

LBT – CNRS UPR 9080

IBPC, 13 rue Pierre et Marie Curie 75005 Paris

Directeurs de thèse: Sophie Sacquin-Mora; co-directeur de thèse : Chantal Prévost

Courriel : sophie.sacquin-mora@ibpc.fr; chantal.prevost@ibpc.fr

Titre : Caractéristiques structurales du peptide NFL-TBS.40-63 et de son complexe avec la tubuline; conséquences pour l'inhibition de la formation de microtubules dans les glioblastomes

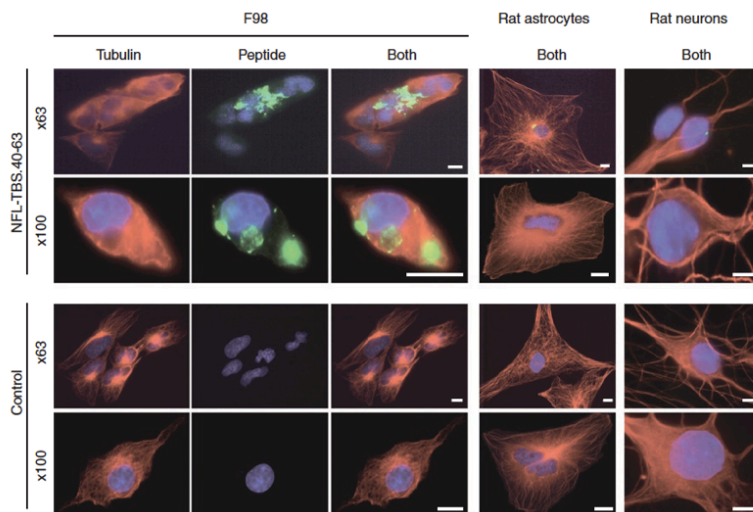
Résumé

Le peptide NFL-TBS.40-63 pénètre sélectivement dans les glioblastomes (cellules cancéreuses des gliomes) et interagit avec leur tubuline dont il inhibe la polymérisation. Ces propriétés en font un candidat prometteur dans la lutte contre ce type de cancer très agressif. Le projet vise à identifier le mode d'interaction du peptide avec les monomères ou dimères de tubuline, ainsi qu'avec la membrane cellulaire des glioblastomes. Il s'attachera à déterminer les caractéristiques structurales du peptide isolé ou en interaction à l'aide d'outils théoriques de dernière génération: représentation gros grain, amarrage flexible, métadynamique ou échanges de répliques. Ces études seront couplées à des informations expérimentales par RMN et CD. Des mutations visant à renforcer les propriétés du peptide seront proposées pour des tests *in vitro* et *in vivo*.

Title : Structural characteristics of the NFL-TBS.40-63 peptide and its complex with tubulin; effects on the inhibition of microtubule formation in glioblastomes

Abstract

The NFL-TBS.40-63 peptide selectively penetrates glioblastomes (cancer cells from gliomas) where it inhibits tubulin polymerization. These properties turn it into a promising candidate drug against this type of cancer, with often vital prognostics. The project aims at identifying the geometry of interaction of the peptide with tubulin monomers or dimers, and at exploring the interaction of the peptide with the glioblastome membrane. The structural characteristics of the peptide, in isolation or in complex, will use up-to-date methodological tools: coarse grain representation, flexible docking, metadynamics or replica exchange. Theoretical study will be coupled with experimental information from NMR and circular dichroism. Mutations aimed at strengthening the peptide properties will be proposed for *in vitro* and *in vivo* testing.



(Berges et al. Mol. Therapy 2012)

Titre du projet de thèse :

Etude structurale du peptide NFL-TBS.40-63, en milieu lipidique et en complexe avec la tubuline; Conséquences pour la sélectivité de pénétration et d'inhibition de la formation des microtubules dans les glioblastomes.

Parmi les agents thérapeutiques utilisés en chimiothérapie, les composés antimitotiques interfèrent avec la dynamique des microtubules en les stabilisant (Taxane et ses dérivés) ou en empêchant leur formation (Colchicine et ses dérivés). L'inhibition de la polymérisation ou de la dépolymérisation des hétérodimères de tubuline α,β en microtubules est en effet une stratégie efficace pour enrayer la division, et donc la prolifération des cellules cancéreuses. Un problème essentiel associé à ces thérapies est leur manque de sélectivité, entraînant des dommages importants à l'ensemble de l'organisme. Il est donc essentiel de développer des agents antimitotiques capables d'interférer spécifiquement avec le fonctionnement des seules cellules tumorales. L'équipe de J. Eyer (UPRES-EA3143, INSERM, CHU d'Angers) a récemment identifié un peptide de 24 acides aminés provenant de la chaîne légère de neurofilaments, qui pénètre préférentiellement dans les glioblastomes, cellules cancéreuses du système nerveux, où il inhibe la formation de microtubules. Ce peptide ne pénètre que faiblement dans les cellules saines du système nerveux (neurones, astrocytes) où il n'a pas de toxicité notable. Par analyse Ala-scan, il a été montré que des mutations ne serait-ce que d'un acide aminé peuvent annihiler ses propriétés soit de pénétration dans le glioblastome, soit d'inhibition de la formation des microtubules. Dans ce contexte, le potentiel du peptide NFL-TBS.40-63 dans la lutte contre les tumeurs des cellules gliales est double. D'une part, sa capacité à pénétrer sélectivement dans les glioblastomes en fait une biomolécule de choix dans une stratégie de marquage fluorescent des cellules tumorales. D'autre part, le peptide représente un potentiel thérapeutique très prometteur pour ce type de cancer pour lequel il n'existe pas de molécule efficace.

Le programme de la thèse abordera les deux aspects de l'action du peptide NFL-TBS.40-63 d'un point de vue structural. L'étude sera effectuée dans le cadre d'un réseau de collaborations impliquant l'équipe de J. Eyer (UPRES-EA3143, INSERM, CHU d'Angers biologie, biochimie), P. Savarin à l'Université de Bobigny (RMN) et M. Takahashi, CNRS et Université de Nantes (Dichroïsme circulaire, biochimie).

Un premier volet visera à explorer les propriétés intrinsèques du peptide en combinant les outils théoriques de la modélisation moléculaire (dynamique moléculaire avec échange de répliques ou métadynamique) à des informations expérimentales issues de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou dichroïsme circulaire (CD). On cherchera à comprendre comment ces propriétés influencent son activité. Le mode d'interaction du peptide avec l'hétérodimère de tubuline α,β sera ensuite étudié par une approche combinant RMN et amarrage macromoléculaire. Du fait de la grande taille du dimère de tubuline, la RMN utilisera les techniques de différence de transfert de saturation (STD) ou d'effet nucléo-Overhauser 2D transféré (TRNOESY), qui permettent d'identifier les résidus d'un ligand en contact avec une protéine et d'accéder à sa structure. La modélisation utilisera le logiciel d'amarrage ATTRACT/PTools, dont les fonctionnalités d'amarrage flexible seront particulièrement utiles concernant la tubuline. La surface de la tubuline présente en effet plusieurs longues boucles qui modifient leur conformation suite à l'interaction avec divers ligands. Enfin, le logiciel PROPHET, développé au laboratoire pour mettre en évidence les propriétés mécaniques des protéines isolées ou en complexe, devrait apporter un éclairage intéressant sur l'effet des mutations de la tubuline dans l'interaction avec le peptide NFL-TBS.40-63. Les microtubules des glioblastomes sont en effet enrichis en certains isomères de la tubuline, tel l'isomère β II. Cet axe bénéficiera également de l'expertise de Charles Robert en matière de flexibilité et d'interfaces protéiques.

Un deuxième volet de l'étude visera à explorer l'effet d'un environnement membranaire sur la structure du peptide. Des investigations récentes montrent que le peptide s'adsorbe à la surface des membranes lipidiques, notamment celle de nanocapsules dont il multiplie par 10 l'internalisation. L'interaction du peptide avec les nanocapsules, de composition parfaitement déterminée, sera étudiée notamment par dynamique moléculaire en représentation réduite (modèle Martini). L'interaction avec les bicouches membranaires sera également étudiée et on s'appliquera à évaluer l'effet de la composition des membranes des glioblastomes, qui diffère notablement de celle de cellules gliales saines. Cet aspect du projet sera l'occasion de renforcer et étendre l'expertise du LBT dans le domaine de la modélisation des membranes lipidique, et les compétences nouvellement acquises sur ce sujet pourront par la suite bénéficier directement à l'étude des systèmes concernés par le LABEX DYNAMO.

Le(a) candidat(e) bénéficiera d'un environnement privilégié pour mener à bien son projet. Le LBT regroupe une expertise à la fois dans l'étude conformationnelle de peptides (P. Derreumaux), dans la mécanique interne des protéines, dans l'amarrage macromoléculaire, dans le développement et l'utilisation de modèles gros grains. L'étude se fera en association étroite avec des équipes spécialisées dans l'étude de la tubuline. Le candidat prendra en charge les études par modélisation mais interviendra également dans les études de détermination expérimentale de structure.