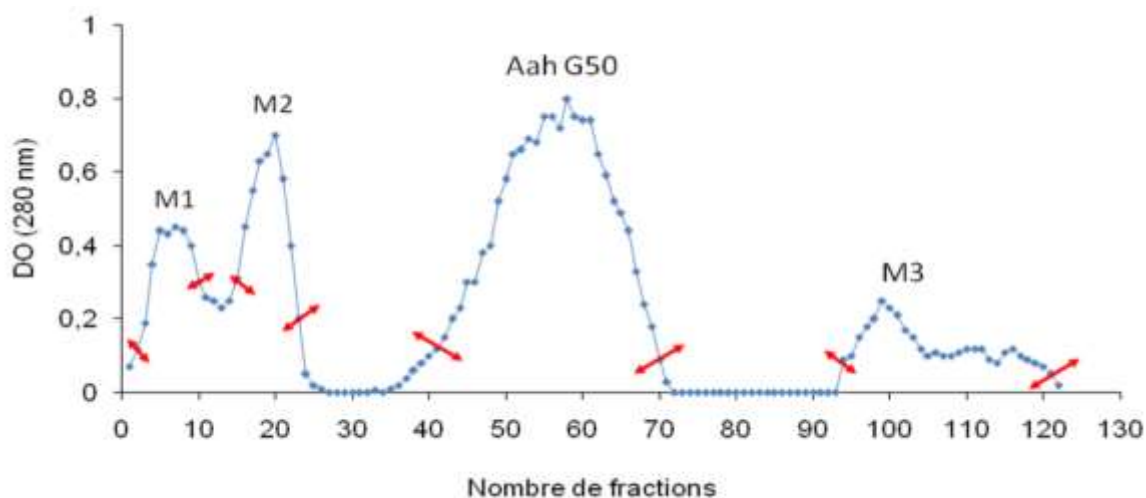


Figure 14: Chromatographie sur gel séphadex G-50 du venin de scorpion *Androctonus australis hector*

La figure 15 montre que le chromatogramme présente 4 pics (M1, M2, AahG50 et M3). Chaque pic représente un groupe de protéines ayant des masses moléculaires proches.

I.1.2 Effet de la fraction M3 sur la prolifération et la migration des cellules U87

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la fraction M3 qui renferme vraisemblablement les peptides de faible masse moléculaire. Nous avons testé cette fraction sur la prolifération et la migration des cellules U87.

La figure 16 montre que la fraction F3 inhibe à 66% la prolifération des cellules U87 à la concentration de 50 µg/ml.

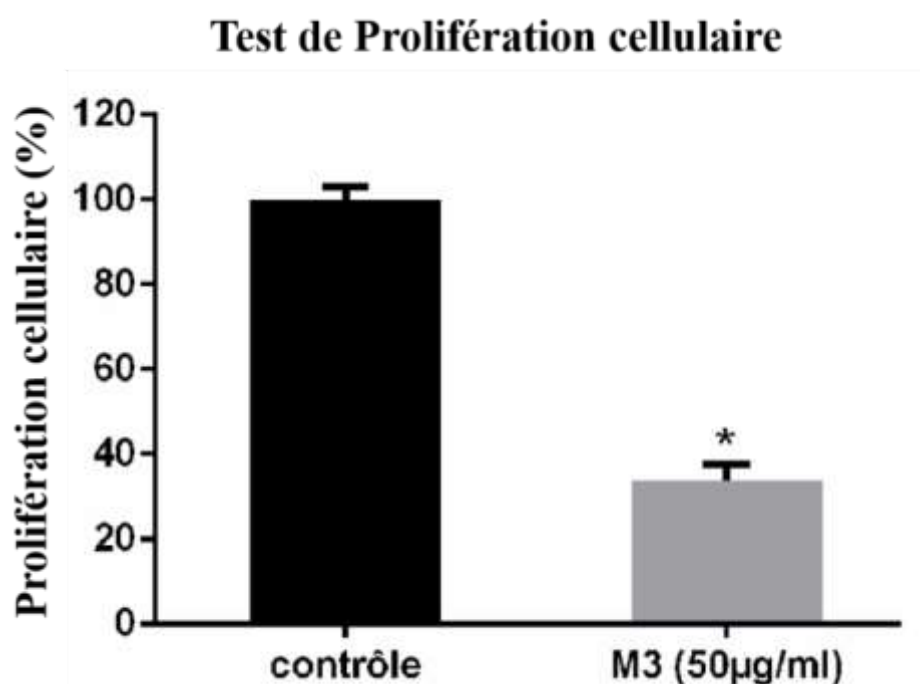


Figure 15 : Histogramme représentatif de l'effet de la fraction M3 sur la prolifération des cellules U87

La fraction M3 a été testée sur la prolifération des cellules U87 à 50 µg/mL pendant 72 h. Après incubation les cellules sont traitées par MTT pendant 3h et les cristaux de formazan formés sont dissous dans le DMSO et la quantification est mesurée à 560 nm.

Le test de migration a été réalisé dans une chambre de Boyden, en présence de la fibronectine à 10 µg/ml, comme matrice extracellulaire. Les résultats obtenus avec les trois doses de M3 (10, 15 et 25 µg/ml) montrent un effet dose-réponse avec une IC₅₀ de l'ordre de 15 µM (figure 17).

Ainsi les résultats obtenus montrent qu'il y'a au moins une molécule dans la fraction M3 qui aurait un effet sur la prolifération et/ la migration des cellules U87 de glioblastome.

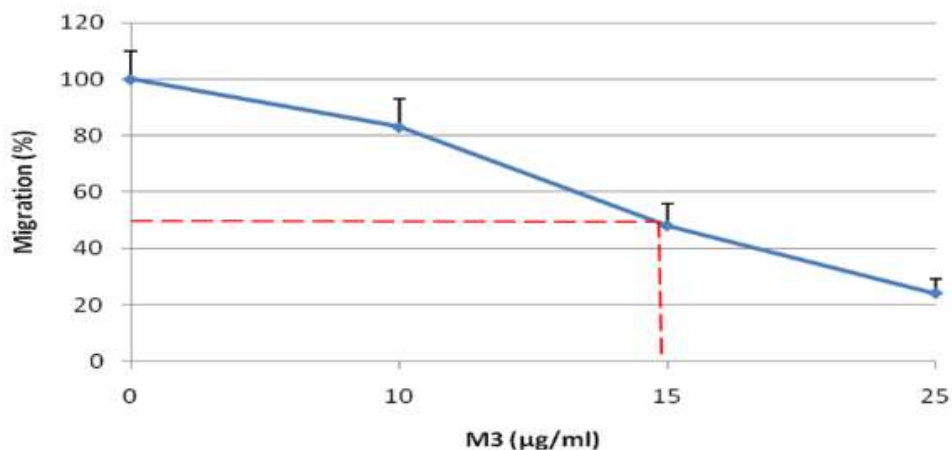


Figure 16: Effet dose réponse de la fraction M3 sur la migration des cellules U87

La fraction M3 a été testée sur la migration des cellules U87. Après une incubation de 6h, les cellules migrantes sont fixées au glutaraldéhyde, colorées par cristal violet et lysées par du SDS. La DO est mesurée à 560 nm.

I.1.3 Chromatographie rapide (FPLC) par échange d'ions

Les composés de M3 sont fractionnés par chromatographie échangeuse de cations, à pression moyenne par FPLC. Cette fraction est injectée dans une colonne ressource S équilibrée dans un tampon H₂O. La séparation est effectuée par un gradient de 0 à 40% d'acétate d'ammonium 0,5 M en 38 min avec un débit de 0,8 ml/min. Le profil chromatographique à 280 nm indique la présence de 4 fractions que nous avons désignées F1, F2, F3 et F4 (Figure 18).

Toutes ces fractions ont été testées, en premier lieu, sur la prolifération des cellules U87 en procédant avec le même protocole utilisé pour la fraction M3 et en utilisant la même concentration 50 µg/ml. Les résultats montrent que les fractions F1 et F2 n'ont aucune activité sur la prolifération des cellules U87. Par contre, les fractions F3 et F4 ont un effet significatif puisqu'elles inhibent la prolifération des cellules U87 de 54% et 62% respectivement (figure 19A).

Ces mêmes fractions ont été testées aussi sur la migration des cellules U87 à une concentration de 15 µg/ml (IC₅₀ de la fraction M3). Les résultats montrent que F3 est la fraction qui possède la meilleure activité avec 62% d'inhibition de la migration cellulaire. F4 aussi agit sur la migration des cellules U87 avec 40% d'inhibition, F2 possède une légère activité inhibitrice de 12% alors que F1, qui est la fraction majoritaire, ne montre aucune activité (figure 19B).

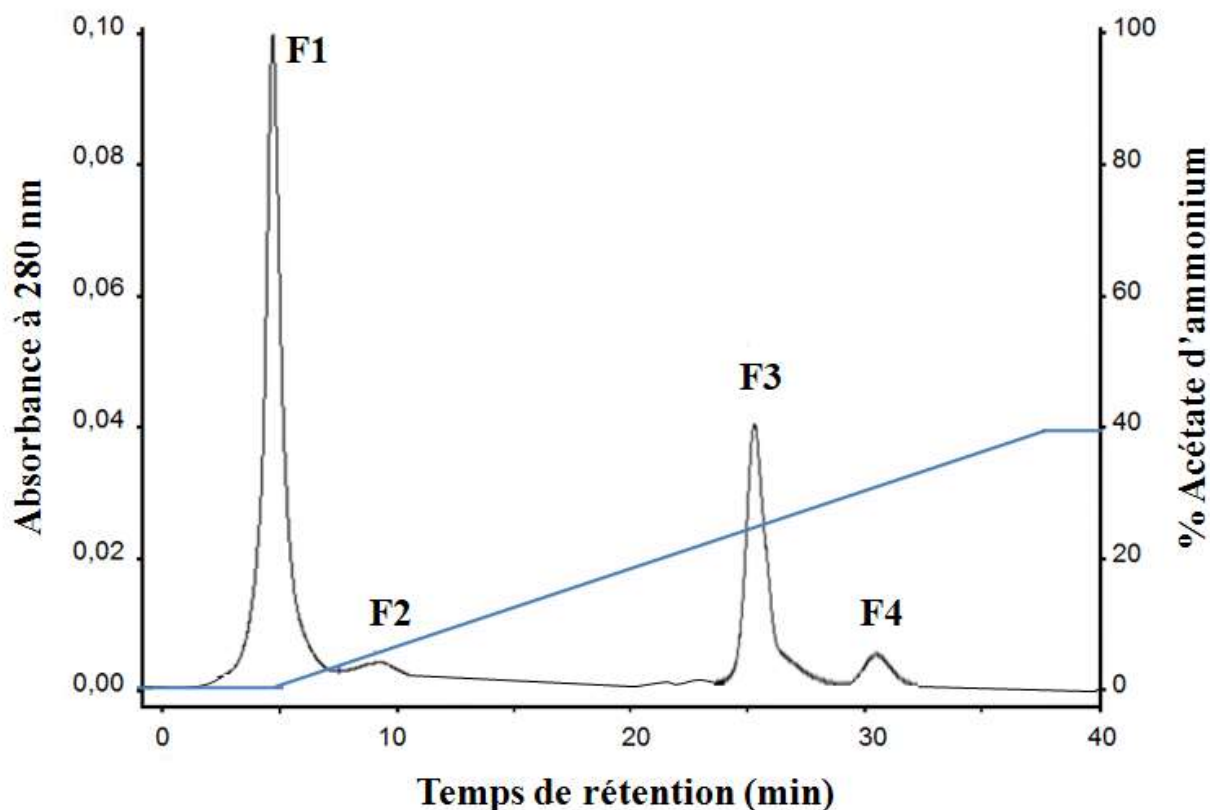


Figure 17: Chromatographie échangeuse d'ion (FPLC) de la fraction M3

La fraction M3 est passée par une colonne ressource S suivant un gradient de 0 à 40% à 40 min tampon B en acétate d'ammonium de 0,5 M (pH 8,5). Le débit d'élution est de 0,8 ml/min et l'absorbance est mesurée à 280 nm

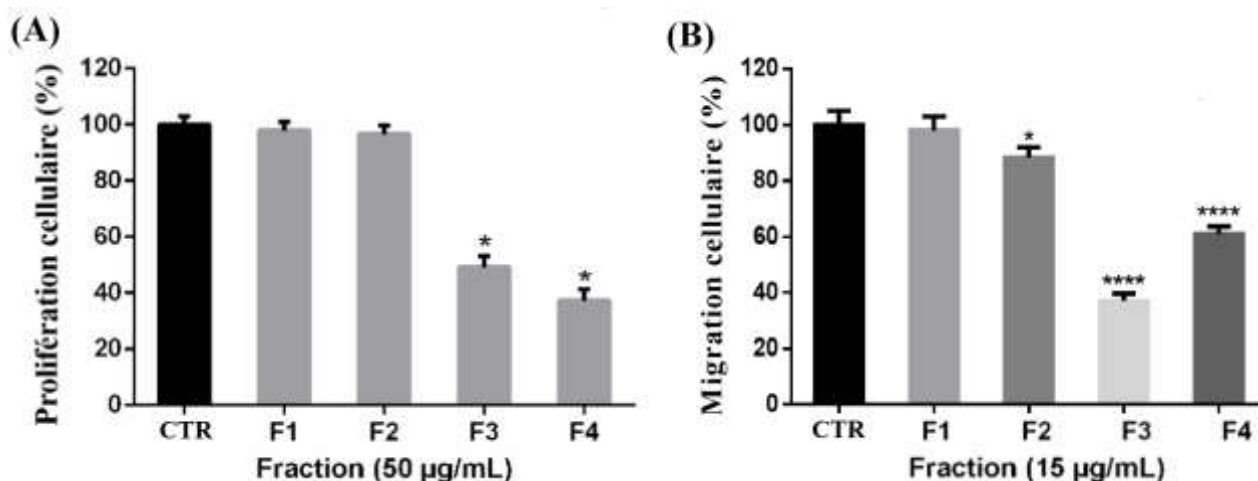


Figure 18 : Effet des fractions FPLC sur la prolifération (A) et la migration (B) des cellules U87

Afin d'identifier les molécules responsables des activités antiproliférative et/ou anti-migratoire, nous avons utilisé une technique de purification plus résolutive, la HPLC.

I.1.4 Chromatographie à haute pression en phase inverse (RP-HPLC)

Malgré que nous ayons trouvé que deux fractions F3 et F4, ont montré un effet sur la prolifération et la migration des cellules U87, nous avons décidé de ne poursuivre notre étude que sur la fraction F3 car F4 est très faiblement représentée dans le venin. Ainsi, plusieurs injections HPLC de la fraction F3 (100 µg par injection) sont effectuées dans une colonne C18 analytique (phase stationnaire). L'éluion est effectuée avec un gradient de 0 à 35% en 35 min de solvant B (0,1% de TFA dans l'acétonitrile) dans A (0,1% de TFA dans l'eau) à un débit de 1 ml/min.

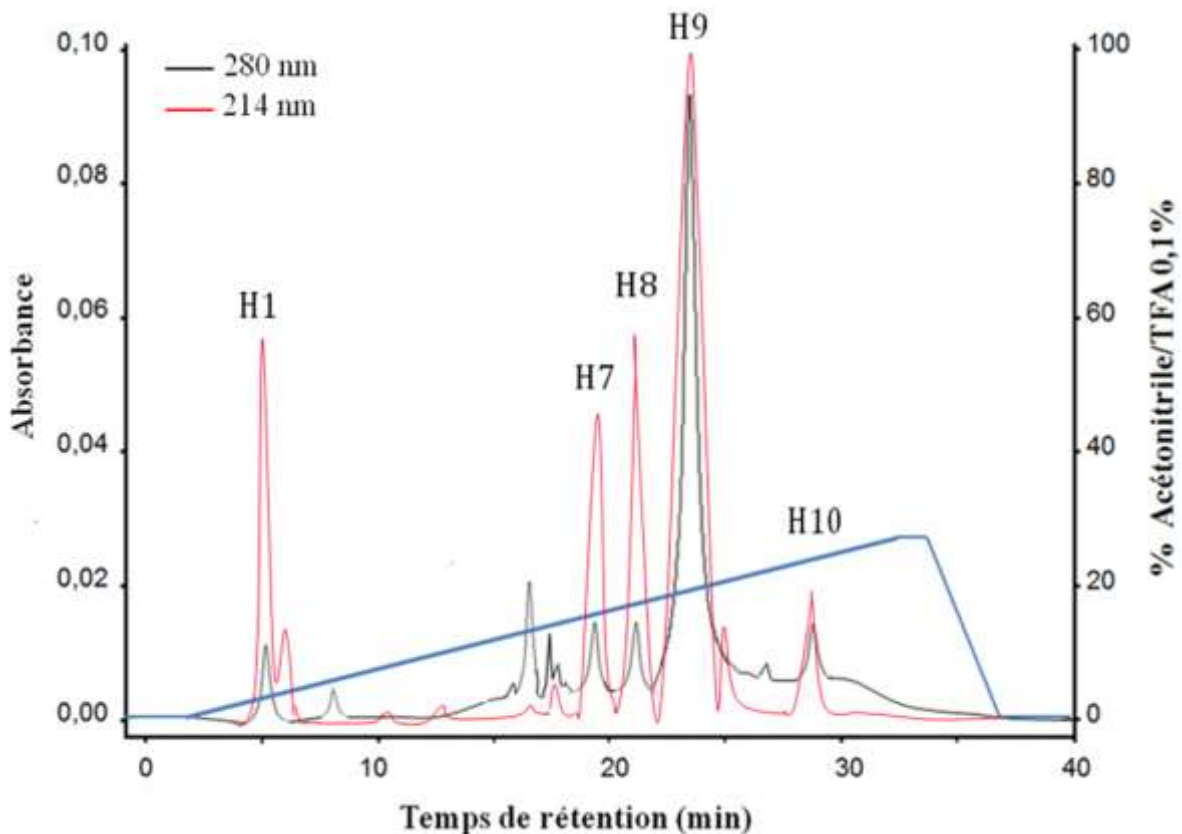


Figure 19 : Chromatographie à haute pression HPLC de la fraction F3

La fraction F3 produite par FPLC est purifiée par HPLC sur une colonne C18. L'éluion est effectuée avec un gradient linéaire (34 min) de 0% à 30% de TFA à 0,1% / acétonitrile ; le débit est de 0,8 mL/min ; l'absorbance est mesurée à 214 et 280 nm.

Le profil de HPLC (Figure 20) montre la séparation en 9 fractions, que nous avons désignées H1 à H9. Les molécules H7, H8, H9 et H10, majoritaires dans la fraction F3, sont d'abord testées à 50 µg/ml sur la prolifération des cellules U87. Seule la fraction H9, correspondant au pic majoritaire (72,4% de la fraction M3), inhibe de 20% la prolifération sur les cellules U87. Un test MTT 72h a été réalisé en utilisant une gamme de concentrations de 50 à 400 µg/ml en H9. Les résultats montrent que H9 exerce une inhibition dose-dépendante de la prolifération

des cellules U87 avec une IC_{50} de 300 $\mu\text{g/ml}$ (figure 21A). Les observations microscopiques montrent que le nombre de cellules traitées par H9 a diminué par rapport au contrôle (cellules non traitées) (figure 21B).

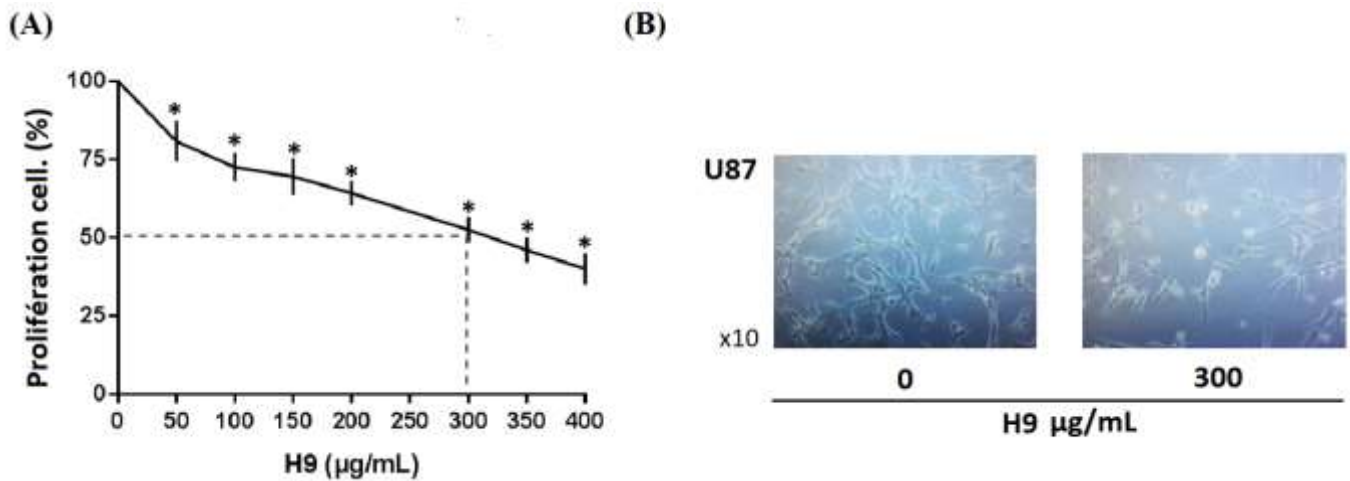


Figure 20 : Effet de la fraction H9 sur la prolifération des cellules U87
 A) Effet dose-réponse de H9 sur la prolifération des cellules U87 (B) Observation microscopique des cellules U87 traitées avec 300 $\mu\text{g/ml}$ de H9 pendant 72 h.

La caractérisation de la molécule H9 a été réalisée au sein du laboratoire des venins et biomolécules thérapeutique par Dr. Dorra Aissaoui-Zid (Aissaoui-Zid et al., 2021). Il s'agit d'un tétrapeptide (IKWS), que nous avons nommé AaTs-1 et qui agit sur la prolifération des cellules U87 en bloquant le récepteur FPRL-1 et en diminuant le taux du calcium intracellulaire (Aissaoui-Zid et al., 2021).

Les mêmes fractions ont été ensuite testées sur la migration des cellules U87 à la même concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. La figure 22 montre que la fraction H8 possède l'effet inhibiteur le plus important (73%). Par contre, la fraction H9, très active sur la prolifération des cellules U87, présente un effet anti-migratoire très faible de l'ordre de 4%.

Ainsi, nous avons réussi à identifier le premier peptide court H8, possédant un effet anti-migratoire sur les cellules U87 (figure 22). En effet, dans le venin AaH il existe d'autres molécules ayant un effet sur la migration des cellules U87. La molécule KAaH1, précédemment purifiée et caractérisée par notre équipe, inhibe 26% de la migration des cellules U87 à 50 $\mu\text{g/ml}$ (Aissaoui et al. 2018). Une autre molécule, nommée AaCtx, possède un effet anti-migratoire sur les cellules U87 avec une IC_{50} de 600 $\mu\text{g/ml}$ (Rjeibi et al. 2011). Ces deux molécules sont composées respectivement de 58 et 40 acides aminés (Srairi-Abid et al. 2005; Rjeibi et al. 2011).

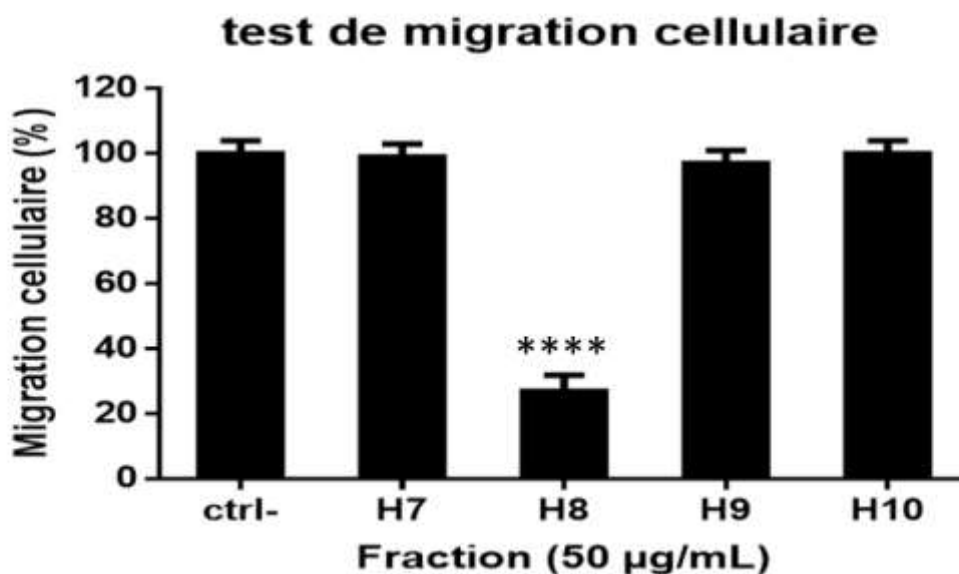
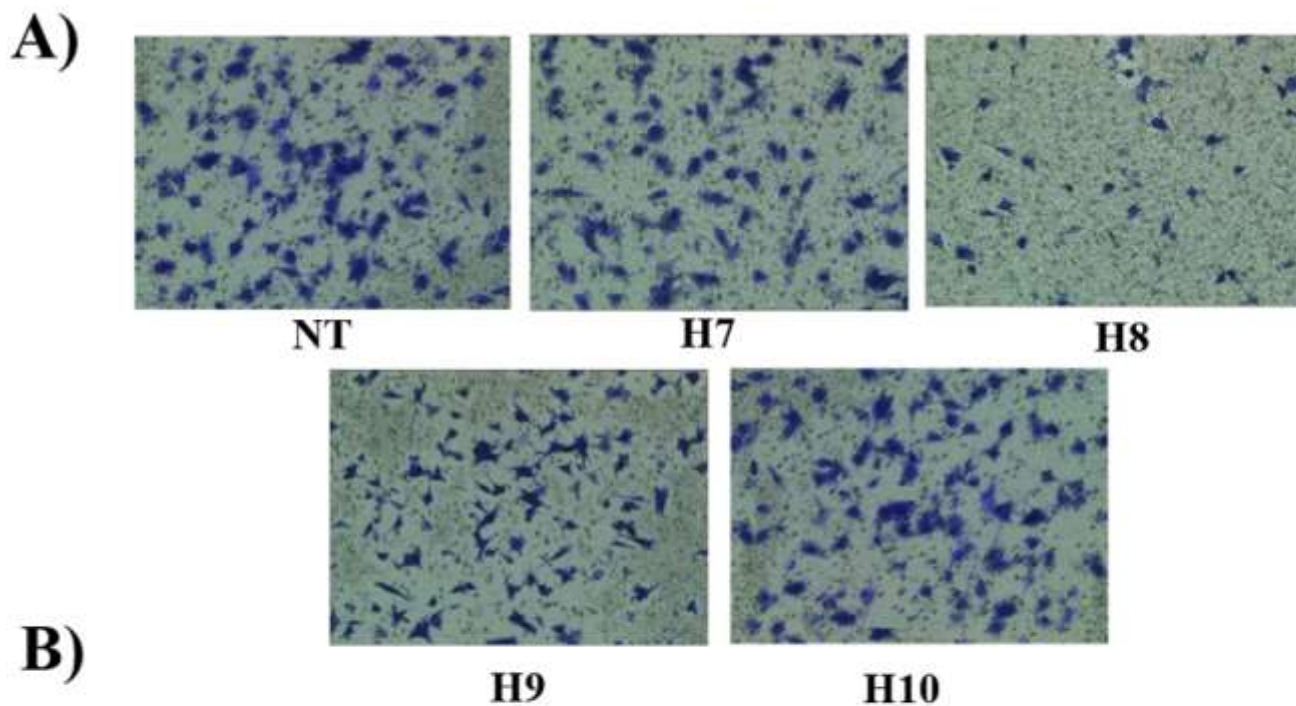


Figure 21 : Effet des fractions purifiées par chromatographie à haute pression sur la migration des cellules U87

(A) Observation microscopique de la migration cellulaire. La migration est déterminée dans des chambres de Boyden en utilisant une membrane poreuse traitée avec de la fibronectine (10 µg/ml). Les cellules U87 (10⁶ cellules/ml) sont pré-incubées avec les fractions, à 15 µg/ml, et déposées dans la partie supérieure et incubées pendant 6 h à 37°C. (B) Histogramme quantitatif représentant l'effet des fractions testées à 50 µg/ml sur la migration des cellules U87. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de migration par rapport au contrôle (cellules non traitées)

Les molécules de petite taille présentent un grand potentiel de développement comme agents anti-tumoraux. Elles sont faciles à synthétiser par rapport aux celles de grande taille et présentent l'avantage d'une meilleure pénétration de la barrière hémato-encéphalique en plus du faible coût de production.

I.2 Caractérisation structurale de H8

I.2.1 Spectrométrie de masse

La masse exacte de H8 a été déterminée par spectromètre de masse ESI-Q-TOF à l'Université Nice Sophia Antipolis par Dr. Mark Gaysinsky.

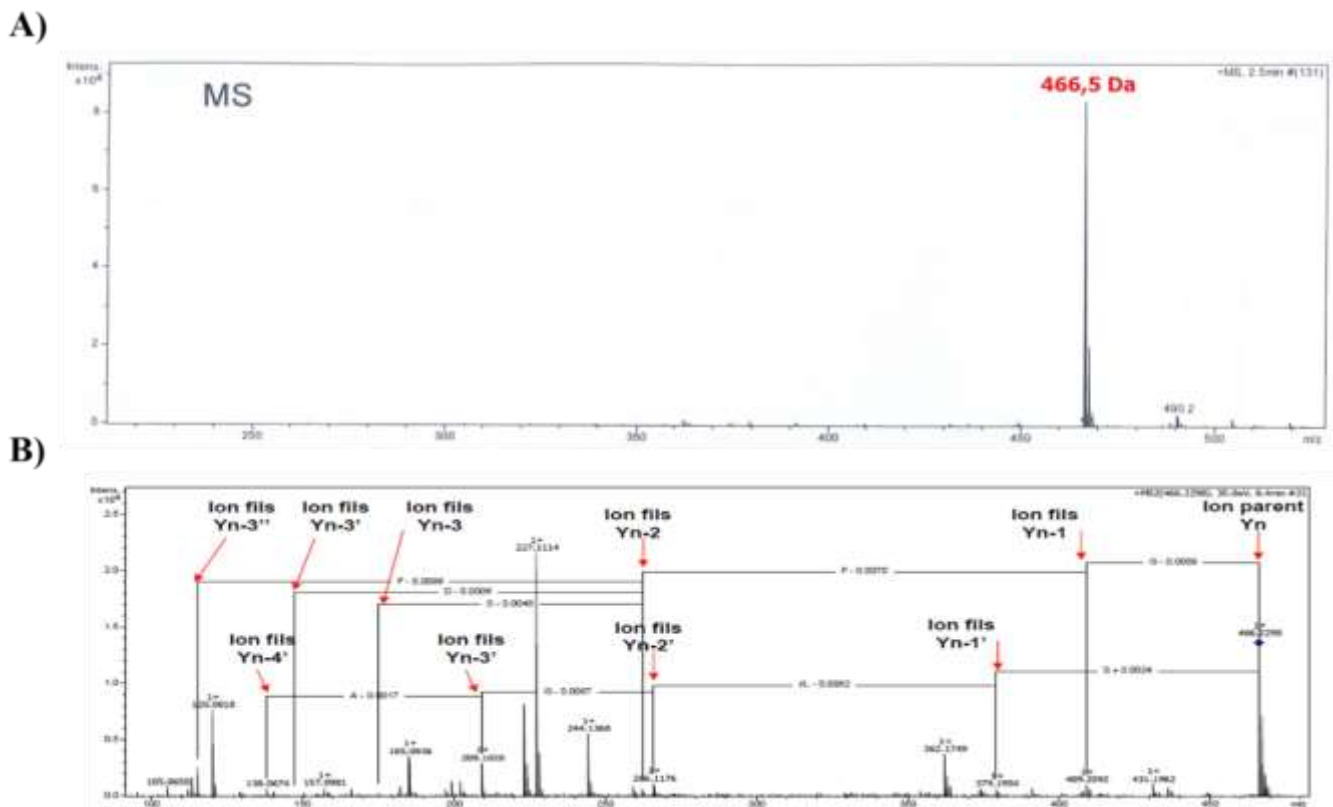


Figure 22 : Spectres de masse du peptide H8

A) spectre de masse MS du peptide H8. B) spectre de masse Q-TOF de la fragmentation de la molécule H8.

La masse expérimentale de H8 est de 466,5 m/z (figure 23A). La fragmentation, par MS/MS, de la forme mono-chargée a montré la présence de plusieurs ions fils dont la différence entre deux masses successives correspond à une masse d'un acide aminé. Les résultats de cette étude ont montré que le peptide H8 contient 4 acides aminés (figure 23B).

L'analyse du spectre MS/MS a abouti à plusieurs propositions de séquences correspondant. Nous avons choisi cinq peptides à synthétiser dont les séquences sont : GFRS, GFFP amidé, GFSR, GFSGV et GRSF

I.3 Synthèse des cinq peptides putatifs

Ces cinq séquences, GFRS, GFFP amidé, GFSR, GFSGV et GRSF (figure 24), qui présentent toutes une masse moléculaire théorique de 465, ont été synthétisées manuellement sur support solide en utilisant la stratégie fmoc.

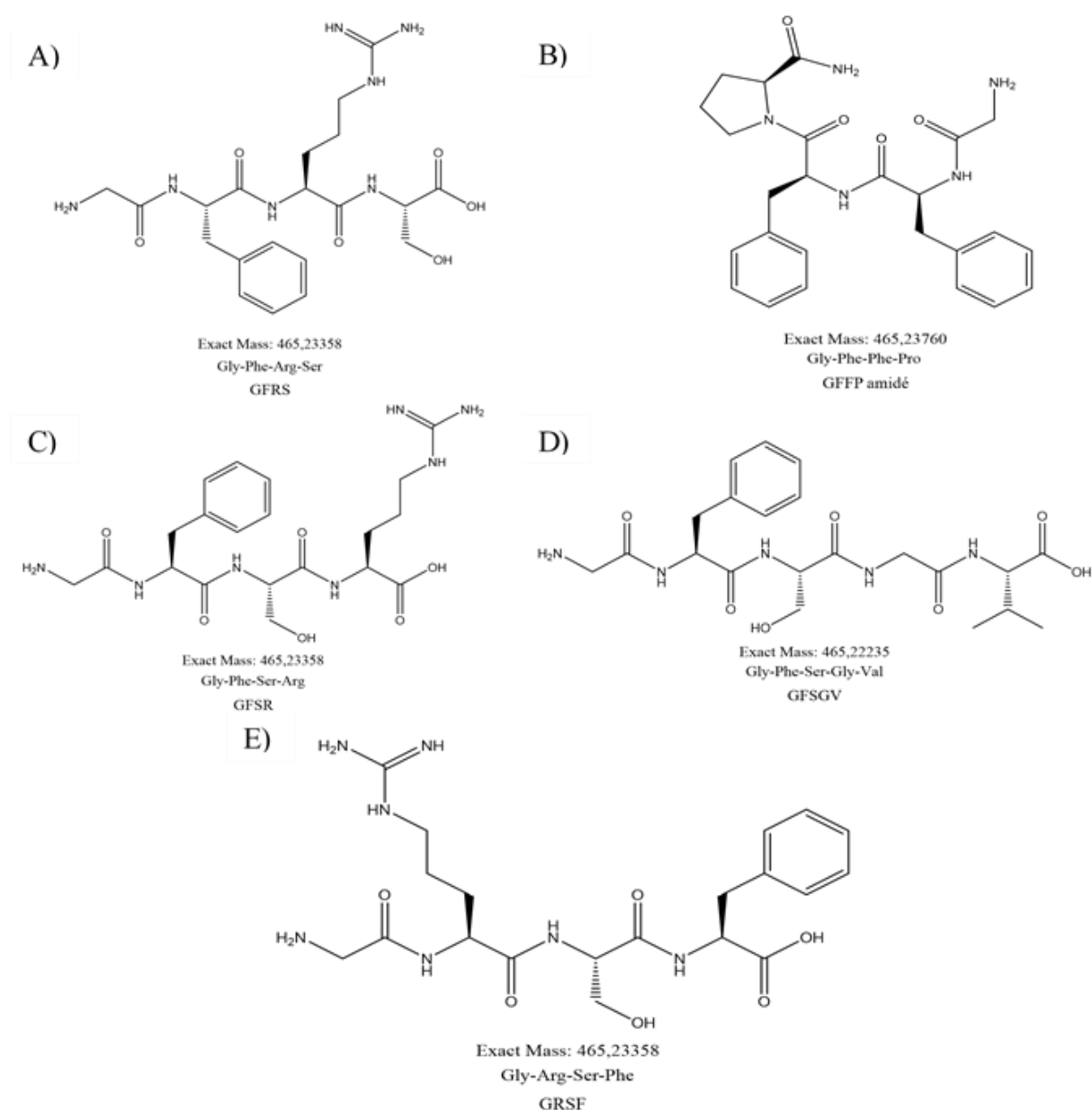


Figure 23 : Schéma représentatif des peptides synthétisés. A) Peptide GFRS. B) Peptide GFFP amidé. C) Peptide GFSR. D) Peptide GFSGV. E) Peptide GRSF

I.4 Effet des peptides synthétisés sur les cellules U87

Nous avons évalué l'effet des cinq peptides synthétiques sur les cellules U87 par un test de migration en chambre de Boyden en les comparant à celui du peptide H8 native purifié (H8n). La figure 25 montre que seuls les peptides GFRS et GFFP amidé possèdent une activité anti migratoire de 48% et 38% respectivement, mais cette activité est plus faible que celle observée avec H8n.

Ainsi, nous pouvons conclure que d'après les premiers tests réalisés aucun de ces peptides n'a montré une activité aussi importante que H8n. D'autres études structurales sont nécessaires pour déterminer la séquence exacte de H8.

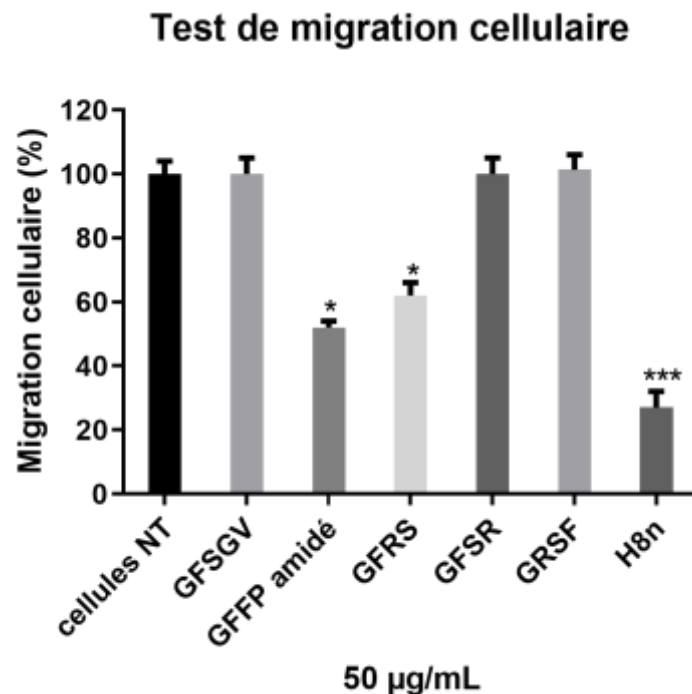


Figure 24 : Effet des peptides synthétisés et du peptide purifié sur la migration des cellules U87

La migration cellulaire est effectuée dans des chambres de Boyden en utilisant une membrane poreuse. Les cellules U87 (10^5 cellules/puits) sont pré-incubées ou non avec 50 µg/ml des molécules testées (GFRS, GFFPamidé, GFSR, GFSGV et GRSF), déposées dans la chambre supérieure et incubées pendant 6 heures à 37°C.

Chapitre II : Conception et synthèse d'analogues du térapeptide AaTs-1 agissant sur la prolifération des cellules U87 de glioblastome

Introduction

La conception des molécules thérapeutiques est un processus très long et demande des analyses approfondies. Certains médicaments sont basés sur des molécules naturelles qui ont subi des modifications structurales. En effet, la modification des structures de base peut présenter plusieurs avantages pour améliorer leurs effets, tels que l'augmentation de l'affinité pour leurs cibles cellulaires, les protéger de la dégradation par des enzymes et améliorer leur stabilité afin d'augmenter leur temps de demi-vie et leur permettre d'atteindre leurs cibles thérapeutiques. D'où l'objectif de ce chapitre, qui est la conception de nouveaux analogues basés sur la structure de l'une des molécules identifiées dans ce travail, afin d'améliorer ou de modifier son effet.

Etant donné que la structure de H8 n'a pas été totalement élucidée, nous avons choisi de travailler sur le térapeptide H9 (IWKS), nommé AaTs-1, qui inhibe la prolifération des cellules U87 avec une IC_{50} de 566 μ M. En effet, ce peptide agit sur la protéine P53, suppresseur de tumeur, en augmentant son expression (Aissaoui et al 2021). Il est aussi capable de réduire le taux du calcium intracellulaire, diminuant ainsi de façon significative, la prolifération des cellules U87 sans affecter leur viabilité.

La molécule AaTs-1 présente un potentiel thérapeutique intéressant, grâce notamment à son activité qui passe par le récepteur de peptide N-formyle, FPRL-1, qui est jusqu'à maintenant peu exploré. En effet, il a été démontré que le récepteur FPRL-1 est exprimé dans plusieurs tissus humains et surtout dans les cellules neuronales et les cellules inflammatoires (Weiß and Kretschmer, 2018). De ce fait, quelques recherches ont mis en évidence l'implication de ce récepteur dans plusieurs pathologies telles que les maladies neurodégénératives, certaines pathologies psychiatriques, l'ischémie et les maladies liées à aux dysfonctionnement neuro-inflammatoire (Trojan et al., 2020). Certaines molécules, qui interagissent en tant qu'agonistes ou antagonistes du récepteur FPRL-1, ont été identifiées mais ne sont pas encore exploitées en thérapie.

Les agonistes du récepteurs FPRL-1, qu'ils soient naturels tels les peptides d'origine virale ou bactérienne comme Hp(2-20) de la bactérie *Helicobacter pylori* ou synthétiques tels le peptide WKYMVm, possèdent une grande affinité pour le récepteur et agissent sur le flux calcique intracellulaire (Bae et al., 2003; Bylund et al., 2001). Les antagonistes comme le décapeptide cyclique cyclosporine H, issu du champignon *Tolypocladium inflatum* ou le peptide

synthétique WRWWW peuvent bloquer le récepteur sans engendrer de réactions intracellulaires (Bae et al., 2003; Wenzel-Seifert et al., 1998).

Ainsi, il est important de mieux explorer l'effet de AaTs-1 et d'essayer d'augmenter son affinité vis-à-vis de son récepteur pour améliorer l'activité antiproliférative observée. Nous nous sommes fixés comme objectif de synthétiser la molécule AaTs-1 et de concevoir des analogues en se basant sur sa séquence IWKS. Toutes les synthèses de cette partie ont été effectuées par un synthétiseur automatique. En effet, cette méthode est plus rentable en termes de temps, de coût et de rendement, que la méthode manuelle utilisée précédemment dans notre travail.

II.1 Conception des analogues amidés et acétylés

Nous avons donc synthétisé le peptide AaTs-1 et différents analogues. Les premières modifications réalisées sur la molécule AaTs-1 ont ciblé les extrémités C et N terminales.

- Nous avons commencé par amidier le côté C-terminal afin de mimer la structure d'autres molécules naturelles possèdent 1 terminaison amide et une autre amine (Reynaud et al., 2020). Cette amidation a pour objectif d'améliorer l'effet de la molécule en supprimant la charge négative du carboxyle.

- En deuxième lieu nous avons acétylé l'extrémité N-terminale afin d'éliminer la charge positive et évaluer son implication dans l'effet observé.

- Finalement un dernier peptide, à la fois acétylé et amidé, a été synthétisé (figure 26).

II.1.1 Synthèse de AaTs-1 et les analogues amidés et acétylés

Afin de synthétiser le peptide AaTs-1 (térapeptide plutôt facile à synthétiser) nous avons procédé à une synthèse peptidique sur support solide en utilisant la stratégie Fmoc/tBu et un synthétiseur automatique. Ainsi cette synthèse a abouti à un rendement de 85,1%

Une partie de cette résine (300 mg) est conservée avant clivage pour effectuer l'acétylation et obtenir l'analogue acétylé. Les deux résines portant les deux peptides (sAaTs1 et AaTs-1 acétylé).

La synthèse des analogues amidés (AaTs-1 amidé et AaTs-1 amidé et acétylé) est basée sur la même stratégie de synthèse peptidique sur support solide utilisée précédemment pour la synthèse de AaTs-1, mais avec une rink amide (contenant une fonction amide). Avant le clivage final, nous avons obtenu 653 mg de résine résultante qui représente un rendement de 82,5 %.

Nous avons clivé 353 mg de résine en milieu acide pour obtenir le peptide AaTs-1 amidé et 300 mg de la résine ont subi une acétylation pour obtenir le peptide AaTs-1 amidé et acétylé. Les deux produits sont ensuite solubilisés et lyophilisés pour être analysés.

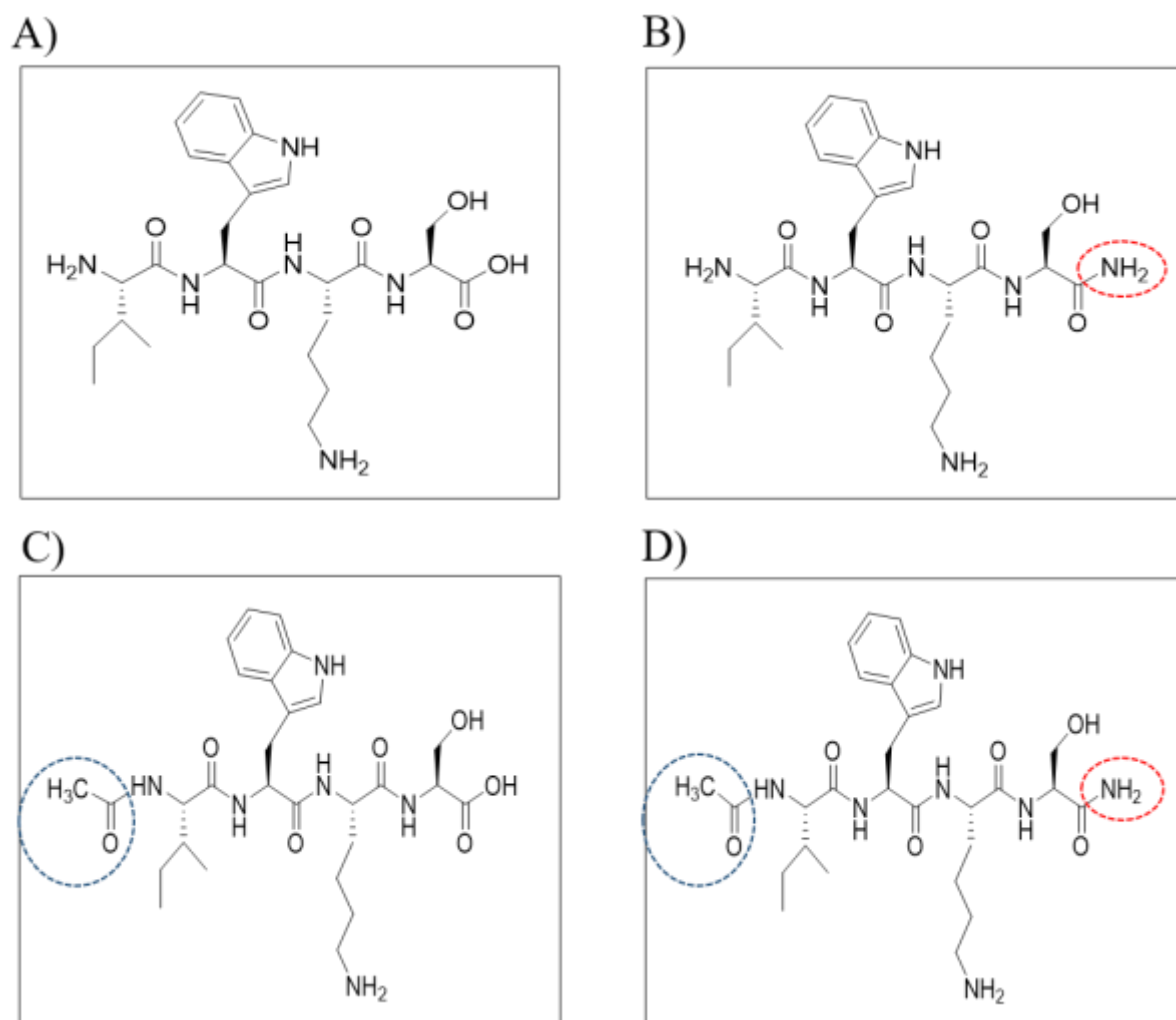


Figure 25 : Schéma représentatif des molécules analogues synthétiques de AaTs-1
 AaTs-1, B) AaTs-1 amidé (fonction amide en rouge), C) AaTs-1 acétylé (fonction acétylé en bleu), D) AaTs-1 amidé et acétylé

II.1.2 Analyse et purification des peptides synthétisés

Les produits bruts, récupérés après leur synthèse, sont analysés et caractérisés par HPLC analytique couplée à un spectromètre de masse électrospray (LC-ESI-MS). Une quantité de 20 µg de chaque peptide est injectée pour vérifier sa masse molaire. Comme rapporté sur la figure 28, toutes les masses des peptides sont observées sous leurs formes monochargées.

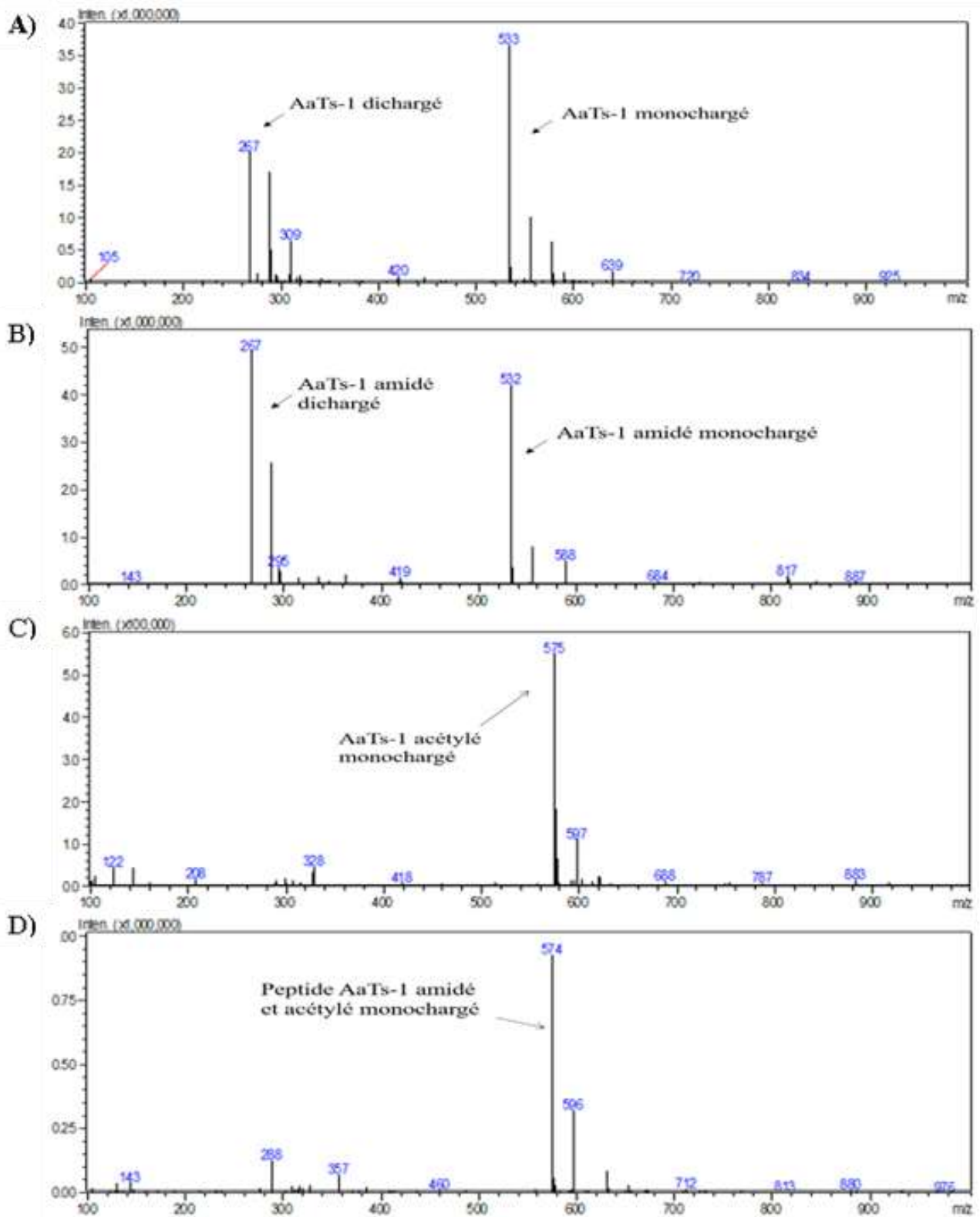


Figure 26 : les spectres de masse des peptides synthésisés
 A) AaTs-1, B) AaTs-1 amidé, C) AaTs-1 acétylé, D) AaTs-1 amidé et acétylé

Les masses expérimentales obtenues sont très proches des masses théoriques (tableau 2). En considérant la marge d'incertitude nous pouvons conclure qu'il s'agit bien des peptides désirés.

Tableau 1 : les masses molaires théoriques et les masses molaires expérimentales des peptides synthétisés.

Peptides	Masse théorique	Masse expérimentale
AaTs-1	532,64	533
AaTs-1 amidé	531,37	532
AaTs-1 acétylé	574,80	575
AaTs-1 amidé et acétylé	573,52	574

La figure 27 montre qu'il y a aussi des produits contaminants, qui sont formés durant la synthèse. La purification des 4 peptides synthétiques est effectuée en utilisant une colonne de HPLC C18 semi-préparative en phase inversée pour éliminer ces contaminants. La séparation est effectuée avec un gradient de 0 à 80% de solvant B en 80 min avec un débit de 4 ml/min. Les chromatogrammes obtenus montrent la présence de plusieurs pics (figure 29) que nous avons analysés par HPLC analytique et spectrométrie de masse afin de détecter les pics d'intérêt.

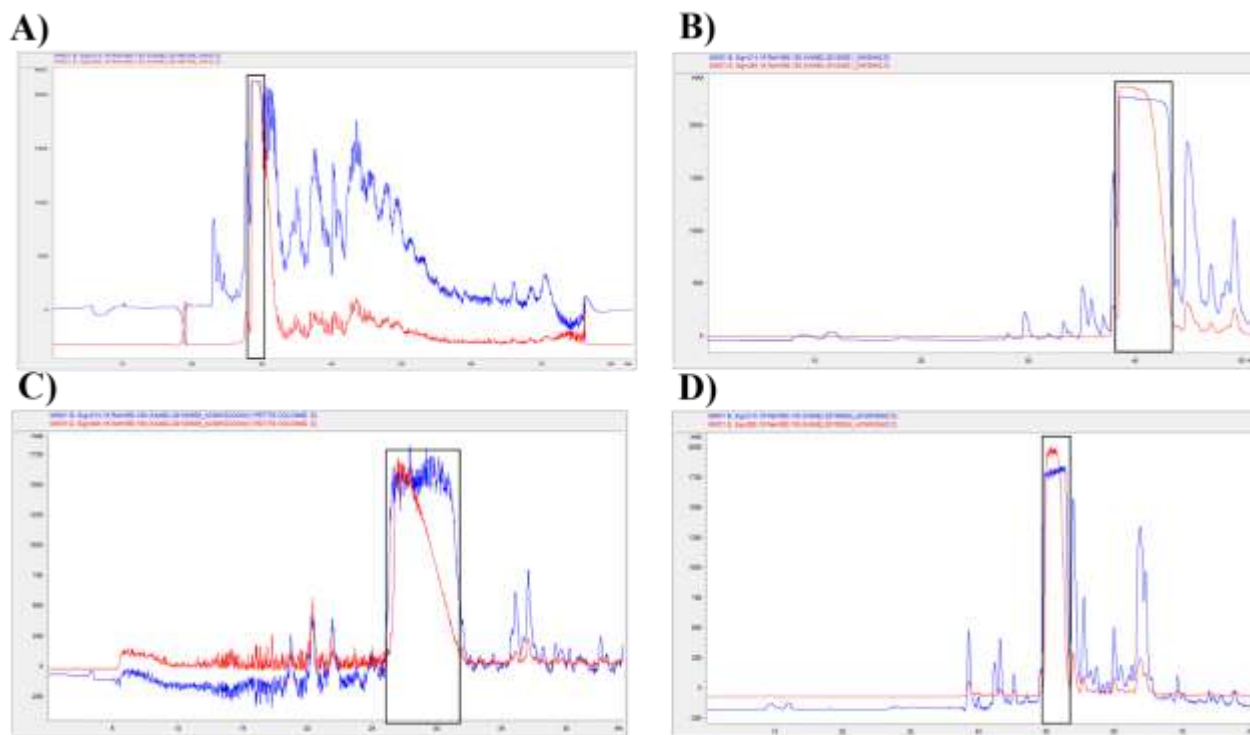


Figure 27 : Profils HPLC semi-préparatifs des peptides synthétisés

A) AaTs-1, B) AaTs-1 amidé, C) AaTs-1 acétylé, D) AaTs-1 amidé et acétylé. La courbe bleue correspond à l'absorbance à 214 nm alors que la courbe rouge représente l'absorbance à 280 nm. Les pics d'intérêts sont entourés par des rectangles noirs

Les pics entourés en noir de la figure 28 sont récupérés et analysés par LC-MS pour confirmer la masse moléculaire et la pureté des peptides. La figure 30 représente les différents profils de HPLC analytique pour les 4 peptides synthétisés. Une colonne C18 est utilisée avec un gradient qui passe de 0 à 60% de solvant B en 60 min avec un débit de 1ml/min. Le temps d'éluion (et donc le % d'ACN) des peptides diffère à cause des modifications structurales (acétylation et/ou amidation). AaTs-1 est élué à 23% d'ACN, AaTs-1 amidé est élué à 22% d'ACN. AaTs-1 acétylé est élué plus tard, à 34% d'ACN, car la fonction acétyl augmente son hydrophobicité. En revanche, AaTs-1 amidé et acétylé est élué à 32% d'ACN (figure 29).

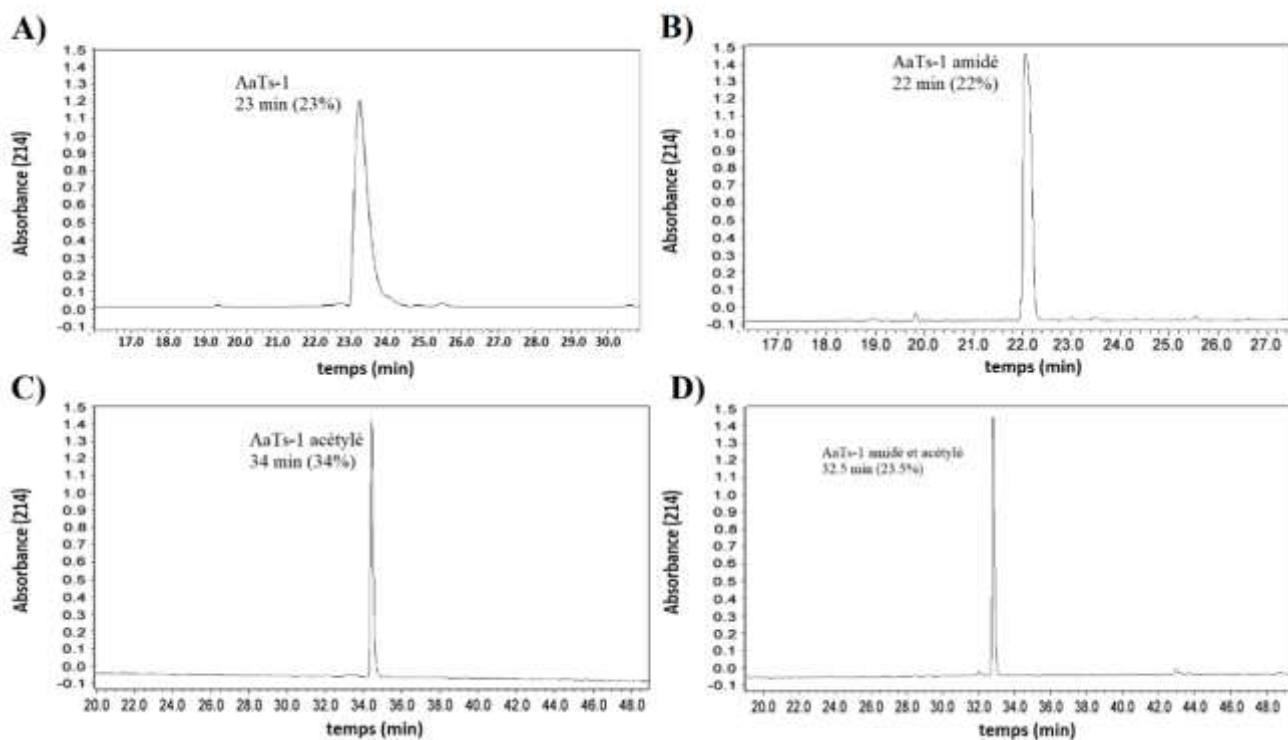


Figure 28 : Profils HPLC analytiques des peptides synthétisés

A) AaTs-1 élué à 23 min B) AaTs-1 amidé élué à 22 min C) AaTs-1 acétylé élué à 34 min D) AaTs-1 amidé et acétylé élué à 32.5 min. La détection des pics est faite à 214 nm.

II.1.3 Tests biologiques

II.1.3.1 Effet sur la prolifération des cellules U87

Il est connu que le peptide AaTs-1 n'agit pas sur la viabilité de la lignée U87 de glioblastome, mais qu'il inhibe leur prolifération après 72h d'incubation. Cette inhibition est due au blocage du récepteur régulateur du taux calcique intracellulaire FPRL-1 (Aissaoui et al. 2021). Afin de tester l'efficacité des peptides synthétiques, nous avons procédé à un test de prolifération. Pour ce faire, nous avons incubé les cellules U87 avec deux doses de AaTs-1 et de ses analogues (100 et 1000 μ M) pendant 72h. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 3h avec le MTT et la quantification des cellules vivantes est réalisée par la mesure de la DO à 560 nm. Les résultats montrent que les peptides analogues de AaTs-1 n'ont pas montré d'activité plus importante que AaTs-1. En effet, même à 1000 μ M AaTs-1 (44%) est le plus actif, les peptides amidé, acétylé et amidé acétylé n'affectant qu'à 13%, 12,7% et 15% respectivement la prolifération des cellules U87 (figure 30).

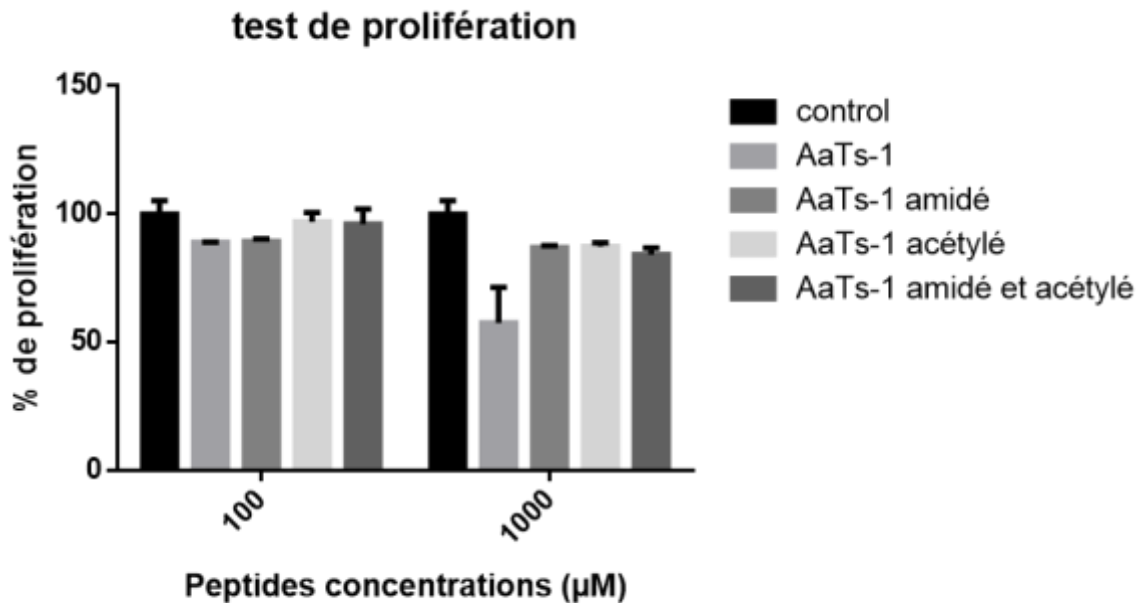


Figure 29 : Effet de AaTs-1 synthétique et de ses analogues sur la prolifération des cellules U87.

Les cellules U87 sontensemencées dans des plaque 96 puits puis et incubées avec les différentes doses des peptides synthétiques pendant 72h. Ensuite, elles sont traitées pendant 3h avec le MTT et la DO est mesuré à 560 nm.

II.1.3.2 Effet sur l'adhésion et la migration des cellules U87

Les cellules gliomateuses U87 sont très invasives et expriment à leur surface des inégrines telle que $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ et $\alpha 5 \beta 1$ qui possèdent une affinité pour la fibronectine (Ma et al., 2012, p. 1; Roth et al., 2013). Des tests d'adhésion et de migration des cellules U87 sur fibronectine en présence de 1mM pour chaque peptide.

Pour le test d'adhésion, 5×10^4 cellules de la lignée U87 sont incubées pendant 30 min à température ambiante avec chaque peptide, à une concentration de 1 mM, sous agitation. Ensuite, les cellules sont incubées dans une plaque de 96 puits pré-traitée par 10µg/ml de fibronectine pendant 2h à 37°C. Après incubation, les cellules sont fixées par le glutaraldéhyde et colorées par le cristal violet pendant 30 min. Les cellules adhérentes sont quantifiées par lecture de la DO à 560 nm.

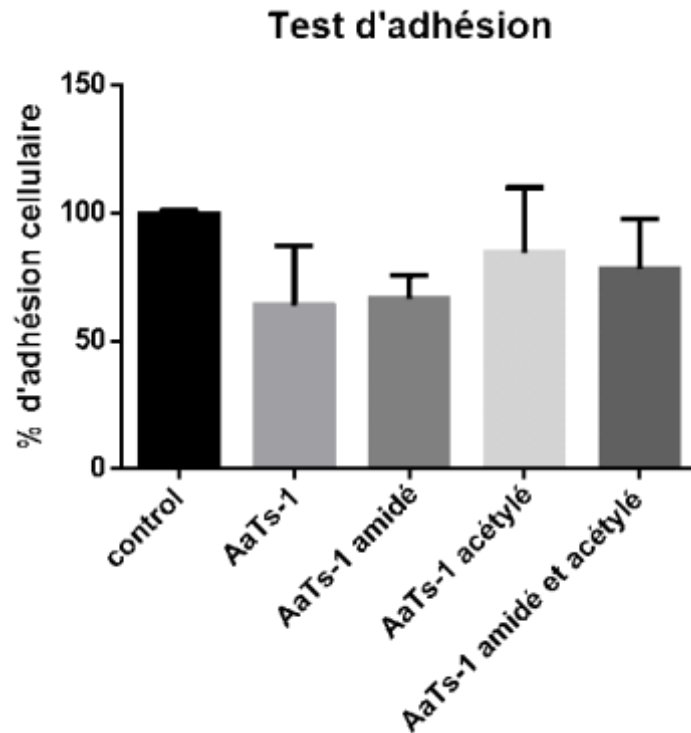


Figure 30 : Effet de AaTs-1 et ses analogues sur l'adhésion des cellules U87.
 Les cellules U87 traitées par 1 mM des peptides analogues, sont déposées dans une plaque 96 prétraitée par la fibronectine. Après incubation de 2h les cellules sont fixées, colorées et la DO est mesurée à 560 nm.

Nos résultats montrnt que AaTs-1 et AaTs-1 amidé présentent le meilleur effet sur l'adhésion des cellules U87 (Figure 31) (inhibition de 36% et 33,3% respectivement). Ce résultat montre que la présence du groupement acétyl dans la structure de AaTs-1 (AaTs-1 acétylé et AaTs-1 amidé et acétylé inhibent respectivement 15,5% et 21,7% l'adhésion) peut avoir une influence sur la diminution de l'effet sur l'inhibition de l'adhésion des cellules U87.

Afin d'étudier l'effet anti-migratoire de AaTs-1 et des analogues sur les cellules U87 nous avons procédé à un test de migration utilisant la chambre de Boyden. Après 6 heures d'incubation à 37°C, les cellules qui ont migré sur la face inférieure de la membrane de la chambre de Boyden sont fixées par du glutaraldhéhyde (4%), colorées par du cristal violet et quantifiées à 560 nm. Les valeurs de la DO sont converties en pourcentage de migration et comparées aux valeurs du contrôle négatif (cellules non traitées) qui représente 100% de migration.

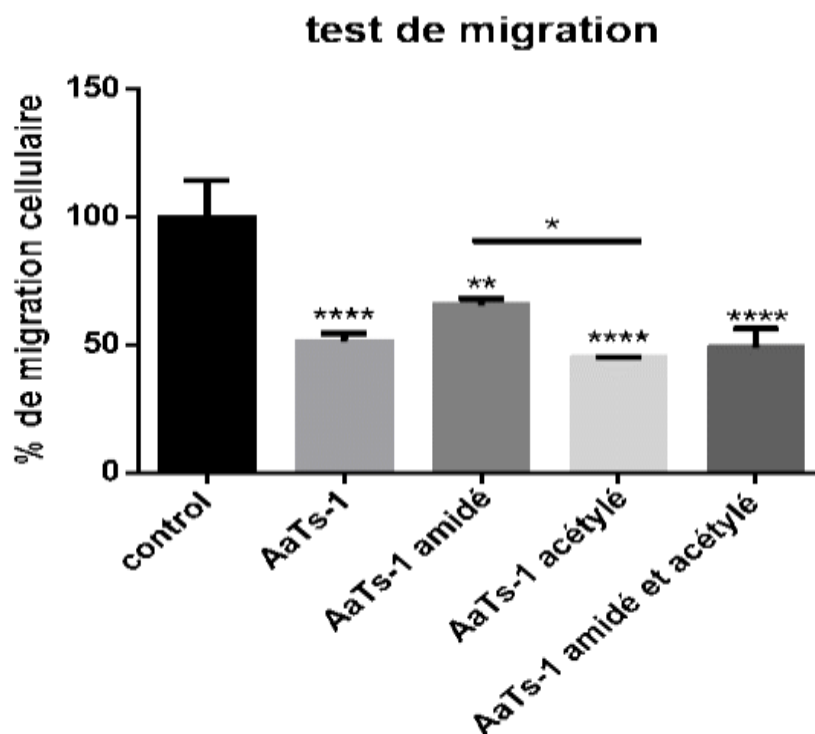


Figure 31 : Effet de AaTs-1 et des analogues sur la migration des cellules U87.
 Le test de migration est effectué dans une chambre de boyden. Les cellules U87 (100000) sont incubées sous agitation pendant une 30 min 1 mM de chaque peptide. Ensuite elles sont déposées dans le dispositif pendant 6h. Les cellules qui ont migré sont fixées et colorées et DO est mesurée à 560 nm.

Les résultats montrent que tous les peptides inhibent la migration des cellules U87 à une concentration de 1 mM. Cependant, à part AaTs-1 acétylé (55% d'inhibition), qui est légèrement plus actif que le peptide AaTs-1 (48,7% d'inhibition), les autres modifications n'ont pas amélioré l'activité du peptide initial (figure 32). Ces résultats montrent que ces peptides à 1 mM ont un effet inhibiteur sur l'adhésion mais surtout sur la migration des cellules U87.

II.2. Conception et caractérisation d'un analogue cyclique

La conception de peptides cycliques à partir de motifs naturels qui possèdent des activités anti cancéreuses a été explorée auparavant. En effet, plusieurs travaux ont été réalisés sur le motif

RGD qui possède une activité anti-tumorale. Le motif RGD, retrouvé dans les désintégrines issues de venins animaux, est directement relié à leur activité. Des études ont montré que la cyclisation du motif RGD augmente considérablement son activité anti-cancéreuse, notamment sur le glioblastome (Mas-Moruno et al., 2010). En se basant sur ces travaux, nous avons décidé de synthétiser un peptide cyclique basé sur le motif IWKS du peptide AaTs-1.

II.2.1 Synthèse du peptide cyclique

La synthèse de ce peptide cyclique est basée sur la même stratégie de synthèse précédemment citée dans ce travail. Nous avons ajouté des cystéines des deux extrémités N et C terminales pour créer des ponts disulfures en oxydant les groupements SH qui se trouvent dans les radicaux de cet acide aminé. Afin d'avoir une meilleure cyclisation du peptide, des acides aminés proline sont aussi ajoutés aux deux extrémités de sa séquence, précédant les résidus cystéine. En effet, les résidus proline permettent de favoriser la cyclisation en formant des coude en amont des deux résidus cystéine des extrémités du peptide. Ainsi, la séquence finale du peptide cyclique est : CPIWKSPC, pour donner une structure cyclique représentée dans la figure 33.

Nous avons obtenu un rendement de synthèse est de 47,6% après avoir séché et pesé la résine.

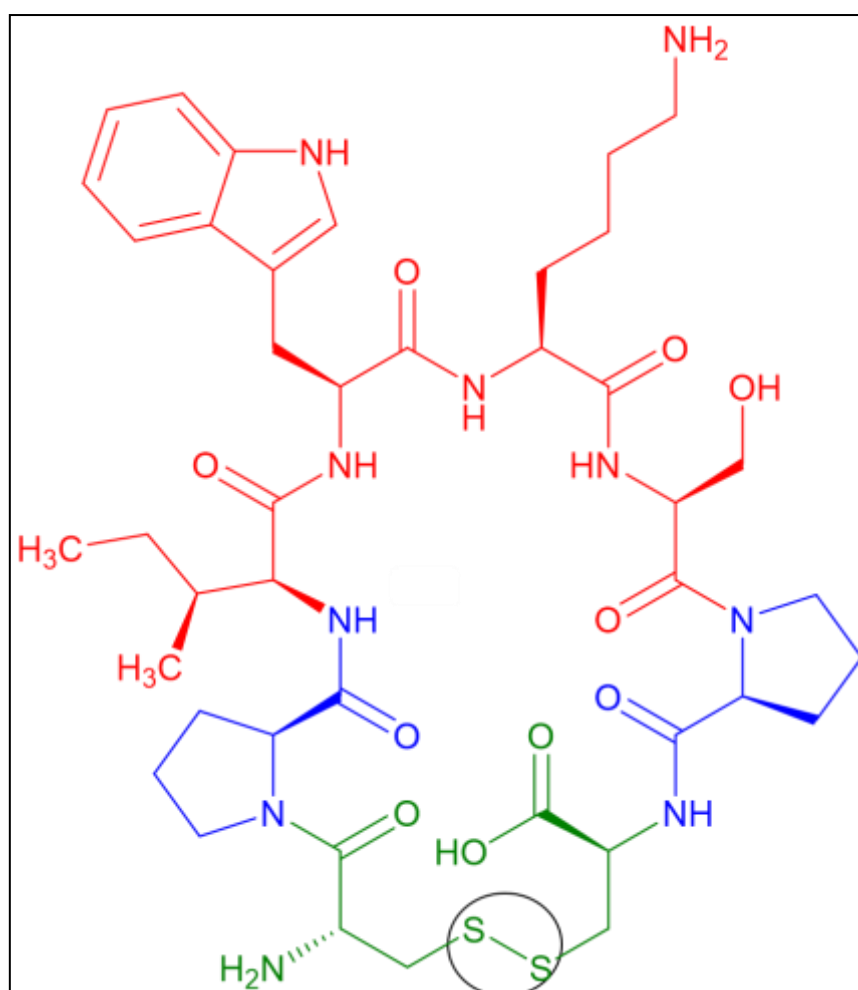


Figure 32 : schéma représentatif du peptide cyclique

Le motif IWKS en rouge, les prolines en bleu et les cystéines en vert. Le pont disulfure est entouré en noir

II.2.2 Oxydation et purification du peptide cyclique

Dès la fin de la première étape de synthèse (assemblage des acides aminés) un clivage final en milieu acide (95% TFA : 2,5% TMS ; 2,5% H₂O) est réalisé. Ensuite, le peptide est solubilisé par le diéthyléther pour avoir le produit de synthèse brut, que l'on lyophilise pour éliminer les traces des réactifs utilisés lors de la synthèse.

Afin de cycliser le peptide, une étape d'oxydation est nécessaire pour former un pont disulfure entre les résidus cystéine aux extrémités du peptide. L'oxydation est effectuée à l'air libre dans une solution contenant 70% de Tris-HCL (0.1 M, pH 8.3) et 30% d'acétonitrile. Le suivi de l'oxydation est réalisé par HPLC analytique afin de détecter les pics correspondant aux peptides réduits et oxydés. L'oxydation d'une partie du peptide est confirmée après 72h (figure 34).

Après oxydation le produit cyclique est purifié par HPLC préparative utilisant une colonne RP18. L'élution est effectuée avec un gradient de 20% à 60% de solvant B en 40 min, à un débit de 6 ml/min. Nos résultats montrent que seule une petite partie du peptide a été oxydée (figure 35). Néanmoins, la quantité purifiée était suffisante pour réaliser les tests cellulaires.

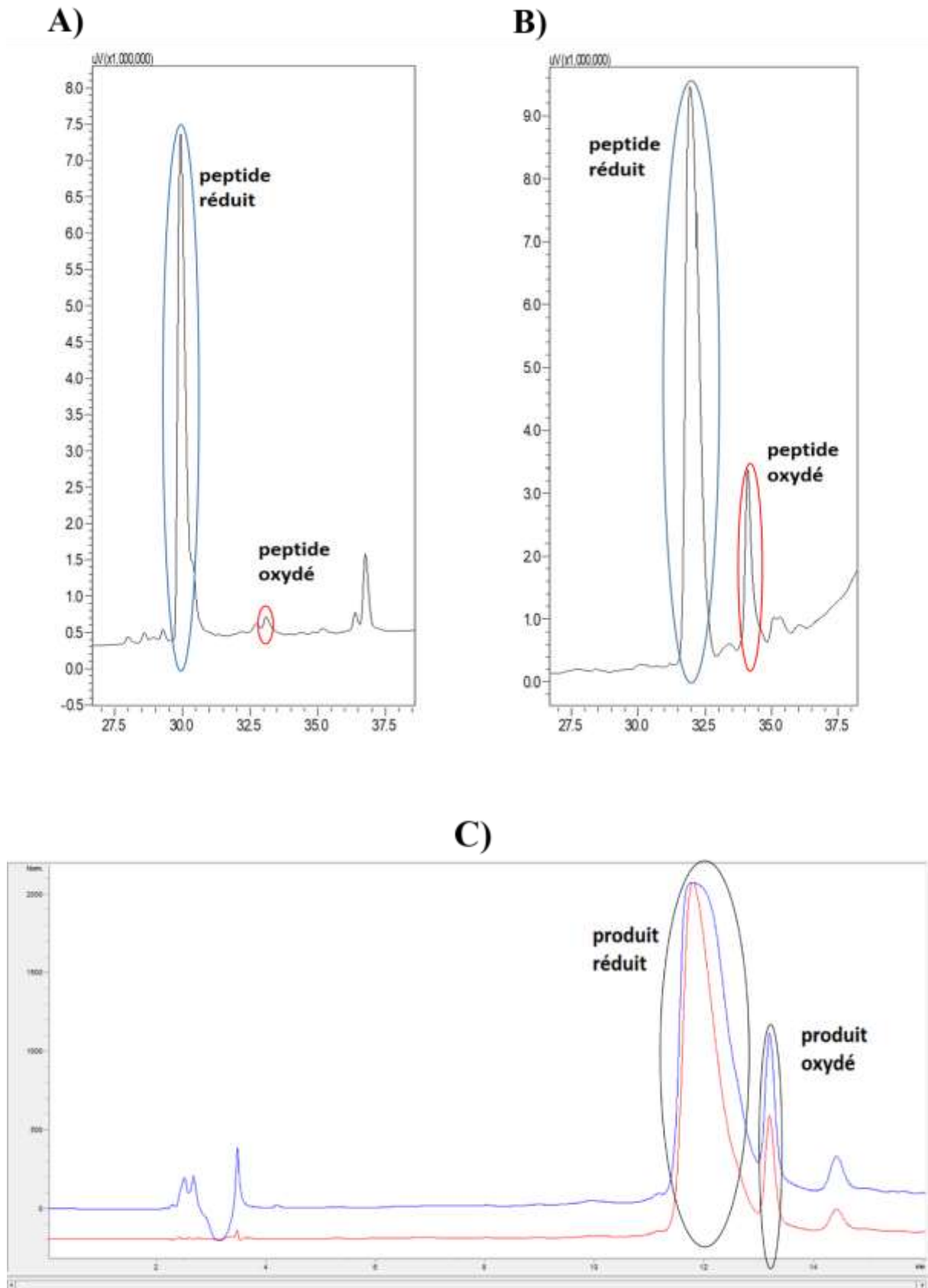


Figure 33 : Profils de HPLC analytique du peptide cyclique

A) HPLC analytique du peptide cyclique à T_0 après la synthèse. B) HPLC analytique du peptide cyclique à T_{72h} de la réaction d'oxydation (C) HPLC préparative du peptide cyclique

Le peptide cyclique purifié est ensuite analysé par LC-MS. Le spectre de masse affiche la masse mono-chargée à 933 Da et la masse di-chargée du peptide 467 Da (figure 35), sachant que la masse molaire théorique du peptide cyclique oxydé est de 932,14 Da. Ces résultats montrent qu'il s'agit bien du peptide désiré.

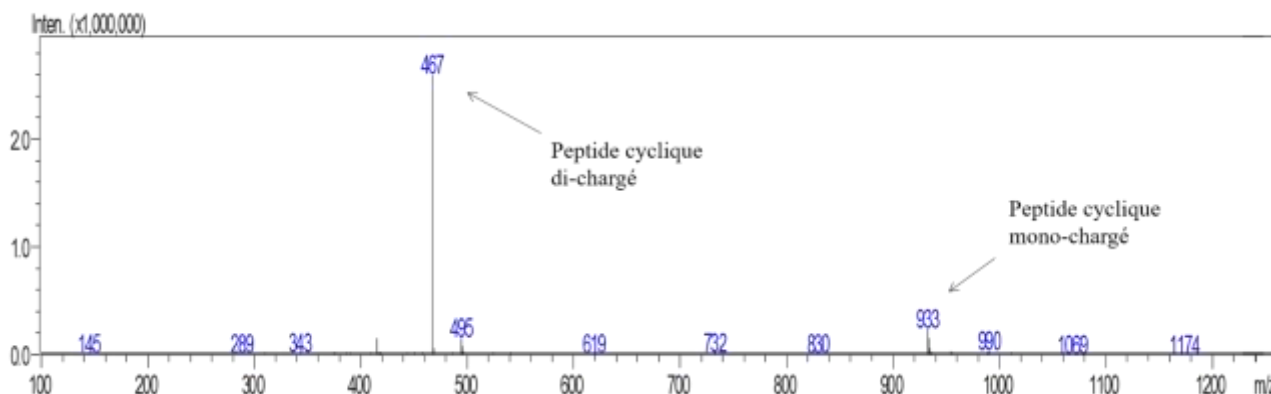


Figure 34 : Spectre de masse du peptide cyclique oxydé

II.2.3 Effet du peptide cyclique sur la viabilité et la prolifération des cellules U87

Afin de tester l'efficacité du peptide cyclique, nous avons procédé à un test MTT.

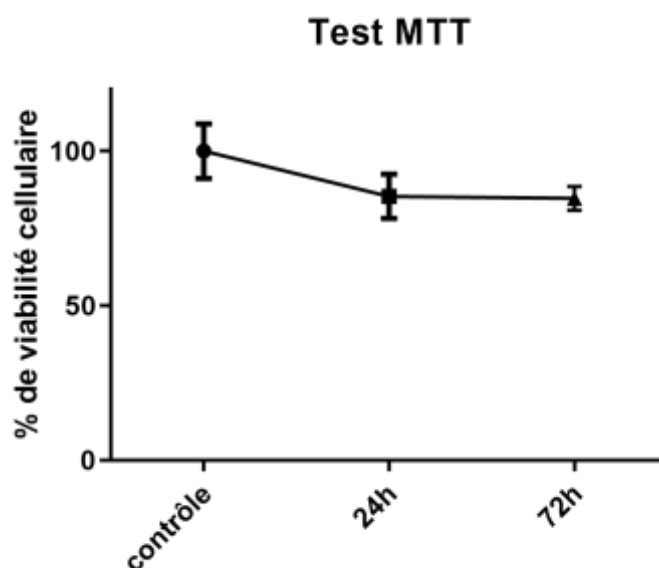


Figure 35 : Courbe représentative de l'effet du peptide cyclique sur la viabilité des cellules U87

Les cellules sont traitées pendant 24h et 72h par 1 mM du peptide cyclique. La quantification des cellules vivantes est réalisée par MTT.

Les cellules sont traitées par 1 mM du peptide cyclique avec deux temps d'incubation, 24h pour évaluer son effet sur la viabilité, et 72h pour la prolifération cellulaire. Comme le montre la figure 36, le peptide cyclique à 1mM n'agit, ni sur la viabilité, ni sur la prolifération des cellules U87.

Ainsi, les résultats sur les activités de tous les peptides que nous avons conçus et synthétisés jusqu'à présent, montrent que les modifications apportées sur la séquence du peptide AaTs-1 se sont avérées inefficaces.

Nous avons donc tenté un autre type de modification, qui consiste à synthétiser des analogues dendrimériques basés sur la stratégie de synthèse des *multiple antigen peptide* (MAP). Il s'agit d'une stratégie très sollicitée qui présente l'avantage d'augmenter l'efficacité des molécules pour la production des analogues plus actifs. Nous avons donc conçu des analogues de AaTs-1 avec des dendrimères multi-branchés possédant plusieurs séquences IWKS.

II.3 Conception des dendrimères multi-branchés

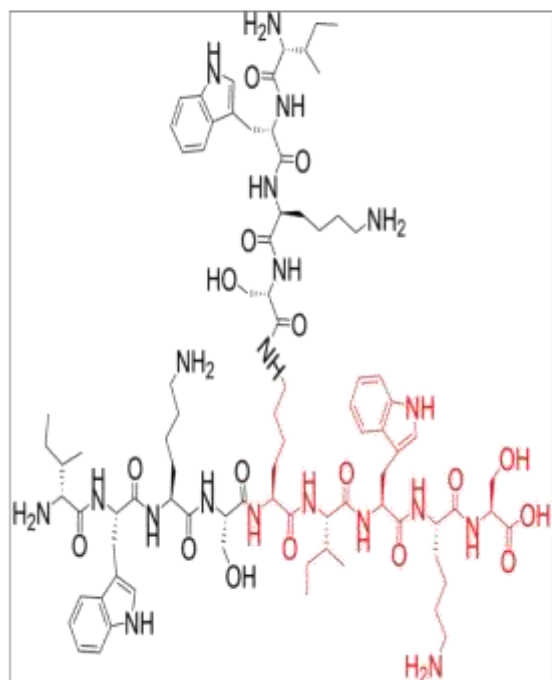
James P. Tam (J P Tam, 1988) a introduit en 1988 une nouvelle stratégie de synthèse, qu'il a intitulée *multiple antigen peptide* (MAP). Cette méthode a pour but d'améliorer les fonctionnalités de certains agents immunogènes ou thérapeutiques. Ces entités font parties d'une famille de molécules synthétiques appelées dendrimères qui possèdent des structures très particulières. (Sapra et al., 2019).

II.3.1 Synthèse des dendrimères multi-branchés

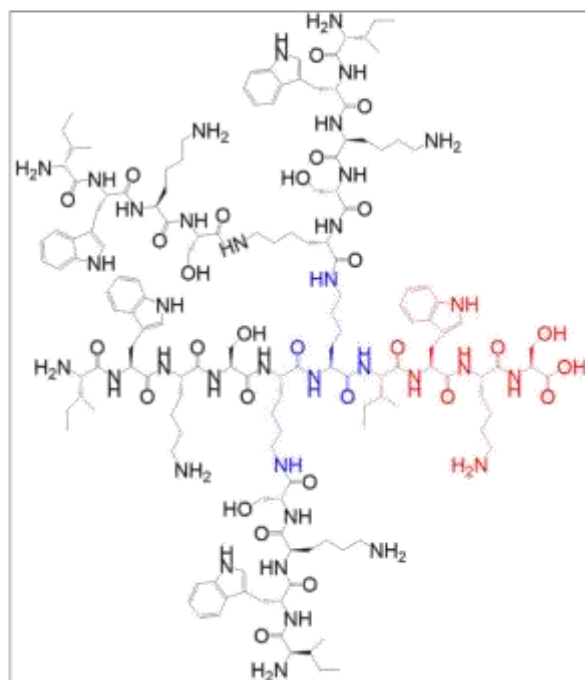
Les peptides ramifiés di-([IWKS]₂-K-βA), tétra-([IWKS]₄-[K]₂-K-βA) et octa-([IWKS]₈-[K]₄-[K]₂-K-βA) ont été assemblés en utilisant la stratégie Fmoc/tbu sur une résine HMP. La synthèse de ces analogues est basée sur un système permettant le greffage de plusieurs motifs (IKWS), par leur extrémité N-terminale, sur les groupes α et ε amino des lysines ramifiées (Tam and Spetzler, 1997), donnant ainsi à ces dendrimères une conformation tridimensionnelle différente du peptide de départ (Mabrouk et al., 1995).

La structure des dendrimères ramifiés contient trois composantes comme le montre la figure 38. La première est constituée de la séquence initiale, suivie d'un noyau de polylysine puis de plusieurs copies de la séquence IWKS (2, 4 et 8 motifs pour le di-branché, le tétra-branché et l'octa-branché respectivement) (figure 37).

A)



B)



C)

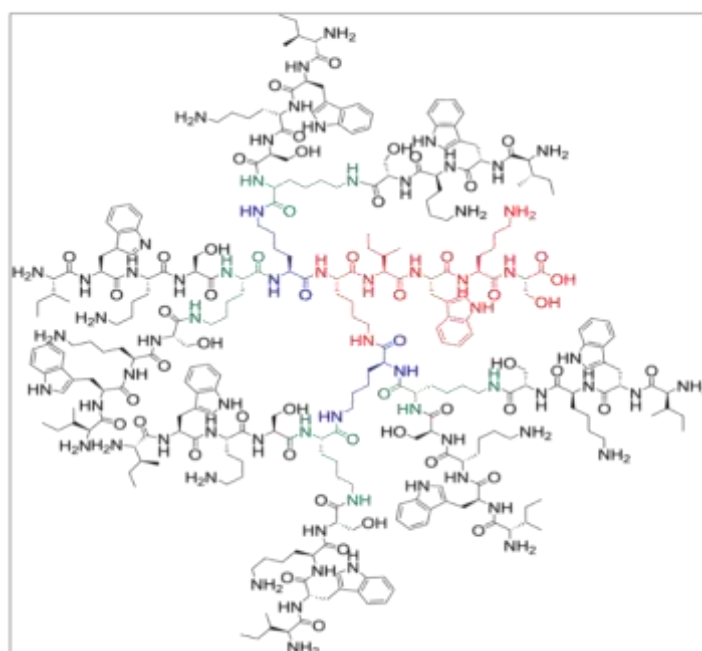


Figure 36 : Schémas représentatif des dendrimères multi-branchés
 A) AaTs-1-2B. B) AaTs-1-4B. C) AaTs-1-8B.

Les rendements des synthèses des molécules multi-branchés sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 2 : Rendement des synthèses des molécules multi-branchées

molécule	n résines (mmol)	PM (g/mol)	m résines (mg)	Masse théorique (mg)	Masse expérimentale (mg)	Rendement (%)
AaTs1-2B	0,2	1690	357	695	570	82
AaTs-1-4B	0,2	2976	357	952	628	65,9
AaTs-1-8B	0,2	5547	357	1466,4	1225	83,5

II.3.2 Analyse et purification des dendrimères multi-branchés

Tous les dendrimères multi-branchés ont été caractérisés, après la synthèse, par spectrométrie de masse électrospray (ESI-MS). Comme indiqué dans la figure 39, pour AaTs-1-2B nous avons détecté les masses 845, 564 et 423 qui correspondent aux fragments deux, trois et quatre fois chargés. Par contre, pour AaTs-1-4B, nous n'avons détecté que la masse de 596 qui correspond à la molécule cinq fois chargée. Les masses détectées pour AaTs-1-8B sont 1111, 925,793 et 694 qui correspondent respectivement, aux entités cinq, six, sept et huit fois chargés (figure 38).

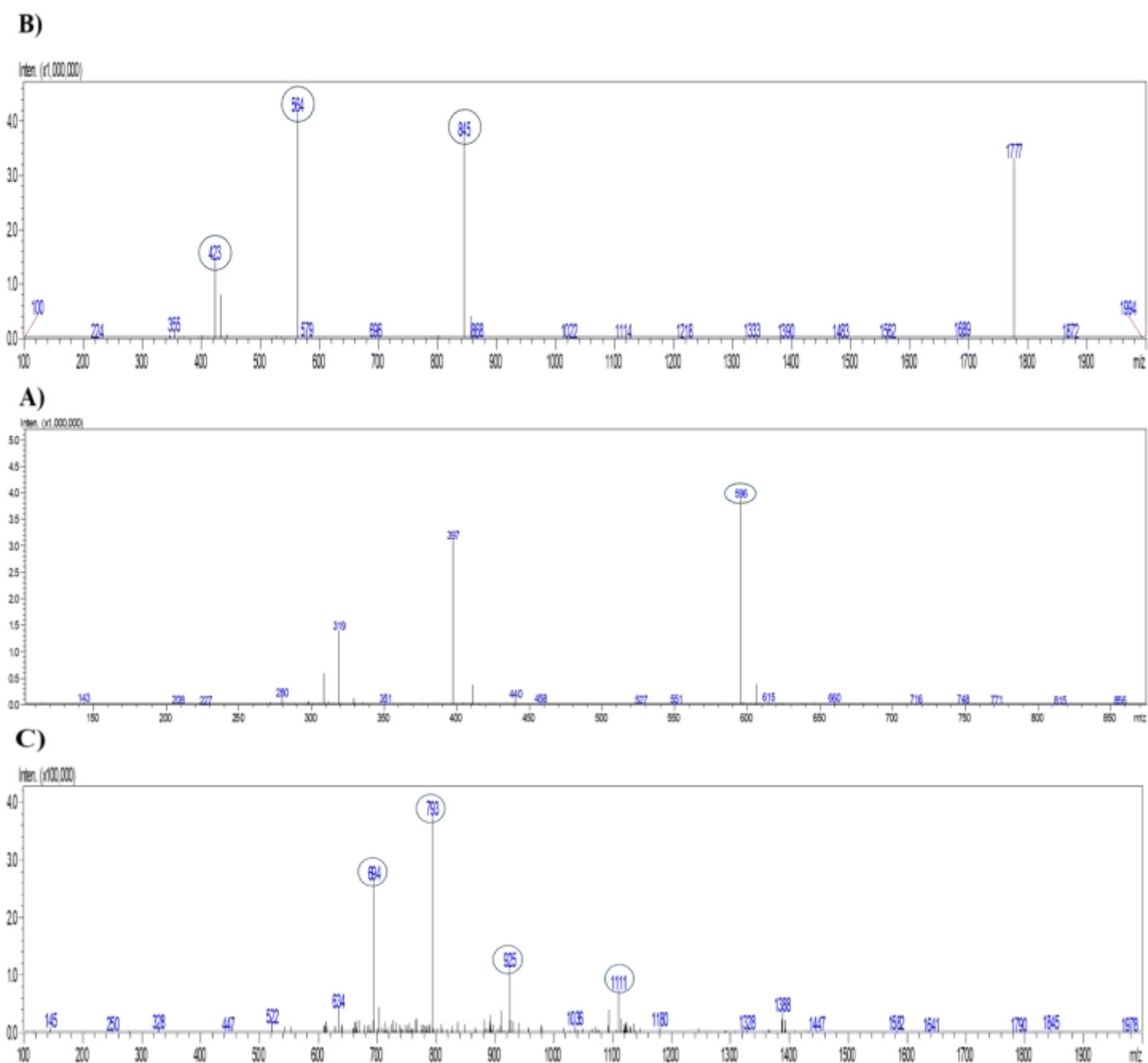


Figure 37 : Spectres de masse des molécules multibranchées

A) AaTs-1-2B : masses détectées 845, 564 et 423. B) AaTs-1-4B : masse détectée 596. C) AaTs-1-8B : masses détectées : 1111, 925, 793 et 694.

Nous avons ensuite procédé à la purification des 3 molécules dendritiques multi-branchées sur une colonne de HPLC C18 préparative en phase inverse. La séparation est effectuée dans un gradient qui passe de 0 à 80% de solvant B en 80 min avec un débit de 6 ml/min (figure 39).

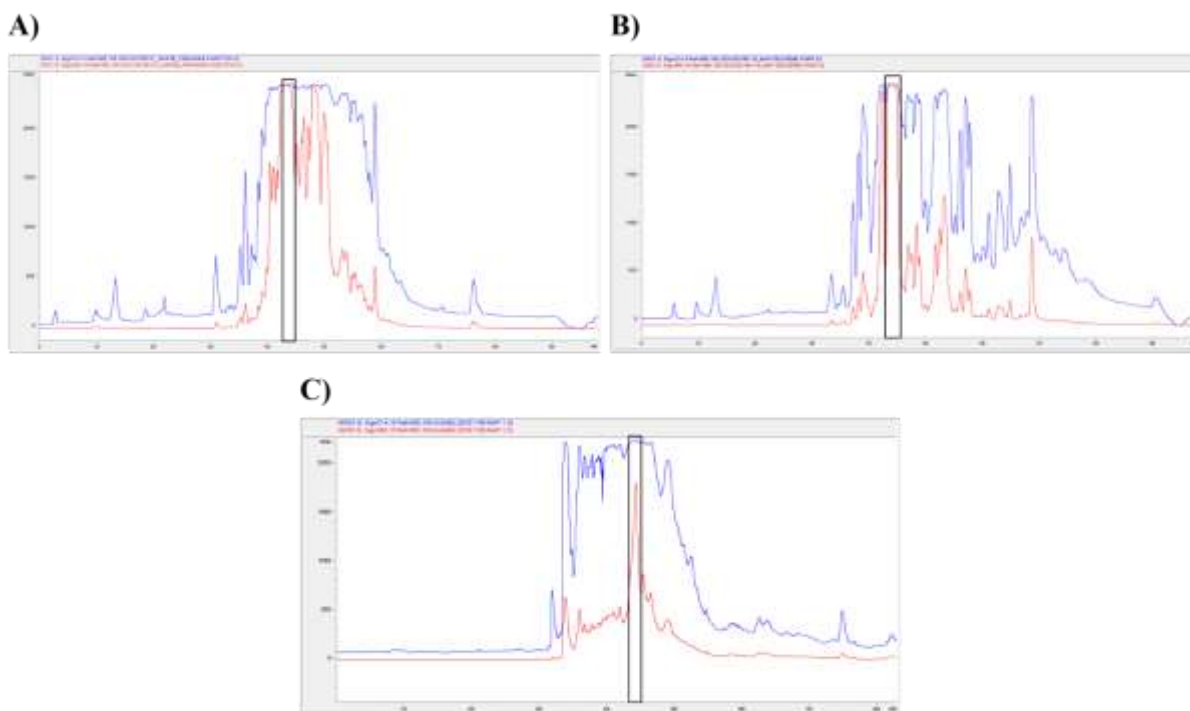


Figure 38 : Profils HPLC préparatifs des dendrimères multi-branchés

A) AaTs-1-2B B) AaTs-1-4B, C) AaTs-1-8B. La courbe bleue correspond à l'absorbance à 214 nm alors que la courbe rouge représente l'absorbance à 280 nm. Les pics d'intérêt sont entourés par des rectangles noirs A) AaTs-1-2B élué à 27.5 min. B) AaTs-1-4B élué à 33 min C) AaTs-1-8B élué à 40 min.

L'analyse des fractions pures des molécules dendritiques multi-branchées est réalisée par HPLC utilisant une colonne C18 analytique avec un gradient qui passe de 0 à 60% d'acétonitrile en 60 min et un débit de 1ml/min. Les molécules présentent des temps de rétention différents en raison des modifications structurales induites sur les séquences de l'AaTs1. AaTs-1-2B est élué à 27,5 min; AaTs-1-4B est élué à 33 min et l'AaTs-1-8B est élué à 40 min (Figure 40).

Les dendrimères analysés et purifiés sont ensuite testés sur les cellules U87 et comparés avec la molécule AaTs-1.

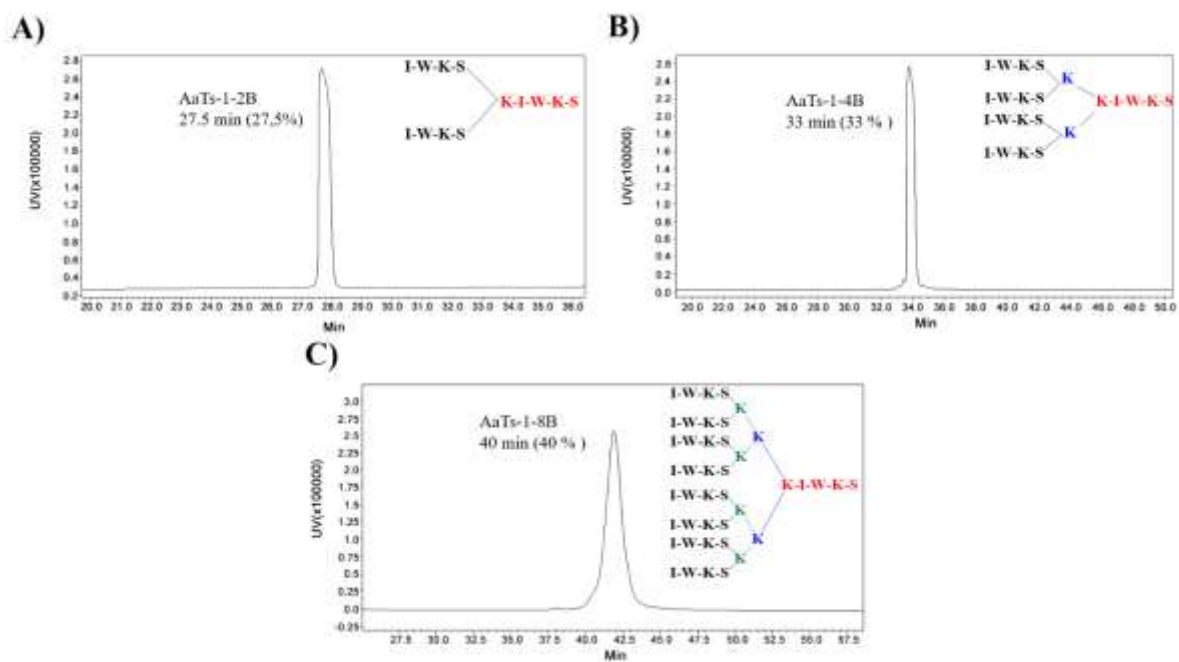


Figure 39 : Profils HPLC analytiques des dendrimères multibranchés

A) AaTs-1-2B élué à 27.5 min. B) AaTs-1-4B éluée à 33 min C) AaTs-1-8B éluée à 40 min. Une fois les molécules dendritiques multi-branchées synthétisées, analysées et purifiées, elles sont testées sur les cellules U87 avec la molécule AaTs-1.

II.3.3 Caractérisation pharmacologique des molécules multi-branchées

II.3.3.1 Viabilité et prolifération des cellules U87

Dans un premier temps, l'effet des dendrimères sur la viabilité des cellules U87 a été évalué par le test MTT. Les résultats ont montré que AaTs-1 et AaTs-1-2B n'avaient aucun effet sur les cellules U87, après un traitement de 24h. Par contre, AaTs-1-4B à 100 μ M inhibe de 33,7% leur viabilité. L'inhibition la plus importante a été obtenue avec la molécule octabranchée, AaTs-1-8B, avec une IC_{50} de 31,94 μ M (Figure 41A).

L'évaluation de l'effet des molécules sur la prolifération des cellules U87 (viabilité après 72h) a montré que les molécules multi-branchées inhibent la prolifération des cellules U87 avec des valeurs IC_{50} de 22,7 μ M, 48,2 μ M et 51,5 μ M pour AaTs-1-8B, AaTs-1-4B, et AaTs-1-2B, respectivement, tandis que AaTs-1 n'a presque pas d'effet aux concentrations utilisées (Figure 42B).

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que les modifications que nous avons apportées à la structure de l'AaTs-1 ont augmenté d'au moins 10 fois son effet sur la prolifération des cellules U87. En effet, l'AaTs-1 à 100 μ M n'a montré qu'une inhibition de 12,7%, alors que les molécules multi-branchées ont inhibé la prolifération des cellules U87 de plus de 80% à la même concentration (Figure 41B). Ces résultats sont en accord avec des travaux réalisés sur

des molécules chimio-thérapeutiques telles que le paclitaxel et le cisplatine. En effet, ces molécules ont été conjuguées dans un système de dendrimères et leur efficacité contre les cellules du cancer du sein a significativement augmenté (Chis et al., 2020).

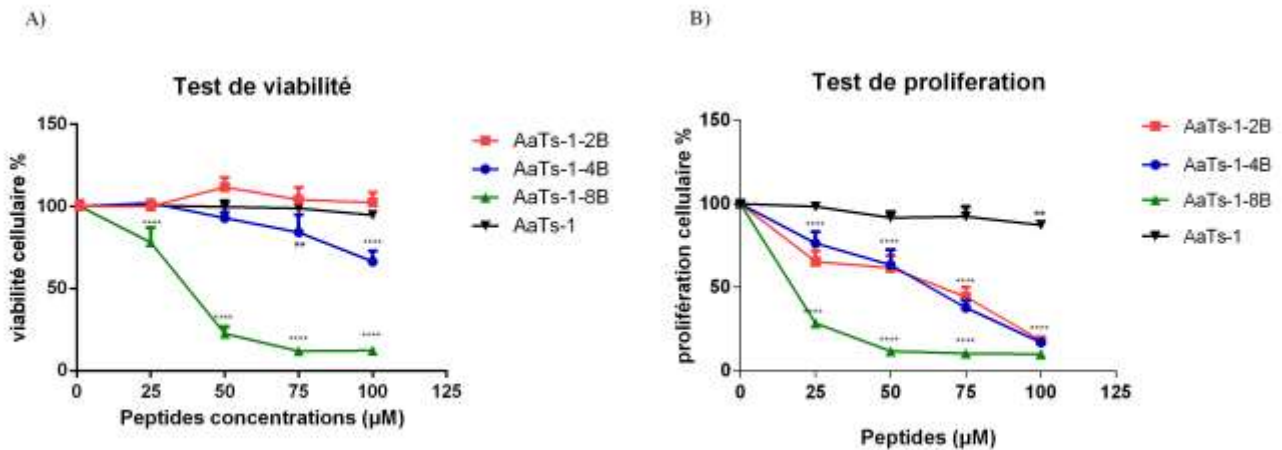


Figure 40 : courbes représentatives des effets de AaTs-1 et les molécules multi-branchées sur la viabilité et la prolifération des cellules U87

A) test de viabilité cellulaire (après 24h de traitement). B) test de prolifération cellulaire (après 72h de traitement).

Cependant, nous avons noté que AaTs-1-2B et AaTs-1-4B ont montré à peu près le même effet sur la prolifération avec des IC_{50} comparables. Ceci montre que l'effet n'est pas proportionnel au nombre de branches greffées et qu'il faut une structure particulière, avec un nombre de branches requis, pour obtenir un effet optimal.

II.3.3.2. Toxicité *in vivo* de AaTs-1 et des molécules multi-branchées sur souris saines

Pour vérifier si les nouvelles structures n'engendrent pas de toxicité, des injections intra-cérébro-ventriculaire ont été réalisées sur des souris mâles C57/BL6 en utilisant 2 doses de chaque molécule. Nous avons noté que toutes les souris injectées par AaTs-1 ou par les analogues dendritiques restent vivantes même après 24h de l'injection. De plus, aucun signe de toxicité ou de changement de comportement n'a été enregistré chez les souris injectées par ces molécules. Ce résultat montre que les molécules ne sont pas toxiques sur les souris. En effet, comparé à AaHIII ($DL_{50} = 0,5$ ng), la molécule la plus toxique du venin de scorpion *Androctonus australis Hector* (Clot-Faybesse et al., 1999), AaTs-1 et les dendrimères sont au moins 8000 fois moins toxiques.

II.3.3.3. Toxicité *in vitro* de AaTs-1 et les dendrimères multi-branchés : dosage de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase

Afin de déterminer le mécanisme de mort cellulaire subie par les cellules U87, nous avons effectué un test de dosage de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). Le taux de cette enzyme libérée dans le milieu extracellulaire est proportionnel au nombre de cellules mortes (Lobner, 2000).

La lyse des cellules par le Triton X-100 est considérée comme 100% de mortalité et comparée à l'effet de AaTs-1 (100 μ M), AaTs-1-2B (50 μ M), AaTs-1-4B (50 μ M), AaTs-1-8B (30 μ M). Les concentrations des molécules ont été choisies pour se rapprocher de leurs IC₅₀ respectives sur la viabilité des cellules U87 déterminée par le test MTT. Nos résultats ont montré qu'après traitement pendant 24h, aucune libération de LDH n'a été enregistrée pour les peptides AaTs-1, AaTs-1-2B et AaTs-1-4B. Par contre, AaTs-1-8B a induit une légère libération (9,1%) (Figure 42) de LDH par les cellules. Malgré ce faible effet, AaTs-1-8B peut être considéré, également, comme non toxique sur les cellules U87 (Khurana et al., 2014).

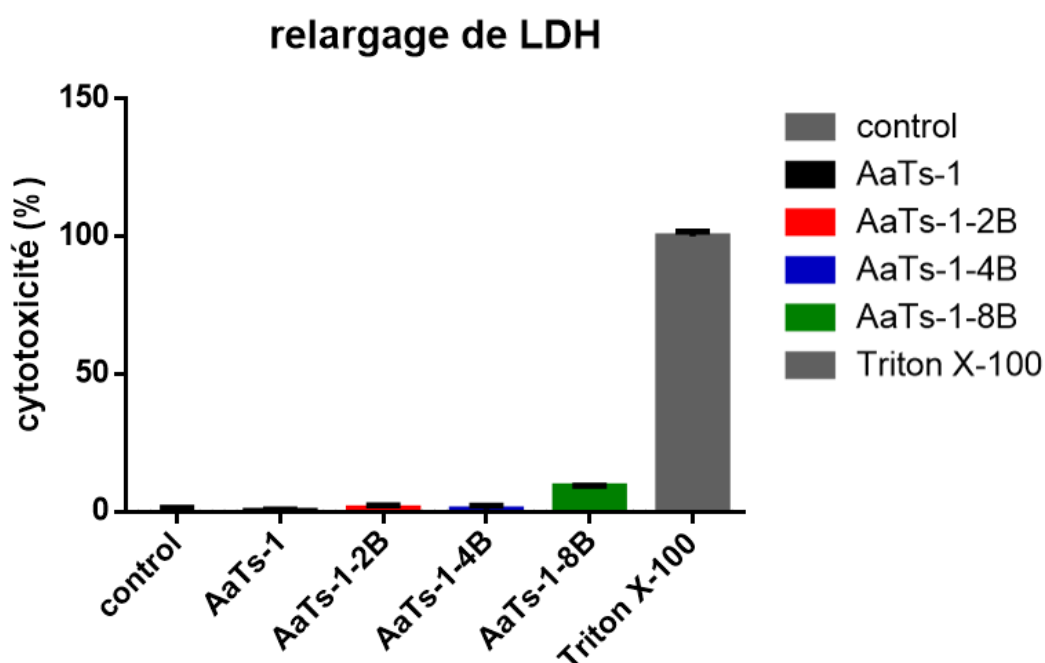


Figure 41 : Libération de LDH par les cellules U87 traitées par AaTs-1 et ses analogues multi-branchés

Les résultats du test de viabilité et du test de toxicité montrent que AaTs-1 et les analogues dendrimères multi-branchés agissent sur la prolifération des cellules U87 sans être

cytotoxiques. Cette caractéristique est très intéressante puisque que l'un des inconvénients des molécules chimio-thérapeutiques utilisées actuellement est la cytotoxicité, qui est responsable des effets secondaires (Livshits et al., 2014). L'efficacité des dendrimères multi-branchés sans effet cytotoxique sur les cellules U87 montre que ces molécules répondent à une partie de nos attentes, mais il reste à explorer d'autres activités de ces molécules sur les cellules U87 et confirmer si leur mode d'action est similaire à celui de la molécule de départ, en l'occurrence l'AaTs-1.

II.3.3.4 Effet des dendrimères sur la migration des cellules U87

Plusieurs mécanismes d'action régissent l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011b). Les molécules de surface telles que les intégrines et les canaux ioniques sont les principaux acteurs de ces mécanismes. Nombreuses sont les molécules issues des venins animaux qui agissent sur les mécanismes de migration des cellules tumorales. En effet, des molécules comme la AaCTx et KAah1 inhibent la migration de différentes cellules cancéreuses en bloquant les canaux ioniques et en diminuant le taux de certains ions dans le cytoplasme cellulaire (Aissaoui et al., 2018; Rjeibi et al., 2011). D'autres familles de molécules issues de venins de vipères appelées désintégrines comme CC5, CC8 et la qui dérèglent la migration cellulaire en bloquant la liaison des intégrines aux protéines de la matrice cellulaire (Ben-Mabrouk et al., 2016). AaTs-1 est peptide capable de perturber l'équilibre calcique intracellulaire chez les cellules U87 en passant par le récepteur FPRL-1. Ce déséquilibre calcique peut engendrer d'autres effets dont l'inhibition de la migration des cellules cancéreuses (Bong and Monteith, 2018). De ce fait, nous avons testé AaTs-1 et les dendrimères multi-branchés sur la migration des cellules U87 en effectuant un essai de migration bidimensionnelle suivie par microscopie en temps réel (Krayem et al., 2018; Morjen et al., 2013). Les paramètres de la migration et les trajectoires (où l'origine de chaque piste cellulaire a été fixée aux coordonnées $x=0$, $y=0$) de 7 cellules sont représentés dans la Figure 44. Les graphiques de la figure 44A montrent que les AaTs-1 et AaTs-1-2B n'affectent pas significativement la migration sur la fibronectine, alors que AaTs-1-4B et AaTs-1-8B réduisent significativement la motilité des cellules U87, avec un meilleur effet observé pour AaTs-1-4B. Cet effet est clairement visualisé dans la figure 43B. En effet, la trajectoire des cellules traitées par AaTs-1-4B et AaTs-1-8B est modifiée et la distance à l'origine est affectée. L'analyse de la trajectoire effectuée sur chaque cellule indique que les vitesses des

cellules traitées par AaTs-1-4B et AaTs-1-8B sont réduites respectivement de 46% et 25% par rapport aux cellules non traitées (figure 43A).

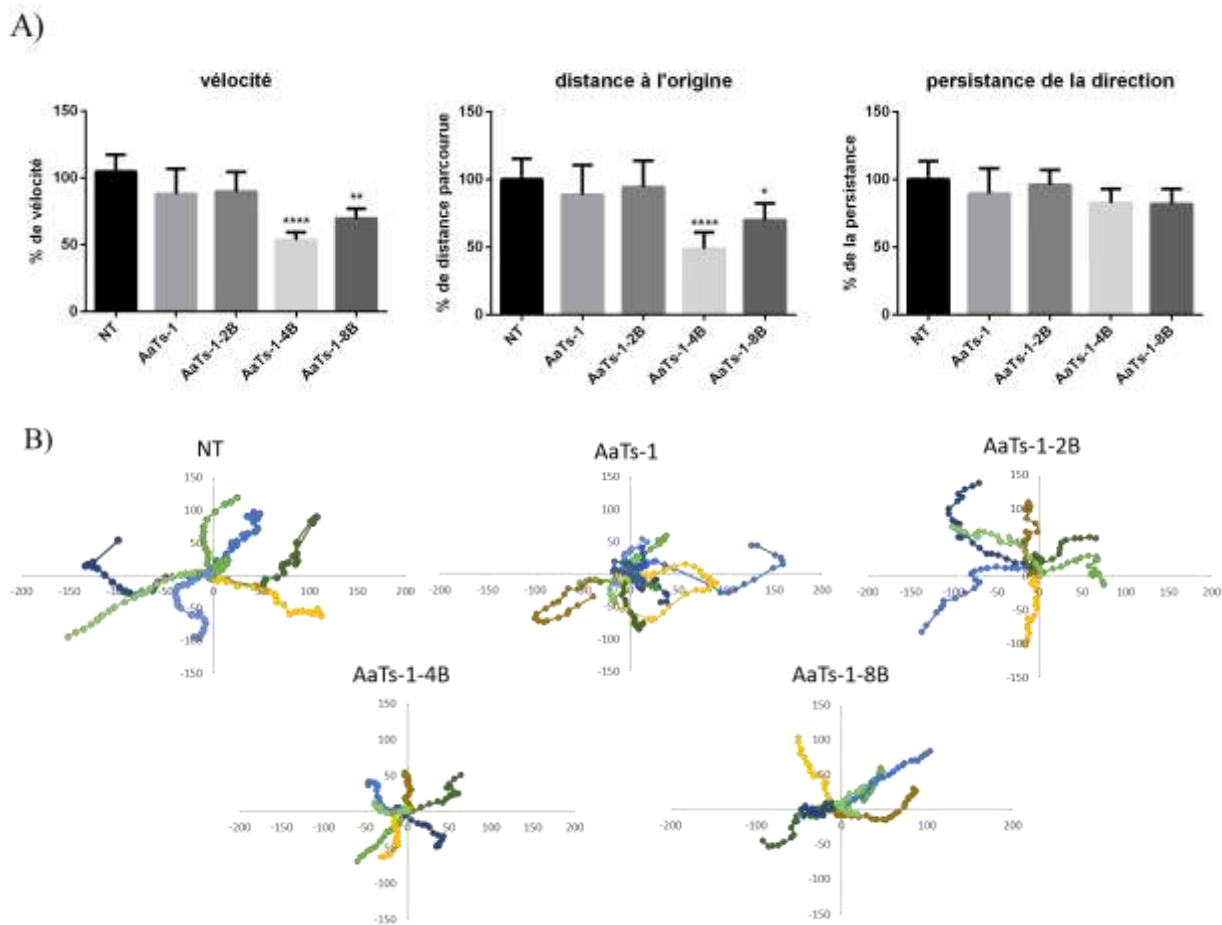


Figure 42 : Effet de l'AaTs-1 et des dendrimères multi-branchés sur la migration des cellules U87

Les cellules U87 ont étéensemencées à 10^4 cellules/puits sur une plaque de 24 puits pré-traités par de la fibronectine et traitées avec des concentrations non toxiques des molécules synthétiques. Des photos de cinq champs par puits ont été prises à intervalles de 5 minutes pendant 4 heures. (A) La vélocité des cellules, la persistance directionnelle et la distance à l'origine ont été calculées à partir des prises de vue. (B) Trajectoires de 7 cellules représentatives pour chacune des conditions.

II.3.3.5 Effet des molécules multi-branchées sur l'équilibre calcique intracellulaire

Il a été démontré précédemment que AaTs-1 diminue la concentration du calcium intracellulaire en régulant à la hausse l'expression du récepteur FPRL-1. Nous avons donc vérifié l'effet des dendrimères multi-branchés sur le taux de calcium cytosolique en mesurant

le flux calcique intracellulaire et le relargage des ions calcium du réticulum endoplasmique (RE) en utilisant la sonde fluorescente, Fura-2-AM.

Nos résultats ont révélé que AaTs-1-2B n'a aucun effet, alors que AaTs-1-4B augmente la libération de calcium du RE sans affecter significativement l'entrée du calcium au compartiment intracellulaire (SOCE). Par ailleurs, AaTs-1-8B inhibe significativement la libération de calcium du RE et de l'entrée de SOCE, même à une faible concentration de 15 μM (figure 44). Il est à noter que AaTs-1-8B est le seul dendrimère qui diminue à la fois le SOCE et le relargage calcique par le RE, à un taux environ 50 fois plus important que AaTs-1 (Aissaoui et al. 2021).

Ainsi, La modification structurale de AaTs-1 par des ramifications multi-branchées a permis d'améliorer l'effet du motif IWKS sur l'équilibre calcique intracellulaire par inhibition des deux phénomènes, SOCE et relargage par le RE.

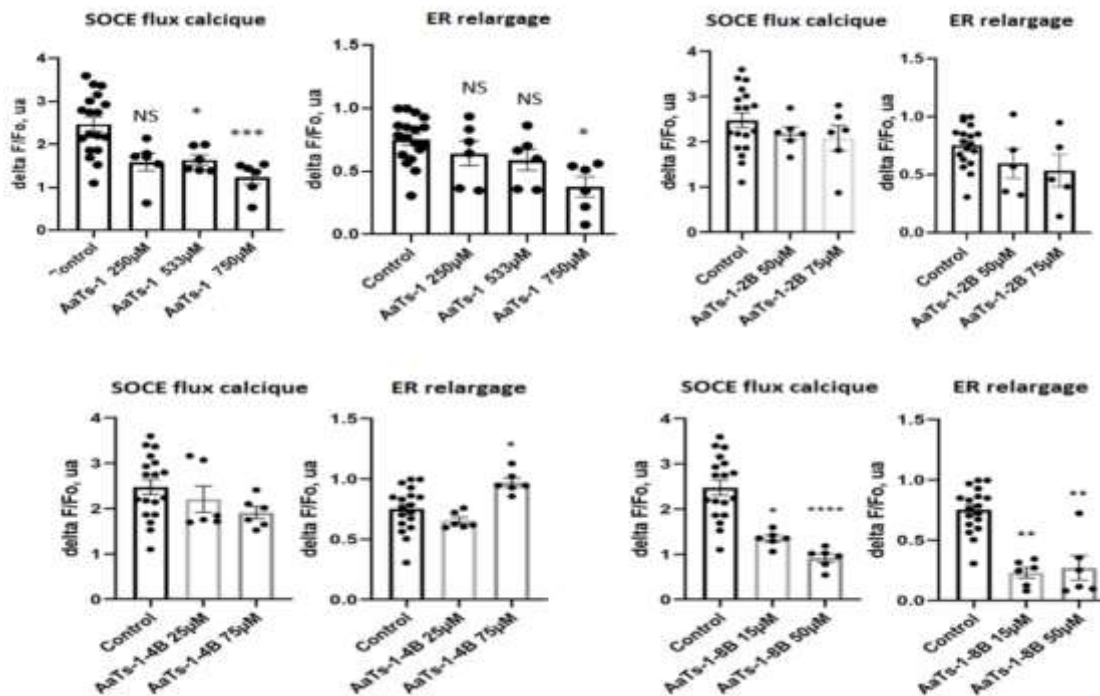


Figure 43 : Effet de l'application aiguë des molécules AaTs-1 et les dendrimères multi-branchés sur le relargage calcique du ER et l'amplitude de SOCE dans les cellules U87
 Les cellules ont été chargées de fura-2 et l'amplitude de la variation du ratio de fluorescence par rapport à la condition de contrôle a été calculée. Les différents histogrammes représentent Les valeurs individuelles et la valeur moyenne de chaque condition de traitement +/- SEM de n observations (N=3)

II.3.3.7. Effet des molécules multi-branchées sur la signalisation intracellulaire des cellules U87

Les voies impliquées dans l'effet de l'AaTs-1 et des dendrimères multi-branchés sur les cellules U87 ont été étudiées par western blot. Nous avons ainsi évalué l'expression de P53 et du FPRL-1, ainsi que la phosphorylation d'ERK1/2 et d'AKT, connus comme des effecteurs clés des principales voies du développement oncogénique (Cao et al., 2019; Lacroix et al., 2020). Les résultats ont montré que AaTs-1 et les dendrimères exercent une augmentation remarquable de l'expression de la protéine P53 après 24h de traitement. Ce résultat est corrélé avec l'effet observé sur la prolifération des cellules U87. En effet, AaTs-1-8B, le dendrimère le plus actif sur la prolifération des cellules U87, induit la plus forte expression de la protéine P53. En plus, ce résultat concernant la surexpression de P53 est en accord avec ceux obtenus par Aissaoui et al. en réponse à AaTs-1 (Aissaoui et al. 2021).

De manière inattendue, toutes les molécules stimulent la phosphorylation d'AKT et d'ERK1/2 après 30 minutes de traitement (Figure 45). La phosphorylation des protéines AKT et ERK1/2 est généralement associée au développement des cellules tumorales, puisque leur activation est liée à des mutations affectant les oncoprotéines en amont (Asati et al., 2016; Cao et al., 2019). Néanmoins, des études récentes ont montré que l'hyperphosphorylation de AKT et ERK1/2 peuvent générer de nombreuses réponses en fonction des voies impliquées. En effet, Nogueira et al. ont démontré que l'activation d'AKT est associée à une régulation négative de la protéine FOXO, induisant une sénescence prématurée et une apoptose médiée par les ROS (Nogueira et al., 2008). D'autre part, il a été démontré que l'activation excessive de ERK1/2 induit un effet anti-prolifératif en arrêtant le cycle cellulaire en phase G0-G1 (Krishna-Subramanian et al., 2012) et provoque la mort cellulaire par apoptose, autophagie ou sénescence, selon les mécanismes mis en œuvre (Cagnol and Chambard, 2010). De plus, dans une étude récente, Zhang et al. a montré une corrélation entre l'hyperphosphorylation de ERK1/2 et l'inhibition de la prolifération et de la migration (Zhang et al., 2020).

De manière intéressante, nous avons remarqué que les dendrimères induisent une augmentation plus conséquente de la phosphorylation de ERK1/2 que AaTs-1, indiquant que les modifications apportées sur la structure de la molécule AaTs-1, en augmentant le nombre de motifs IWKS, agissent directement sur son mode d'action.

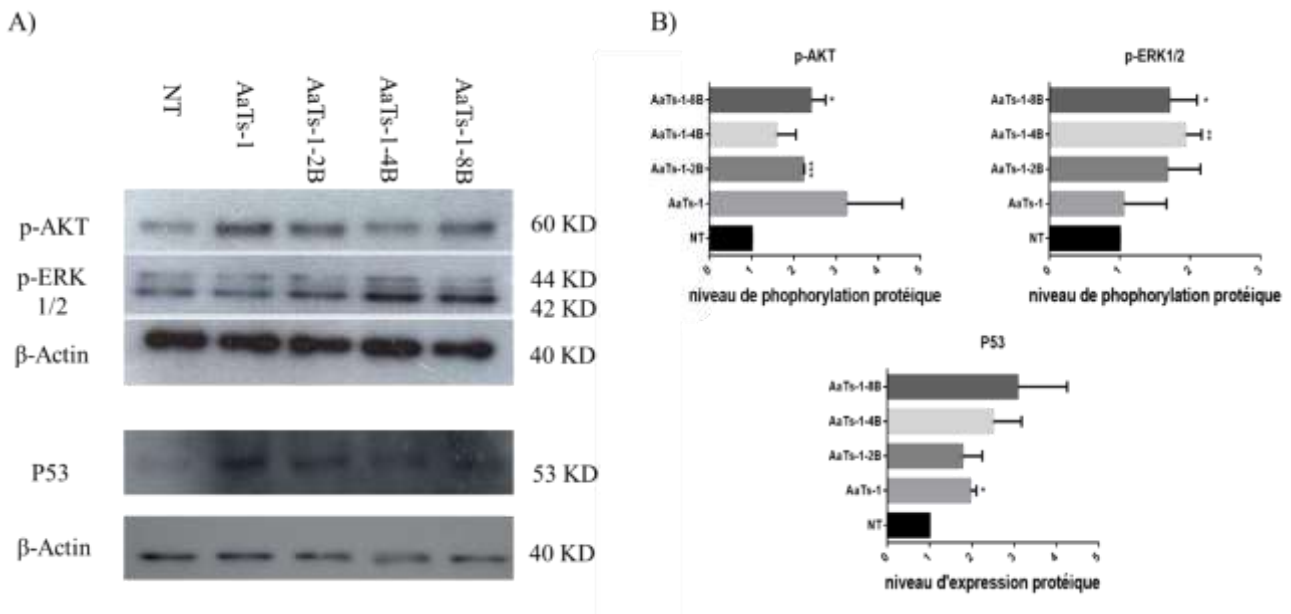


Figure 44 : Analyse protéique par Western blot

(A) Les cellules ont été traitées ou non (NT) par AaTs-1 (100 μ M), AaTs-1-2B (50 μ M), AaTs-1-4B (50 μ M) ou AaTs-1-8B (10 μ M) pendant 30 min pour évaluer la phosphorylation des MAPK, AKT et ERK1/2, et pendant 24h pour évaluer l'expression de P53. Les cellules ont ensuite été lysées par le tampon Laemmli et analysées par western blot. (B) Niveaux relatifs de phosphorylation/expression des protéines, normalisés par rapport au control.

Il est à noter que les résultats observés avec le peptide AaTs-1 sont en opposition avec ceux trouvés par Aissaoui et al (2021). Cette variation est vraisemblablement due à la différence de temps de traitement des cellules. En effet, nous avons traité les cellules U87 pendant 30 min alors que dans les travaux de Aissaoui et ses collaborateurs ont traité les cellules pendant 72 h (Aissaoui et al. 2021).

II.3.3.6. Dosage des espèces réactives de l'oxygène ou ROS

Afin d'explorer au mieux l'effet observé des peptides multi-branchés sur les cellules U87 nous avons procédé à un dosage des espèces réactives de l'oxygène ou ROS. Les ROS sont les marqueurs du stress oxydatif qui est activé dans certains cas et déclenche une apoptose associée à une hyperphosphorylation des MAPK et de AKT (Zakraoui et al., 2016). Pour ce faire, les cellules ont été incubées pendant 24h avec 100 μ M de AaTs-1, 50 μ M de AaTs-1-2B ou AaTs-1-4B et 30 μ M de AaTs-1-8B, puis lavées avec du PBS 1X et incubées pendant 45 min avec 10 μ M de la sonde CMH2DCF-DA.

Comme on peut voir sur la figure 47, le traitement des cellules U87 par AaTs-1 et ses analogues multi-branchés n'induit pas l'expression des ROS. Ce résultat montre que l'activité inhibitrice de la viabilité et la migration des cellules U87 observée pour les dendrimères multi-branchés, associées à l'hyperphosphorylation des protéines AKT et ERK ½, ne déclenchent pas un stress oxydatif. L'une des autres voies de mortalité cellulaire telle que l'autophagie ou la senescence cellulaire est probablement responsable de l'effet observé.

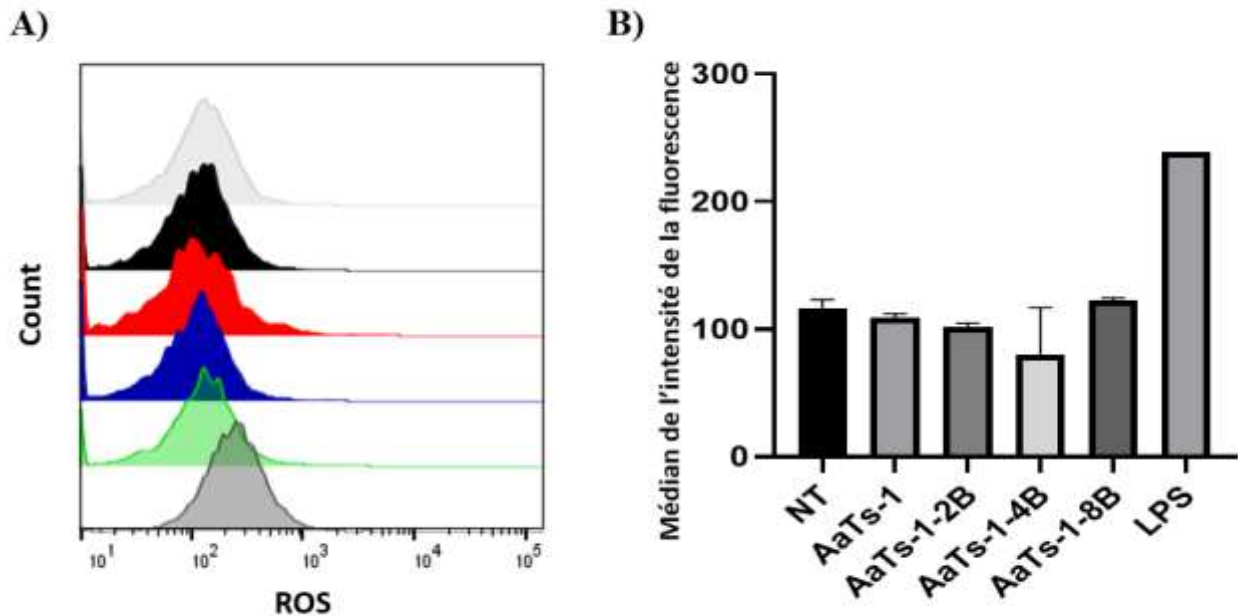


Figure 456 : Dosage des espèces réactives de l'oxygène après traitement des cellules U87 avec AaTs-1 et les dendrimères multi-branchés

A) Expression des ROS dans les cellules U87 traitées. (B) Histogrammes représentant l'intensité de la fluorescence proportionnelle au taux des ROS dans les cellules U87.

Conclusion et perspectives

Malgré les efforts et les recherches continus pour y faire face, le glioblastome multiforme (GBM) reste une maladie récidivante avec un taux de mortalité élevé, témoignant de l'échec des stratégies thérapeutiques actuelles. L'une des causes principales de l'échec des thérapies conventionnelles contre le glioblastome est l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) à la majorité des molécules thérapeutiques. Cette barrière physiologique protège le cerveau contre les agents pathogènes, les toxines et tout élément exogène. Cette fonction de protection du cerveau est très sélective, ce qui explique les difficultés rencontrées dans la thérapie d'un grand nombre de maladies neurologiques.

Pour résoudre ce problème, les molécules destinées à traiter les tumeurs cérébrales, doivent avoir des caractéristiques physico-chimiques particulières leur permettant de franchir cette barrière.

Ainsi, partant de cette logique, nous nous sommes proposés, dans le cadre de ce travail, de rechercher et/ou concevoir des molécules de faible masse moléculaire, capables d'inhiber le développement des cellules de GBM. Ainsi, nous avons isolé deux peptides que nous avons désigné H8 et H9 du venin de scorpion *Androctonus australis hector*. Le peptide H8 de 466 Da a montré un effet important sur la migration des cellules U87. En revanche, il s'avère qu'il est présent en faible quantité dans le venin, ce qui a entravé la détermination de sa structure. En effet, à cause de la petite quantité de la molécule, nous n'avons pas réussi à connaître exactement la séquence du peptide par la méthode d'Edman, en revanche la spectrométrie de masse Q-TOF en tandem MS-MS, a permis la déduction de cinq séquences possibles : GFSGV, GFFP amidé, GFRS, GFSR et GRFS. La synthèse de ces cinq molécules a été effectuée et les co-élutions avec le peptide natif, ainsi que l'étude de leur activité ont montré qu'aucune de ces molécules ne semble correspondre à la molécule H8.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à H9 de 566 Da qui est beaucoup mieux représenté que H8. La détermination de sa structure a montré qu'il s'agissait d'un térapeptide qui a été désigné AaTs-1. Ce peptide agit sur la prolifération des cellules U87 en modulant le FPRL-1, un récepteur sensible au calcium. AaTs-1 engendre une diminution du taux calcique intracellulaire (Aissaoui et al., 2021). Cependant, le point faible de ce térapeptide est son IC_{50} de 566 μ M sur la prolifération des cellules U87, considérée

relativement élevée. Nous avons donc essayé d'améliorer son activité en modifiant sa structure.

Nous avons commencé par agir sur les extrémités C- et N-terminales. Les quatre peptides synthétisés sont, (i) AaTs-1 amidé (fonction amine en C-terminal), (ii) AaTs-1 acétylé (fonction acétyle en N-terminal), (iii) AaTs-1 amidé et acétylé et (iv) AaTs-1 cyclique.

Malheureusement, ces peptides n'ont montré aucune activité sur la prolifération des cellules U87. Cependant, tous les peptides ont montré une inhibition de l'adhésion et de la migration des cellules gliomateuses. En effet, à forte dose, les peptides sAaTs-1 (AaTs-1 synthétique) et AaTs-1 amidé, sont plus actifs sur l'adhésion des cellules à la fibronectine que les peptides acétylés alors que ces derniers ont une activité anti-migratoire légèrement plus importante que les peptides non acétylés. Cependant, ces nouvelles molécules synthétisées ne présentent pas l'amélioration souhaitée de l'activité antiproliférative, ce qui nous a incités à réaliser de nouvelles synthèses en utilisant la stratégie des dendrimères multi-branchés. Cette méthode de synthèse basée sur la stratégie de synthèse des *multiple antigen peptide* (MAP) est utilisée depuis plusieurs années afin d'améliorer l'efficacité des molécules naturelles ou synthétiques. Ainsi, pour cette synthèse, nous avons utilisé un système de lysines ramifiées liés à plusieurs séquences de AaTs-1 dans leur extrémité N-terminale pour générer des molécules di-branchées (AaTs-1-2B), tetrabrançées (AaTs-1-4B) et octabrançées (AaTs-1-8B).

Testés sur la prolifération des cellules U87, tous les dendrimères ont montré une nette amélioration de l'activité. En effet, les dendrimères sont au moins 10 fois plus actifs sur la viabilité et la prolifération des cellules U87 que la molécule AaTs-1 native ou synthétique, en particulier, AaTs-1-8B et AaTs-1-4B. Il est à noter qu'aucune des molécules n'a montré d'effet toxique, ni sur les cellules U87, ni *in vivo* sur les souris mâles, ce qui est très intéressant.

Les dendrimères multi-branchés ont aussi été testés sur la migration des cellules U87 par vidéomicroscopie, qui permet le suivi de la migration cellulaire en temps réel. AaTs-4B à 50 μ M et AaTs-1-8B à 10 μ M ont montré une inhibition significative de la vitesse de migration des cellules U87 de l'ordre de 46,4% et 25,1% respectivement.

L'étude de l'impact des molécules multi-branchées sur les voies majeures des MAPKs a montré que ces molécules augmentent de manière inattendue la phosphorylation des protéines AKT et ERK1/2, mais n'ont pas d'effet sur le niveau des ROS. Les dendrimères multi-branchés augmentent également l'expression de la protéine P53, qui est un suppresseur de tumeurs.

Le dosage des taux calciques intracellulaires a montré que seule la molécule AaTs-1-8B a une activité similaire à celle de AaTs-1, mais avec un effet plus important sur la diminution du taux du calcium intracellulaire. En effet, AaTs-1-8B est 50 fois plus active que AaTs-1. Il est à noter que AaTs-1-4B montre une augmentation du taux calcique intracellulaire *via* le relargage par le réticulum endoplasmique.

Tous ces résultats montrent que nous avons réussi à synthétiser de nouvelles molécules qui pourraient être de potentiels candidats thérapeutiques contre le glioblastome. Les dendrimères ont, non seulement une activité plus importante que les molécules simples, mais ils présentent aussi de nouvelles activités.

Par ailleurs, des travaux sont en cours pour purifier la molécule H8 native en quantité suffisante pour déterminer sa séquence exacte. Ceci permettra de la synthétiser afin d'explorer les voies de signalisations impliquées dans son effet anti-migratoire et, pourquoi pas, de concevoir des peptides multi-branchés présentant à la fois les séquences de AaTs-1 et de H8 pour avoir un effet combiné (prolifération et migration) sur la cancérogène des glioblastome, avec une meilleure affinité.

Nous pourrions aussi approfondir les études des voies de signalisation affectées par AaTs-1 et les dendrimère. Les molécules AaTs-1-2B et AaTs-1-4B ont montré qu'ils agissent sur les cellules U87 mais avec des voies de signalisation différentes que AaTs-1, qu'il serait intéressant d'élucider.

Il serait aussi intéressant d'explorer l'interaction entre les dendrimères et le récepteur FPRL-1 en réalisant des études *in silico* ("docking") ou de "Gene-silencing". Enfin il serait intéressant de tester ces molécules sur des modèles précliniques de glioblastome en utilisant des souris, afin de confirmer leurs activités dans un microenvironnement total *in vitro*.

Références bibliographiques

- Abbasi, E., Aval, S.F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H.T., Joo, S.W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., Pashaei-Asl, R., 2014. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 247. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>
- Abernethy, D.R., 1997. Pharmacologic and pharmacokinetic profile of mibefradil, a T- and L-type calcium channel antagonist. *Am. J. Cardiol.* 80, 4C-11C. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(97\)00564-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(97)00564-x)
- Adinolfi, E., Capece, M., Amoroso, F., De Marchi, E., Franceschini, A., 2015. Emerging roles of P2X receptors in cancer. *Curr. Med. Chem.* 22, 878–890. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141012172913>
- Aissaoui, D., Mlayah-Bellalouna, S., Jebali, J., Abdelkafi-Koubaa, Z., Souid, S., Moslah, W., Othman, H., Luis, J., ElAyeB, M., Marrakchi, N., Essafi-Benkhadir, K., Srairi-Abid, N., 2018. Functional role of Kv1.1 and Kv1.3 channels in the neoplastic progression steps of three cancer cell lines, elucidated by scorpion peptides. *Int. J. Biol. Macromol.* 111, 1146–1155. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.144>
- Aissaoui-Zid, D., Saada, M.-C., Moslah, W., Potier-Cartereau, M., Lemette, A., Othman, H., Gaysinski, M., Abdelkafi-Koubaa, Z., Souid, S., Marrakchi, N., Vandier, C., Essafi-Benkhadir, K., Srairi-Abid, N., 2021. AaTs-1: A Tetrapeptide from *Androctonus australis* Scorpion Venom, Inhibiting U87 Glioblastoma Cells Proliferation by p53 and FPRL-1 Up-Regulations. *Molecules* 26, 7610. <https://doi.org/10.3390/molecules26247610>
- Amantini, C., Mosca, M., Nabissi, M., Lucciarini, R., Caprodossi, S., Arcella, A., Giangaspero, F., Santoni, G., 2007. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *J. Neurochem.* 102, 977–990. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04582.x>
- Asati, V., Mahapatra, D.K., Bharti, S.K., 2016. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* 109, 314–341. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.012>
- Azimi, I., 2018. The interplay between HIF-1 and calcium signalling in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 97, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.02.001>
- Azimi, I., Bong, A.H., Poo, G.X.H., Armitage, K., Lok, D., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R., 2018. Pharmacological inhibition of store-operated calcium entry in MDA-MB-468 basal A breast cancer cells: consequences on calcium signalling, cell migration and proliferation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 4525–4537. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2904-y>
- Bae, Y.-S., Song, J.Y., Kim, Y., He, R., Ye, R.D., Kwak, J.-Y., Suh, P.-G., Ryu, S.H., 2003. Differential activation of formyl peptide receptor signaling by peptide ligands. *Mol. Pharmacol.* 64, 841–847. <https://doi.org/10.1124/mol.64.4.841>
- Balasubramaniam, A., Shannon, P., Hodaie, M., Laperriere, N., Michaels, H., Guha, A., 2007. Glioblastoma multiforme after stereotactic radiotherapy for acoustic neuroma: Case report and review of the literature. *Neuro-Oncol.* 9, 447–453. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-027>

Baylin, S.B., Jones, P.A., 2016. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a019505. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>

BenAissa, R., Othman, H., Villard, C., Peigneur, S., Mlayah-Bellalouna, S., Abdelkafi-Koubaa, Z., Marrakchi, N., Essafi-Benkhadir, K., Tytgat, J., Luis, J., Srairi-Abid, N., 2020. AaHIV a sodium channel scorpion toxin inhibits the proliferation of DU145 prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 521, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.115>

Ben-Mabrouk, H., Zouari-Kessentini, R., Montassar, F., Koubaa, Z.A., Messaadi, E., Guillonneau, X., ElAyeb, M., Srairi-Abid, N., Luis, J., Micheau, O., Marrakchi, N., 2016. CC5 and CC8, two homologous disintegrins from *Cerastes cerastes* venom, inhibit in vitro and ex vivo angiogenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 86, 670–680. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.008>

Bhadra, D., Yadav, A.K., Bhadra, S., Jain, N.K., 2005. Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting. *Int. J. Pharm.* 295, 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.01.026>

Bhatt, A.P., Redinbo, M.R., Bultman, S.J., 2017. The Role of the Microbiome in Cancer Development and Therapy. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 326–344. <https://doi.org/10.3322/caac.21398>

Binabaj, M.M., Bahrami, A., ShahidSales, S., Joodi, M., Joudi Mashhad, M., Hassanian, S.M., Anvari, K., Avan, A., 2018. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J. Cell. Physiol.* 233, 378–386. <https://doi.org/10.1002/jcp.25896>

Bomben, V.C., Sontheimer, H.W., 2008. Inhibition of transient receptor potential canonical channels impairs cytokinesis in human malignant gliomas. *Cell Prolif.* 41, 98–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2007.00504.x>

Bomben, V.C., Turner, K.L., Barclay, T.-T.C., Sontheimer, H., 2011. Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas. *J. Cell. Physiol.* 226, 1879–1888. <https://doi.org/10.1002/jcp.22518>

Bong, A.H.L., Monteith, G.R., 2018. Calcium signaling and the therapeutic targeting of cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1865, 1786–1794. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.05.015>

Bremnes, R.M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., Camps, C., Marinez, I., Busund, L.-T., 2011. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 6, 209–217.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S.A., Ciriello, G., Yung, W.K., Zhang, W., Sougnez, C., Mikkelsen, T., Aldape, K., Bigner, D.D., Van Meir, E.G., Prados, M., Sloan, A., Black, K.L., Eschbacher, J., Finocchiaro, G., Friedman, W., Andrews, D.W., Guha, A., Iacocca, M., O'Neill, B.P., Foltz, G., Myers, J.,

Weisenberger, D.J., Penny, R., Kucherlapati, R., Perou, C.M., Hayes, D.N., Gibbs, R., Marra, M., Mills, G.B., Lander, E., Spellman, P., Wilson, R., Sander, C., Weinstein, J., Meyerson, M., Gabriel, S., Laird, P.W., Haussler, D., Getz, G., Chin, L., Benz, C., Barnholtz-Sloan, J., Barrett, W., Ostrom, Q., Wolinsky, Y., Black, K.L., Bose, B., Boulos, P.T., Boulos, M., Brown, J., Czerinski, C., Eppley, M., Iacocca, M., Kempista, T., Kitko, T., Koyfman, Y., Rabeno, B., Rastogi, P., Sugarman, M., Swanson, P., Yalamanchii, K., Otey, I.P., Liu, Y.S., Xiao, Y., Auman, J.T., Chen, P.-C., Hadjipanayis, A., Lee, E., Lee, S., Park, P.J., Seidman, J., Yang, Lixing, Kucherlapati, R., Kalkanis, S., Mikkelsen, T., Poisson, L.M., Raghunathan, A., Scarpace, L., Bernard, B., Bressler, R., Eakin, A., Iype, L., Kreisberg, R.B., Leinonen, K., Reynolds, S., Rovira, H., Thorsson, V., Shmulevich, I., Annala, M.J., Penny, R., Paulauskis, J., Curley, E., Hatfield, M., Mallery, D., Morris, S., Shelton, T., Sherman, M., Yena, P., Cuppini, L., DiMeco, F., Eoli, M., Finocchiaro, G., Maderna, E., Pollo, B., Saini, M., Balu, S., Hoadley, K.A., Li, L., Miller, C.R., Shi, Y., Topal, M.D., Wu, J., Dunn, G., Giannini, C., O'Neill, B.P., Aksoy, B.A., Antipin, Y., Borsu, L., Berman, S.H., Brennan, C.W., Cerami, E., Chakravarty, D., Ciriello, G., Gao, J., Gross, B., Jacobsen, A., Ladanyi, M., Lash, A., Liang, Y., Reva, B., Sander, C., Schultz, N., Shen, R., Socci, N.D., Viale, A., Ferguson, M.L., Chen, Q.-R., Demchok, J.A., Dillon, L.A.L., Shaw, K.R.M., Sheth, M., Tarnuzzer, R., Wang, Z., Yang, Liming, Davidsen, T., Guyer, M.S., Ozenberger, B.A., Sofia, H.J., Bergsten, J., Eckman, J., Harr, J., Myers, J., Smith, C., Tucker, K., Winemiller, C., Zach, L.A., Ljubimova, J.Y., Eley, G., Ayala, B., Jensen, M.A., Kahn, A., Pihl, T.D., Pot, D.A., Wan, Y., Eschbacher, J., Foltz, G., Hansen, N., Hothi, P., Lin, B., Shah, N., Yoon, J., Lau, C., Berens, M., Ardlie, K., Beroukhim, R., Carter, S.L., Cherniack, A.D., Noble, M., Cho, J., Cibulskis, K., DiCara, D., Frazer, S., Gabriel, S.B., Gehlenborg, N., Gentry, J., Heiman, D., Kim, J., Jing, R., Lander, E.S., Lawrence, M., Lin, P., Mallard, W., Meyerson, M., Onofrio, R.C., Saksena, G., Schumacher, S., Sougnez, C., Stojanov, P., Tabak, B., Voet, D., Zhang, H., Zou, L., Getz, G., Dees, N.N., Ding, L., Fulton, L.L., Fulton, R.S., Kanchi, K.-L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Baylin, S.B., Andrews, D.W., Harshyne, L., Cohen, M.L., Devine, K., Sloan, A.E., VandenBerg, S.R., Berger, M.S., Prados, M., Carlin, D., Craft, B., Ellrott, K., Goldman, M., Goldstein, T., Grifford, M., Haussler, D., Ma, S., Ng, S., Salama, S.R., Sanborn, J.Z., Stuart, J., Swatloski, T., Waltman, P., Zhu, J., Foss, R., Frentzen, B., Friedman, W., McTiernan, R., Yachnis, A., Hayes, D.N., Perou, C.M., Zheng, S., Vegesna, R., Mao, Y., Akbani, R., Aldape, K., Bogler, O., Fuller, G.N., Liu, W., Liu, Y., Lu, Y., Mills, G., Protopopov, A., Ren, X., Sun, Y., Wu, C.-J., Yung, W.K.A., Zhang, W., Zhang, J., Chen, K., Weinstein, J.N., Chin, L., Verhaak, R.G.W., Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Bootwalla, M.S., Lai, P.H., Triche, T.J., Van Den Berg, D.J., Laird, P.W., Gutmann, D.H., Lehman, N.L., VanMeir, E.G., Brat, D., Olson, J.J., Mastrogiannakis, G.M., Devi, N.S., Zhang, Z., Bigner, D., Lipp, E., McLendon, R., 2013. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155, 462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>

BUHLEIER, E., W, W., F, V., 1978. “CASCADE”- AND “NONSKID-CHAIN-LIKE” SYNTHESSES OF MOLECULAR CAVITY TOPOLOGIES. CASCADE- NONSKID-CHAIN- Synth. Mol. CAVITY Topol.

Bylund, J., Christophe, T., Boulay, F., Nyström, T., Karlsson, A., Dahlgren, C., 2001. Proinflammatory activity of a cecropin-like antibacterial peptide from *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1700–1704. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1700-1704.2001>

- Cagnol, S., Chambard, J.-C., 2010. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* 277, 2–21. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x>
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., Alimonti, A., 2019. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol. Rev.* 99, 1047–1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>
- Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H., Jaffe, E.S., 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117, 5019–5032. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>
- Cao, Z., Liao, Q., Su, M., Huang, K., Jin, J., Cao, D., 2019. AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? *Cancer Lett.* 459, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.05.025>
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>
- Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Kondoh, H., Lleonart, M.E., Martinez-Leal, J.F., Mondello, C., Scovassi, A.I., Bisson, W.H., Amedei, A., Roy, R., Woodrick, J., Colacci, A., Vaccari, M., Raju, J., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Salem, H.K., Memeo, L., Forte, S., Singh, N., Hamid, R.A., Ryan, E.P., Brown, D.G., Wise, J.P., Wise, S.S., Yasaei, H., 2015. Disruptive chemicals, senescence and immortality. *Carcinogenesis* 36 Suppl 1, S19-37. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv029>
- Chen, J., Luan, Y., Yu, R., Zhang, Z., Zhang, J., Wang, W., 2014. Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Biosci. Trends* 8, 1–10. <https://doi.org/10.5582/bst.8.1>
- Cheng, Y., Xu, Z., Ma, M., Xu, T., 2008. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration. *J. Pharm. Sci.* 97, 123–143. <https://doi.org/10.1002/jps.21079>
- Chigurupati, S., Venkataraman, R., Barrera, D., Naganathan, A., Madan, M., Paul, L., Pattisapu, J.V., Kyriazis, G.A., Sugaya, K., Bushnev, S., Lathia, J.D., Rich, J.N., Chan, S.L., 2010. Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res.* 70, 418–427. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2654>
- Chis, A.A., Dobra, C., Morgovan, C., Arseniu, A.M., Rus, L.L., Butuca, A., Juncan, A.M., Totan, M., Vonica-Tincu, A.L., Cormos, G., Muntean, A.C., Muresan, M.L., Gligor, F.G., Frum, A., 2020. Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine. *Molecules* 25, 3982. <https://doi.org/10.3390/molecules25173982>
- Choi, S.K., Myc, A., Silpe, J.E., Sumit, M., Wong, P.T., McCarthy, K., Desai, A.M., Thomas, T.P., Kotlyar, A., Holl, M.M.B., Orr, B.G., Baker, J.R., 2013. Dendrimer-based multivalent vancomycin nanoplatforM for targeting the drug-resistant bacterial surface. *ACS Nano* 7, 214–228. <https://doi.org/10.1021/nn3038995>
- Chua, J., Nafziger, E., Leung, D., 2019. Evidence-Based Practice: Temozolomide Beyond Glioblastoma. *Curr. Oncol. Rep.* 21, 30. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0783-5>

- Clot-Faybesse, O., Guieu, R., Rochat, H., Devaux, C., 1999. Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels. *Life Sci.* 66, 185–192. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00579-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00579-2)
- Cohen, M.H., Shen, Y.L., Keegan, P., Pazdur, R., 2009. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist* 14, 1131–1138. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0121>
- Cohen-Inbar, O., Zaaroor, M., 2016. Glioblastoma multiforme targeted therapy: The Chlorotoxin story. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 33, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2016.04.012>
- Coussy, F., Bonin, F., Azorin, P., Tariq, Z., Driouch, K., 2019. Biologie des métastases et mécanismes moléculaires de leur formation. *Bull. Cancer (Paris)* 106, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.11.010>
- Dang, L., Su, S.-S.M., 2017. Isocitrate Dehydrogenase Mutation and (R)-2-Hydroxyglutarate: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 305–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044732>
- Daniel, P.M., Filiz, G., Tymms, M.J., Ramsay, R.G., Kaye, A.H., Stylli, S.S., Mantamadiotis, T., 2018. Intratumor MAPK and PI3K signaling pathway heterogeneity in glioblastoma tissue correlates with CREB signaling and distinct target gene signatures. *Exp. Mol. Pathol.* 105, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.05.009>
- Darbon, H., Angelides, K.J., 1984. Structural mapping of the voltage-dependent sodium channel. Distance between the tetrodotoxin and Centruroides suffusus suffusus II beta-scorpion toxin receptors. *J. Biol. Chem.* 259, 6074–6084.
- Darbon, H., Jover, E., Couraud, F., Rochat, H., 1983. Alpha-scorpion neurotoxin derivatives suitable as potential markers of sodium channels. Preparation and characterization. *Int. J. Pept. Protein Res.* 22, 179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1983.tb02084.x>
- Dardevet, L., Rani, D., Abd El Aziz, T., Bazin, I., Sabatier, J.-M., Fadl, M., Brambilla, E., De Waard, M., 2015. Chlorotoxin: A Helpful Natural Scorpion Peptide to Diagnose Glioma and Fight Tumor Invasion. *Toxins* 7, 1079–1101. <https://doi.org/10.3390/toxins7041079>
- Darwiche, N., 2020. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *Am. J. Cancer Res.* 10, 1954–1978.
- de Brabander-van den Berg, E.M.M., Meijer, E.W., 1993. Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32, 1308–1311. <https://doi.org/10.1002/anie.199313081>
- de Thé, H., 2018. Differentiation therapy revisited. *Nat. Rev. Cancer* 18, 117–127. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.103>
- DeBin, J.A., Maggio, J.E., Strichartz, G.R., 1993. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol.* 264, C361-369. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.2.C361>

- DeNardo, D.G., Andreu, P., Coussens, L.M., 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6>
- Deshane, J., Garner, C.C., Sontheimer, H., 2003. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.* 278, 4135–4144. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205662200>
- Dhar, M.S., Plummer, H.K., 2006. Protein expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRK) in breast cancer cells. *BMC Physiol.* 6, 8. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-6-8>
- Dichwalkar, T., Patel, S., Bapat, S., Pancholi, P., Jasani, N., Desai, B., Yellepeddi, V.K., Sehdev, V., 2017. Omega-3 Fatty Acid Grafted PAMAM-Paclitaxel Conjugate Exhibits Enhanced Anticancer Activity in Upper Gastrointestinal Cancer Cells. *Macromol. Biosci.* 17. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600457>
- Dratwa, M., Wysoczańska, B., Łacina, P., Kubik, T., Bogunia-Kubik, K., 2020. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front. Immunol.* 11, 589929. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.589929>
- Dueñas-Cuellar, R.A., Santana, C.J.C., Magalhães, A.C.M., Pires, O.R., Fontes, W., Castro, M.S., 2020. Scorpion Toxins and Ion Channels: Potential Applications in Cancer Therapy. *Toxins* 12, 326. <https://doi.org/10.3390/toxins12050326>
- Duwa, R., Emami, F., Lee, S., Jeong, J.-H., Yook, S., 2019. Polymeric and lipid-based drug delivery systems for treatment of glioblastoma multiforme. *J. Ind. Eng. Chem.* 79, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.06.050>
- Dvorak, H.F., 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1659. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>
- el Ayeb, M., Bahraoui, E.M., Granier, C., Beress, L., Rochat, H., 1986. Immunochemistry of sea anemone toxins: structure-antigenicity relationships and toxin-receptor interactions probed by antibodies specific for one antigenic region. *Biochemistry* 25, 6755–6761. <https://doi.org/10.1021/bi00370a005>
- el-Hayek, R., Lokuta, A.J., Arévalo, C., Valdivia, H.H., 1995. Peptide probe of ryanodine receptor function. Imperatoxin A, a peptide from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, selectively activates skeletal-type ryanodine receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 270, 28696–28704. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28696>
- England, B., Huang, T., Karsy, M., 2013. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumor Biol.* 34, 2063–2074. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0871-3>
- Faget, D.V., Ren, Q., Stewart, S.A., 2019. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 19, 439–453. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>

- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Di Luccio, E., Bichet, D., El Ayeb, M., Rochat, H., Allen, P.D., Pessah, I.N., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2000. Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca(2+) release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 469, 179–185. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01239-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01239-4)
- Falanga, A., Del Genio, V., Galdiero, S., 2021. Peptides and Dendrimers: How to Combat Viral and Bacterial Infections. *Pharmaceutics* 13, 101. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010101>
- Fan, S., Sun, Z., Jiang, D., Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Liu, H., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2010. BmKCT toxin inhibits glioma proliferation and tumor metastasis. *Cancer Lett.* 291, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.10.011>
- Fang, J., Chen, X., Zhang, L., Chen, J., Liang, Y., Li, X., Xiang, J., Wang, L., Guo, G., Zhang, B., Zhang, W., 2013. P2X7R suppression promotes glioma growth through epidermal growth factor receptor signal pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1109–1120. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.005>
- Ferreira, L.G., Oliva, G., Andricopulo, A.D., 2018. From Medicinal Chemistry to Human Health: Current Approaches to Drug Discovery for Cancer and Neglected Tropical Diseases. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 645–661. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170505>
- Fu, Y., Yin, L., Wang, W., Chai, B., Liang, A., 2005. Synthesis, expression and purification of a type of chlorotoxin-like peptide from the scorpion, *Buthus martensii* Karsch, and its acute toxicity analysis. *Biotechnol. Lett.* 27, 1597–1603. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2514-2>
- Fuller, M.D., Thompson, C.H., Zhang, Z.-R., Freeman, C.S., Schay, E., Szakács, G., Bakos, E., Sarkadi, B., McMaster, D., French, R.J., Pohl, J., Kubanek, J., McCarty, N.A., 2007. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin. *J. Biol. Chem.* 282, 37545–37555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708079200>
- Gasparri, M.L., Ruscito, I., Taghavi, K., Farooqi, A., Papadia, A., Focaccetti, C., Barnaba, V., Benedetti Panici, P., Mueller, M., 2017. The Immunobiology of Cancer: From Tumor Escape to Cancer Immunoediting Towards Immunotherapy in Gynecologic Oncology. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53082-6_9
- Gehring, M.P., Pereira, T.C.B., Zanin, R.F., Borges, M.C., Braga Filho, A., Battastini, A.M.O., Bogo, M.R., Lenz, G., Campos, M.M., Morrone, F.B., 2012. P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic Signal.* 8, 729–739. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9319-2>
- Gendron, F.-P., Neary, J.T., Theiss, P.M., Sun, G.Y., Gonzalez, F.A., Weisman, G.A., 2003. Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C571-581. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00286.2002>
- Ghosh, A., Roy, R., Nandi, M., Mukhopadhyay, A., 2019. Scorpion Venom–Toxins that Aid in Drug Development: A Review. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 25, 27–37. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9721-x>

- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Guttenplan, K.A., Liddelow, S.A., 2019. Astrocytes and microglia: Models and tools. *J. Exp. Med.* 216, 71–83. <https://doi.org/10.1084/jem.20180200>
- Hakim, M.A., Jiang, W., Luo, L., Li, B., Yang, S., Song, Y., Lai, R., 2015. Scorpion Toxin, Bmp01, Induces Pain by Targeting TRPV1 Channel. *Toxins* 7, 3671–3687. <https://doi.org/10.3390/toxins7093671>
- Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011b. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *cell* 100, 57–70.
- Hatano, K., Matsuoka, K., Terunuma, D., 2013. Carbosilane glycodendrimers. *Chem. Soc. Rev.* 42, 4574–4598. <https://doi.org/10.1039/c2cs35421g>
- Hayder, M., Fruchon, S., Fournié, J.-J., Poupot, M., Poupot, R., 2011. Anti-inflammatory properties of dendrimers per se. *ScientificWorldJournal* 11, 1367–1382. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.129>
- House, C.D., Vaske, C.J., Schwartz, A.M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R.L., Hales, T.G., Stuart, J.M., Lee, N.H., 2010. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res.* 70, 6957–6967. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1169>
- Idbaih, A., 2011. « OMICS » et biomarqueurs dans les tumeurs gliales. *Rev. Neurol. (Paris)* 167, 691–698. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2011.07.007>
- Imamura, T., Hikita, A., Inoue, Y., 2012. The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 19, 118–124. <https://doi.org/10.1007/s12282-011-0321-2>
- Isom, L.L., 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 7, 42–54. <https://doi.org/10.1177/107385840100700108>
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jang, S.H., Choi, S.Y., Ryu, P.D., Lee, S.Y., 2011. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 651, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.066>
- Jentsch, T.J., Pusch, M., 2018. CLC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease. *Physiol. Rev.* 98, 1493–1590. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2017>

Jessen, K.R., 2004. Glial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1861–1867. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.023>

Jha, Prerana, Suri, V., Jain, A., Sharma, M.C., Pathak, P., Jha, Pankaj, Srivastava, A., Suri, A., Gupta, D., Chosdol, K., Chattopadhyay, P., Sarkar, C., 2010. O6-methylguanine DNA methyltransferase gene promoter methylation status in gliomas and its correlation with other molecular alterations: first Indian report with review of challenges for use in customized treatment. *Neurosurgery* 67, 1681–1691. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e3181f743f5>

Jones, R.G., Thompson, C.B., 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23, 537–548. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509>

Kasimova, M.A., Granata, D., Carnevale, V., 2016. Voltage-Gated Sodium Channels, in: *Current Topics in Membranes*. Elsevier, pp. 261–286. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2016.05.002>

Keir, S.T., Friedman, H.S., Reardon, D.A., Bigner, D.D., Gray, L.A., 2013. Mibefradil, a novel therapy for glioblastoma multiforme: cell cycle synchronization and interlaced therapy in a murine model. *J. Neurooncol.* 111, 97–102. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0995-0>

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.

Khan, N., Niazi, Z.R., Khan, N.R., Shah, K., Rehman, K., Wahab, A., Khan, S., 2018. Simulation Studies and Dynamic Interaction of Venom Peptides with Ion Channels. *Protein Pept. Lett.* 25, 652–662. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180619095245>

Khurana, V., P. Patel, S., Agrahari, V., Pal, D., K. Mitra, A., 2014. Novel Pentablock Copolymer Based Nanoparticles Containing Pazopanib: A Potential Therapy for Ocular Neovascularization. *Recent Pat. Nanomedicine* 4, 57–68.

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>

Ko, J.-H., Gu, W., Lim, I., Bang, H., Ko, E.A., Zhou, T., 2014. Ion channel gene expression in lung adenocarcinoma: potential role in prognosis and diagnosis. *PloS One* 9, e86569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086569>

Ko, J.-H., Ko, E.A., Gu, W., Lim, I., Bang, H., Zhou, T., 2013. Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer. *Mol. Cancer* 12, 106. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-106>

Kowalczyk, W., Monsó, M., de la Torre, B.G., Andreu, D., 2011. Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs)-strategies and limitations. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 17, 247–251. <https://doi.org/10.1002/psc.1310>

Krishna-Subramanian, S., Hanski, M.L., Loddenkemper, C., Choudhary, B., Pagès, G., Zeitz, M., Hanski, C., 2012. UDCA slows down intestinal cell proliferation by inducing high and sustained ERK phosphorylation. *Int. J. Cancer* 130, 2771–2782. <https://doi.org/10.1002/ijc.26336>

Kuang, Q., Purhonen, P., Hebert, H., 2015. Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3677–3693. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>

- Lacroix, M., Riscal, R., Arena, G., Linares, L.K., Le Cam, L., 2020. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Mol. Metab.* 33, 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.10.002>
- Lapointe, S., Perry, A., Butowski, N.A., 2018. Primary brain tumours in adults. *Lancet Lond. Engl.* 392, 432–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30990-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30990-5)
- Lazniewska, J., Milowska, K., Gabryelak, T., 2012a. Dendrimers--revolutionary drugs for infectious diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 4, 469–491. <https://doi.org/10.1002/wnan.1181>
- Lazniewska, J., Milowska, K., Gabryelak, T., 2012b. Dendrimers--revolutionary drugs for infectious diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 4, 469–491. <https://doi.org/10.1002/wnan.1181>
- Lee, S., Schmitt, C.A., 2019. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat. Cell Biol.* 21, 94–101. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>
- Lenci, E., Trabocchi, A., 2020. Peptidomimetic toolbox for drug discovery. *Chem. Soc. Rev.* 49, 3262–3277. <https://doi.org/10.1039/D0CS00102C>
- Li, B., Lyu, P., Xi, X., Ge, L., Mahadevappa, R., Shaw, C., Kwok, H.F., 2018. Triggering of cancer cell cycle arrest by a novel scorpion venom-derived peptide-Gonearrestide. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 4460–4473. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13745>
- Li, L., Li, D.-P., Chen, S.-R., Chen, J., Hu, H., Pan, H.-L., 2014. Potentiation of high voltage-activated calcium channels by 4-aminopyridine depends on subunit composition. *Mol. Pharmacol.* 86, 760–772. <https://doi.org/10.1124/mol.114.095505>
- Li, S., Wang, J., Wei, Y., Liu, Y., Ding, X., Dong, B., Xu, Y., Wang, Y., 2015. Crucial role of TRPC6 in maintaining the stability of HIF-1 α in glioma cells under hypoxia. *J. Cell Sci.* 128, 3317–3329. <https://doi.org/10.1242/jcs.173161>
- Li, Y., Zhang, Z.-X., Huang, G.-H., Xiang, Y., Yang, L., Pei, Y.-C., Yang, W., Lv, S.-Q., 2021. A systematic review of multifocal and multicentric glioblastoma. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 83, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.11.025>
- Liu, H., Hughes, J.D., Rollins, S., Chen, B., Perkins, E., 2011. Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* 91, 753–760. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.09.005>
- Liu, M., Inoue, K., Leng, T., Guo, S., Xiong, Z., 2014. TRPM7 channels regulate glioma stem cell through STAT3 and Notch signaling pathways. *Cell. Signal.* 26, 2773–2781. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.020>
- Liu, X.-Y., Gerges, N., Korshunov, A., Sabha, N., Khuong-Quang, D.-A., Fontebasso, A.M., Fleming, A., Hadjadj, D., Schwartzenuber, J., Majewski, J., Dong, Z., Siegel, P., Albrecht, S., Croul, S., Jones, D.T.W., Kool, M., Tonjes, M., Reifenberger, G., Faury, D., Zadeh, G., Pfister, S., Jabado, N., 2012. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 615–625. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1031-3>

- Livshits, Z., Rao, R.B., Smith, S.W., 2014. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 32, 167–203. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2013.09.002>
- Lobner, D., 2000. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J. Neurosci. Methods* 96, 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(99\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(99)00193-4)
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Ma, J., Cui, W., He, S., Duan, Y., Heng, L., Wang, L., Gao, G., 2012. Human U87 Astrocytoma Cell Invasion Induced by Interaction of β ig-h3 with Integrin α 5 β 1 Involves Calpain-2. *PLoS ONE* 7, e37297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037297>
- Mabrouk, K., Van Rietschoten, J., Rochat, H., Loret, E.P., 1995. Correlation of antiviral activity with beta-turn types for V3 synthetic multibranching peptides from HIV-1 gp120. *Biochemistry* 34, 8294–8298. <https://doi.org/10.1021/bi00026a010>
- Mansouri, A., Hachem, L.D., Mansouri, S., Nassiri, F., Laperriere, N.J., Xia, D., Lindeman, N.I., Wen, P.Y., Chakravarti, A., Mehta, M.P., Hegi, M.E., Stupp, R., Aldape, K.D., Zadeh, G., 2019. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-Oncol.* 21, 167–178. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nyy132>
- Mantovani, F., Collavin, L., Del Sal, G., 2019. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ.* 26, 199–212. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>
- Martinelli, E., Morgillo, F., Troiani, T., Ciardiello, F., 2017. Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. *Cancer Treat. Rev.* 53, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.12.001>
- Mas-Moruno, C., Rechenmacher, F., Kessler, H., 2010. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med. Chem.* 10, 753–768. <https://doi.org/10.2174/187152010794728639>
- McFerrin, M.B., Sontheimer, H., 2006. A role for ion channels in glioma cell invasion. *Neuron Glia Biol.* 2, 39–49. <https://doi.org/10.1017/S17440925X06000044>
- Medikonda, R., Dunn, G., Rahman, M., Fecci, P., Lim, M., 2021. A review of glioblastoma immunotherapy. *J. Neurooncol.* 151, 41–53. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03448-1>
- Medina, S.H., El-Sayed, M.E.H., 2009. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. *Chem. Rev.* 109, 3141–3157. <https://doi.org/10.1021/cr900174j>
- Merrifield, R.B., 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>
- Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., Schrenpf, H., 1999. Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* 462, 447–452. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01579-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01579-3)

- Mikaelian, A.G., Traboulay, E., Zhang, X.M., Yeritsyan, E., Pedersen, P.L., Ko, Y.H., Matalka, K.Z., 2020. Pleiotropic Anticancer Properties of Scorpion Venom Peptides: *Rhopalurus princeps* Venom as an Anticancer Agent. *Drug Des. Devel. Ther.* 14, 881–893. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S231008>
- Morjen, M., Kallech-ziri, O., Bazaa, A., Othman, H., Mabrouk, K., Zouari-kessentini, R., Sanz, L., Calvete, J.J., Srairi-Abid, N., El Ayeb, M., Luis, J., Marrakchi, N., 2013. PIVL, a new serine protease inhibitor from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, impairs motility of human glioblastoma cells. *Matrix Biol.* 32, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.11.015>
- Morrone, F.B., Gehring, M.P., Nicoletti, N.F., 2016. Calcium Channels and Associated Receptors in Malignant Brain Tumor Therapy. *Mol. Pharmacol.* 90, 403–409. <https://doi.org/10.1124/mol.116.103770>
- Motiani, R.K., Hyzinski-García, M.C., Zhang, X., Henkel, M.M., Abdullaev, I.F., Kuo, Y.-H., Matrougui, K., Mongin, A.A., Trebak, M., 2013. STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch.* 465, 1249–1260. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1254-8>
- Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., Sabatier, J.-M., 2008. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2503–2518. <https://doi.org/10.2174/138161208785777441>
- Müller, D.M.J., Robe, P.A.J.T., Eijgelaar, R.S., Witte, M.G., Visser, M., de Munck, J.C., Broekman, M.L.D., Seute, T., Hendrikse, J., Noske, D.P., Vandertop, W.P., Barkhof, F., Kouwenhoven, M.C.M., Mandonnet, E., Berger, M.S., De Witt Hamer, P.C., 2019. Comparing Glioblastoma Surgery Decisions Between Teams Using Brain Maps of Tumor Locations, Biopsies, and Resections. *JCO Clin. Cancer Inform.* 3, CCI.18.00089. <https://doi.org/10.1200/CCI.18.00089>
- Munavalli, B.B., Naik, S.R., Torvi, A.I., Kariduraganavar, M.Y., 2019. Dendrimers, in: Jafar Mazumder, M.A., Sheardown, H., Al-Ahmed, A. (Eds.), *Functional Polymers, Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*. Springer International Publishing, Cham, pp. 289–345. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95987-0_9
- Nabissi, M., Morelli, M.B., Amantini, C., Farfariello, V., Ricci-Vitiani, L., Caprodossi, S., Arcella, A., Santoni, M., Giangaspero, F., De Maria, R., Santoni, G., 2010. TRPV2 channel negatively controls glioma cell proliferation and resistance to Fas-induced apoptosis in ERK-dependent manner. *Carcinogenesis* 31, 794–803. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq019>
- Nabissi, M., Morelli, M.B., Santoni, M., Santoni, G., 2013. Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis* 34, 48–57. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs328>
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., Halazonetis, T.D., 2010. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Niederhafner, P., Reinis, M., Sebestík, J., Jezek, J., 2008. Glycopeptide dendrimers, part III: a review. Use of glycopeptide dendrimers in immunotherapy and diagnosis of cancer and viral diseases. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 14, 556–587. <https://doi.org/10.1002/psc.1011>

- Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.-C., Xu, P.-Z., Chen, M.-L., Tonic, I., Unterman, T., Hay, N., 2008. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 14, 458–470. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.003>
- Othman, H., Wieninger, S.A., ElAyeb, M., Nilges, M., Srairi-Abid, N., 2017. In Silico prediction of the molecular basis of CITx and AaCTx interaction with matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) to inhibit glioma cell invasion. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 35, 2815–2829. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1231633>
- Papsdorf, K., Wolf, U., Hildebrandt, G., Kamprad, F., 1999. Outcome and Side Effects in Radiotherapy of Glioblastoma - Conventional Fractionation versus Accelerated Hyperfractionation. *Controv. Neuro-Oncol.* 33, 158–165. <https://doi.org/10.1159/000061232>
- Perekatt, A.O., Shah, P.P., Cheung, S., Jariwala, N., Wu, A., Gandhi, V., Kumar, N., Feng, Q., Patel, N., Chen, L., Joshi, S., Zhou, A., Taketo, M.M., Xing, J., White, E., Gao, N., Gatz, M.L., Verzi, M.P., 2018. SMAD4 suppresses WNT-driven dedifferentiation and oncogenesis in the differentiated gut epithelium. *Cancer Res.* 78, 4878–4890. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0043>
- Phan, T.G., Croucher, P.I., 2020. The dormant cancer cell life cycle. *Nat. Rev. Cancer* 20, 398–411. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0263-0>
- Plummer, H.K., Dhar, M.S., Cekanova, M., Schuller, H.M., 2005. Expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in lung cancer cell lines. *BMC Cancer* 5, 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-104>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Shuba, Y., 2018. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol. Rev.* 98, 559–621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Shuba, Y., 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol. Med.* 16, 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.005>
- Price, C.F., Tyssen, D., Sonza, S., Davie, A., Evans, S., Lewis, G.R., Xia, S., Spelman, T., Hodsmann, P., Moench, T.R., Humberstone, A., Paull, J.R.A., Tachedjian, G., 2011. SPL7013 Gel (VivaGel®) Retains Potent HIV-1 and HSV-2 Inhibitory Activity following Vaginal Administration in Humans. *PLOS ONE* 6, e24095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024095>
- Rajaratnam, V., Islam, M.M., Yang, M., Slaby, R., Ramirez, H.M., Mirza, S.P., 2020. Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. *Cancers* 12, E937. <https://doi.org/10.3390/cancers12040937>
- Ramírez-Cordero, B., Toledano, Y., Cano-Sánchez, P., Hernández-López, R., Flores-Solis, D., Saucedo-Yáñez, A.L., Chávez-Urbe, I., Brieba, L.G., del Río-Portilla, F., 2014. Cytotoxicity of recombinant tamapin and related toxin-like peptides on model cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 960–967. <https://doi.org/10.1021/tx4004193>
- Ramos-Soriano, J., Rojo, J., 2021. Glycodendritic structures as DC-SIGN binders to inhibit viral infections. *Chem. Commun.* 57, 5111–5126. <https://doi.org/10.1039/D1CC01281A>

- Rjeibi, I., Mabrouk, K., Mosrati, H., Berenguer, C., Mejdoub, H., Villard, C., Laffitte, D., Bertin, D., Ouafik, L., Luis, J., Elayeb, M., Srairi-Abid, N., 2011. Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. *Peptides* 32, 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.015>
- Roth, P., Silginer, M., Goodman, S.L., Hasenbach, K., Thies, S., Maurer, G., Schraml, P., Tabatabai, G., Moch, H., Tritschler, I., Weller, M., 2013. Integrin control of the transforming growth factor- β pathway in glioblastoma. *Brain J. Neurol.* 136, 564–576. <https://doi.org/10.1093/brain/aws351>
- Saberbaghi, T., Wong, R., Rutka, J.T., Wang, G.-L., Feng, Z.-P., Sun, H.-S., 2019. Role of Cl⁻ channels in primary brain tumour. *Cell Calcium* 81, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.05.004>
- Sampieri, F., Habersetzer-Rochat, C., 1978. Structure-function relationships in scorpion neurotoxins. Identification of the superreactive lysine residue in toxin I of *Androctonus australis* Hector. *Biochim. Biophys. Acta* 535, 100–109. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(78\)90037-5](https://doi.org/10.1016/0005-2795(78)90037-5)
- Santoni, G., Santoni, M., Nabissi, M., 2012. Functional role of T-type calcium channels in tumour growth and progression: prospective in cancer therapy. *Br. J. Pharmacol.* 166, 1244–1246. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01908.x>
- Sapra, R., Verma, R.P., Maurya, G.P., Dhawan, S., Babu, J., Haridas, V., 2019. Designer Peptide and Protein Dendrimers: A Cross-Sectional Analysis. *Chem. Rev.* 119, 11391–11441. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00153>
- Satsangi, A., Roy, S.S., Satsangi, R.K., Vadlamudi, R.K., Ong, J.L., 2014. Design of a paclitaxel prodrug conjugate for active targeting of an enzyme upregulated in breast cancer cells. *Mol. Pharm.* 11, 1906–1918. <https://doi.org/10.1021/mp500128k>
- Schipmann, S., Schwake, M., Molina, E.S., Stummer, W., 2019. Markers for Identifying and Targeting Glioblastoma Cells during Surgery. *J. Neurol. Surg. Part Cent. Eur. Neurosurg.* 80, 475–487. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1692976>
- Schwartz, E.F., Capes, E.M., Diego-García, E., Zamudio, F.Z., Fuentes, O., Possani, L.D., Valdivia, H.H., 2009. Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 157, 392–403. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00147.x>
- Semenza, G.L., 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.009>
- Shahbazzadeh, D., Srairi-Abid, N., Feng, W., Ram, N., Borchani, L., Ronjat, M., Akbari, A., Pessah, I.N., De Waard, M., El Ayeb, M., 2007. Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca²⁺ channels. *Biochem. J.* 404, 89–96. <https://doi.org/10.1042/BJ20061404>
- Shalabi, A., Zamudio, F., Wu, X., Scaloni, A., Possani, L.D., Villereal, M.L., 2004. Tetrapandins, a New Class of Scorpion Toxins That Specifically Inhibit Store-operated Calcium Entry in Human Embryonic Kidney-293 Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 1040–1049. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308234200>

Sherman, M.E., Troester, M.A., Hoadley, K.A., Anderson, W.F., n.d. *Morphological and Molecular Classification of Human Cancer*, Cancer Epidemiology and Prevention. Oxford University Press.

Simms, B.A., Zamponi, G.W., 2014. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82, 24–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>

Singh, N., Baby, D., Rajguru, J.P., Patil, P.B., Thakkannavar, S.S., Pujari, V.B., 2019. Inflammation and cancer. *Ann. Afr. Med.* 18, 121–126. https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.

Spedding, M., Paoletti, R., 1992. Classification of calcium channels and calcium antagonists: progress report. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 6, 35–39. <https://doi.org/10.1007/BF00050915>

Srairi-Abid, N., Othman, H., Aissaoui, D., BenAissa, R., 2019. Anti-tumoral effect of scorpion peptides: Emerging new cellular targets and signaling pathways. *Cell Calcium* 80, 160–174. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.05.003>

St. Louis, I.V., Bohjanen, P.R., 2017. Post-transcriptional regulation of cytokine and growth factor signaling in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 33, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.11.004>

Stach, M., Siriwardena, T.N., Köhler, T., van Delden, C., Darbre, T., Reymond, J.-L., 2014. Combining topology and sequence design for the discovery of potent antimicrobial peptide dendrimers against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 53, 12827–12831. <https://doi.org/10.1002/anie.201409270>

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., 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.* 10, 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 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. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Svenson, S., Tomalia, D.A., 2005. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2106–2129. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.018>

- Tabatabaei Mirakabad, F.S., Khoramgah, M.S., Keshavarz F, K., Tabarzad, M., Ranjbari, J., 2019. Peptide dendrimers as valuable biomaterials in medical sciences. *Life Sci.* 233, 116754. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116754>
- Tam, J. P., 1988. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5409–5413. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5409>
- Tam, J P, 1988. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5409–5413.
- Tam, J.P., Spetzler, J.C., 1997. Multiple antigen peptide system. *Methods Enzymol.* 289, 612–637. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(97\)89067-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)89067-2)
- Tamimi, A.F., Juweid, M., 2017. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma, in: De Vleeschouwer, S. (Ed.), *Glioblastoma*. Codon Publications, Brisbane (AU).
- TCGA, 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
- Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.* 84, 988–993. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>
- Teo, I., Toms, S.M., Marteyn, B., Barata, T.S., Simpson, P., Johnston, K.A., Schnupf, P., Puhar, A., Bell, T., Tang, C., Zloh, M., Matthews, S., Rendle, P.M., Sansonetti, P.J., Shaunak, S., 2012. Preventing acute gut wall damage in infectious diarrhoeas with glycosylated dendrimers. *EMBO Mol. Med.* 4, 866–881. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201290>
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316.
- Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P., 1985. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* 17, 117–132. <https://doi.org/10.1295/polymj.17.117>
- Tong-ngam, P., Roytrakul, S., Sritanaudomchai, H., 2015. BmKn-2 scorpion venom peptide for killing oral cancer cells by apoptosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 2807–2811. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.7.2807>
- Trojan, E., Bryniarska, N., Leśkiewicz, M., Regulska, M., Chamera, K., Szuster-Głuszczyk, M., Leopoldo, M., Lacivita, E., Basta-Kaim, A., 2020. The Contribution of Formyl Peptide Receptor Dysfunction to the Course of Neuroinflammation: A Potential Role in the Brain Pathology. *Curr. Neuropharmacol.* 18, 229–249. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666191019170244>
- Vagner, J., Qu, H., Hraby, V.J., 2008. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.009>
- Vajdic, C.M., van Leeuwen, M.T., 2009. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* 125, 1747–1754. <https://doi.org/10.1002/ijc.24439>
- Valerie, N.C.K., Dziegielewska, B., Hosing, A.S., Augustin, E., Gray, L.S., Brautigan, D.L., Larner, J.M., Dziegielewski, J., 2013. Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt

- signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 85, 888–897. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.017>
- Verkman, A.S., Galiotta, L.J.V., 2009. Chloride channels as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 153–171. <https://doi.org/10.1038/nrd2780>
- Viera, M.H., Amini, S., Huo, R., Konda, S., Block, S., Berman, B., 2010. Herpes simplex virus and human papillomavirus genital infections: new and investigational therapeutic options. *Int. J. Dermatol.* 49, 733–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04375.x>
- Waite, C.L., Sparks, S.M., Uhrich, K.E., Roth, C.M., 2009. Acetylation of PAMAM dendrimers for cellular delivery of siRNA. *BMC Biotechnol.* 9, 38. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-38>
- Wang, B., Kohli, J., Demaria, M., 2020. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer* 6, 838–857. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004>
- Wang, R., Gurguis, C.I., Gu, W., Ko, E.A., Lim, I., Bang, H., Zhou, T., Ko, J.-H., 2015. Ion channel gene expression predicts survival in glioma patients. *Sci. Rep.* 5, 11593. <https://doi.org/10.1038/srep11593>
- Wang, W., Xiong, W., Wan, J., Sun, X., Xu, H., Yang, X., 2009. The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress. *Nanotechnology* 20, 105103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/10/105103>
- Wei, W., Ryu, J.K., Choi, H.B., McLarnon, J.G., 2008. Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer Lett.* 260, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.10.025>
- Weinberg, R.A., 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.
- Weiß, E., Kretschmer, D., 2018. Formyl-Peptide Receptors in Infection, Inflammation, and Cancer. *Trends Immunol.* 39, 815–829. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.08.005>
- Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J.R., Wick, W., 2013. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? *Neuro-Oncol.* 15, 4–27. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos273>
- Weller, M., Le Rhun, E., 2020. How did lomustine become standard of care in recurrent glioblastoma? *Cancer Treat. Rev.* 87, 102029. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102029>
- Wen, P.Y., Huse, J.T., 2017. 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. *Contin. Minneap. Minn* 23, 1531–1547. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000536>
- Wenzel-Seifert, K., Hurt, C.M., Seifert, R., 1998. High constitutive activity of the human formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 24181–24189. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24181>
- Wesseling, P., Capper, D., 2018. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 44, 139–150. <https://doi.org/10.1111/nan.12432>

- Willis, R.E., 2016. Targeted Cancer Therapy: Vital Oncogenes and a New Molecular Genetic Paradigm for Cancer Initiation Progression and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17091552>
- Wirsching, H.-G., Galanis, E., Weller, M., 2016. Glioblastoma. *Handb. Clin. Neurol.* 134, 381–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Wundergem, R., Bartley, J.W., 2009. Menthol increases human glioblastoma intracellular Ca²⁺, BK channel activity and cell migration. *J. Biomed. Sci.* 16, 90. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-90>
- Yao, H., Ma, J., 2018. Dendrimer-paclitaxel complexes for efficient treatment in ovarian cancer: study on OVCAR-3 and HEK293T cells. *Acta Biochim. Pol.* 65, 219–225. https://doi.org/10.18388/abp.2017_2331
- Yoshida, Y., Imai, S., 1997. Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn. J. Pharmacol.* 74, 125–137. <https://doi.org/10.1254/jjp.74.125>
- Yuan, S., Norgard, R.J., Stanger, B.Z., 2019. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov.* 9, 837–851. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>
- Yue, X., Zhao, Y., Xu, Y., Zheng, M., Feng, Z., Hu, W., 2017. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. *J. Mol. Biol.* 429, 1595–1606. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.030>
- Zhang, D., Li, C., Zhang, L., Li, B., Wang, Y., Wang, R., Chen, Z., Xu, L., Liu, T., 2020. Cannabidiol from *Sinomenium Acutum* Inhibits Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells through MAPKs Signaling. *Nutr. Cancer* 1–11. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1836240>
- Zhang, Y., Cruickshanks, N., Yuan, F., Wang, B., Pahuski, M., Wulfkühle, J., Gallagher, I., Koepfel, A.F., Hatef, S., Papanicolas, C., Lee, J., Bar, E.E., Schiff, D., Turner, S.D., Petricoin, E.F., Gray, L.S., Abounader, R., 2017. Targetable T-type Calcium Channels Drive Glioblastoma. *Cancer Res.* 77, 3479–3490. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2347>
- Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., Abounader, R., 2018. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers* 10, 297. <https://doi.org/10.3390/cancers10090297>
- Zhao, Y., Chen, Z., Cao, Z., Li, W., Wu, Y., 2019. Diverse Structural Features of Potassium Channels Characterized by Scorpion Toxins as Molecular Probes. *Molecules* 24, 2045. <https://doi.org/10.3390/molecules24112045>
- Zhong, Q., da Rocha, S.R.P., 2016. Poly(amidoamine) Dendrimer–Doxorubicin Conjugates: In Vitro Characteristics and Pseudosolution Formulation in Pressurized Metered-Dose Inhalers. *Mol. Pharm.* 13, 1058–1072. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00876>
- Zhou, S.-F., Zhong, W.-Z., 2017. Drug Design and Discovery: Principles and Applications. *Mol. Basel Switz.* 22, E279. <https://doi.org/10.3390/molecules22020279>

Annexe