Available Online at http://www.journalajst.com

ASIAN JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN: 0976-3376

Asian Journal of Science and Technology
Vol. 17, Issue, 10, pp. 14622-14627, October, 2026

RESEARCH ARTICLE

NANOCAPSULES LIPIDIQUES DOUBLEMENT FONCTIONNALISÉES AVEC DES PEPTIDES PÉNÉTRANTS POUR LE CIBLAGE INTRACELLULAIRE ET NUCLÉAIRE DU GLIOBLASTOME

Hamma Boubacar MAIGA[1,2,6], Bakary Moussa CISSE[1,3,6], Aichata Ben Adam MARIKO[1,5,6] and Sékou BAH[1,4,6].

[1]Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), Mali; [2]Usine Malienne de Produits Pharmaceutiques (UMPP-SA), Mali; [3]Laboratoire National de la Sante (LNS), Mali; [4]Centre Hospitalo-Universitaire du Point G (CHU-Point G), Mali; [5]Hôpital de Dermatologie de Bamako (HDB), Mali; [6]Laboratoire de Pharmacologie et de Pharmacie Galenique (LPG), Mali

ARTICLE INFO

Article History:
Received 18th July, 2026
Received in revised form
20th August, 2026
Accepted 14th September, 2026
Published online 30th October, 2026

Key words:
Nanocapsules Lipidiques, Peptides Pénétrants, Glioblastoma, Ciblage Nucléaire, Double Fonctionnalisation.

Corresponding author:** ***Zongo, I.

ABSTRACT

Malgré une prise en charge multimodale, le glioblastoma (GBM) reste une tumeur cérébrale agressive de très mauvais pronostic, en raison notamment de la barrière hémato-encéphalique, de l'hétérogénéité tumorale et d'une délivrance intracellulaire insuffisante des agents thérapeutiques. Le GBM, qui touche principalement l'adulte (âge médian ~65 ans) avec une incidence de 3-4/100 000 habitants, présente un phénotype mésenchymateux caractérisé par une surexpression de la vimentine, en faisant une cible de choix pour des peptides dérivés du cytosquelette. Dans cette étude, nous avons développé et caractérisé des nanocapsules lipidiques (LNCs) fonctionnalisées avec trois peptides pénétrants (CPPs) aux propriétés complémentaires: TAT (ciblage nucléaire), VIM (dérivé de la vimentine) et NFL (dérivé de la chaîne légère des neurofilaments, affinité pour les microtubules). L'internalisation, la localisation subcellulaire et la biocompatibilité des peptides seuls et couplés aux LNCs ont été évaluées sur la lignée F98 de GBM de rat. Les trois peptides présentent une internalisation concentration-dépendante sans cytotoxicité significative ni perturbation du cycle cellulaire, mais avec des profils de localisation distincts: TAT s'accumule préférentiellement dans le noyau, VIM présente une double localisation cyto-nucléaire, tandis que NFL colocalise spécifiquement avec les microtubules sans signal nucléaire. Les LNCs (50–100 nm, faible indice de polydispersité, potentiel zêta stable) ont été formulées avec succès. La fonctionnalisation simple ou double n'altère pas la stabilité des nanoparticules. La double fonctionnalisation TAT/NFL combine une internalisation rapide, un ancrage au cytosquelette et un potentiel d'adressage nucléaire. Bien que les analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) aient révélé une adsorption physique réversible plutôt qu'une liaison covalente stable, le concept de ciblage séquentiel cytosolique puis nucléaire utilisant des LNCs décorées de CPPs est validé. Ce travail constitue une preuve de concept pour une stratégie de ciblage actif à deux étages exploitant le transport naturel via le cytosquelette.

Citation: ***Nantchiliba, A., Bako, Y. F. R., Zongo, I. and Tapsoba, I.*** **2023.** "Nanocapsules lipidiques doublement fonctionnalisées avec des peptides pénétrants pour le ciblage intracellulaire et nucléaire du glioblastome*". Asian Journal of Science and Technology*, 17, (10), 14622-14627.

Copyright©2026, Nantchiliba et al. *This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.*

INTRODUCTION

Le glioblastoma (GBM), ou astrocytome de grade IV selon la classification de l'OMS, est la tumeur maligne primitive du système nerveux central la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte (1). Chaque année, environ 2000 à 3000 nouveaux cas sont diagnostiqués en France, avec une incidence mondiale similaire, et l'âge médian au diagnostic se situe autour de 65 ans avec une légère prédominance masculine (2). Malgré les progrès de la neurochirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie (protocole de Stupp associant le témozolomide), la survie médiane des patients reste inférieure à 15 mois (3). Cette situation s'explique par plusieurs facteurs : la nature infiltrante de la tumeur qui rend l'exérèse complète impossible, l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite l'accès des agents thérapeutiques, et l'hétérogénéité moléculaire intra-tumorale qui favorise l'émergence de résistances (4,5). La nanomédecine offre des perspectives prometteuses pour surmonter ces obstacles. Parmi les nombreux nanovecteurs développés, les nanocapsules lipidiques (LNCs) présentent des avantages majeurs : une biocompatibilité élevée, une facilité de production, une stabilité colloïdale, et une surface « furtive » grâce à la présence de polyéthylène glycol (PEG) qui prolonge leur demi-vie circulatoire (6,7). Les LNCs peuvent s'accumuler passivement dans les tumeurs par l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) (8). Cependant, cette accumulation passive ne garantit pas une internalisation efficace dans les cellules tumorales, ni un ciblage des compartiments subcellulaires où agissent de nombreux agents

anticancéreux (noyau, mitochondries, etc.). Pour améliorer la délivrance intracellulaire, une stratégie de ciblage actif consiste à fonctionnaliser la surface des nanoparticules avec des ligands spécifiques. Les peptides pénétrants (Cell-Penetrating Peptides, CPPs) sont de courtes séquences d'acides aminés capables de traverser les membranes plasmiques et de vectoriser des cargaisons thérapeutiques (9). Le peptide TAT, dérivé de la protéine Tat du VIH-1, est un CPP cationique de référence qui possède une séquence de localisation nucléaire (NLS) lui permettant de s'accumuler dans le noyau (10). Par ailleurs, des peptides dérivés de protéines du cytosquelette, comme la vimentine (VIM) ou la chaîne légère des neurofilaments (NFL), ont montré une capacité à interagir spécifiquement avec les microtubules ou les filaments intermédiaires, ouvrant la voie à un ancrage cytoplasmique et à un transport intracellulaire actif (11,12). Le choix de VIM et NFL repose sur la surexpression de la vimentine dans les GBM agressifs (phénotype EMT) et l'expression de neurofilaments dans un sous-ensemble de cellules gliales tumorales, offrant des cibles d'ancrage spécifiques.

L'hypothèse de cette étude est que la double fonctionnalisation des LNCs avec deux CPPs aux propriétés complémentaires, un peptide d'ancrage cytoplasmique (NFL ou VIM) et un peptide d'adressage nucléaire (TAT), permettrait d'améliorer significativement l'internalisation et le ciblage subcellulaire dans les cellules de glioblastome. Cette stratégie « à deux étages » vise à séquencer le processus : premier étage avec NFL pour l'entrée cytoplasmique et l'ancrage aux microtubules, puis second étage avec TAT pour l'adressage nucléaire final.L'objectif principal était de formuler des LNCs fonctionnalisées (simples ou doubles) et de caractériser leur internalisation ainsi que leur localisation intracellulaire sur le modèle de GBM de rat F98.

MATERIEL ET METHODES

Matériels

Les peptides TAT (séquence GRKKRRQRRRPPQ), VIM (fragment de la vimentine humaine, VIM-TBS.G-24-Q-NH2) et NFL (fragment de la chaîne légère des neurofilaments, NFL-TBS.Y-24-S-NH2) ont été synthétisés par GenScript (USA) avec une pureté >95 % et conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) en position C-terminale. Les caractéristiques physico-chimiques des peptides (poids moléculaire, charge nette) ont été validées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et analyse HPLC. Le marqueur lipophile DiD (1,1′-dioctadécyl-3, 3,3′,3′-tétraméthy lindodicar bocyanine) a été utilisé pour le suivi des LNCs. Le Labrafac® CC (triglycéride à chaînes moyennes), le Solutol® HS15 (tensioactif non ionique) et le Lipoid® PEG 4000 ont été utilisés pour la formulation.

Formulation des LNCs : Les LNCs ont été préparées par la méthode de précipitation par changement de solvant (6). Brièvement, la phase organique (Labrafac® CC 165 µL, Solutol® HS15 165 mg, DiD 0,5 mg dans 5 mL d'acétone) a été ajoutée rapidement à la phase aqueuse (Lipoid® PEG 4000 165 mg dans 10 mL d'eau purifiée) sous agitation magnétique vigoureuse (1000 rpm). Après évaporation de l'acétone sous pression réduite (40 °C, 200 mbar), le volume a été ajusté à 5 mL avec de l'eau purifiée. Les suspensions ont été stérilisées par filtration sur membrane 0,22 µm et conservées à 4 °C à l'abri de la lumière. Deux tailles nominales ont été produites : LNC-50 et LNC-100.

Fonctionnalisation des LNCs par les peptides: Les LNCs ont été incubées avec chaque peptide (ou mélange équimolaire pour la double fonctionnalisation) à un ratio de 500 molécules de peptide par LNC dans du PBS pH 7,4 contenant 1 mM d'EDTA. L'incubation a été réalisée à 4 °C sous agitation orbitale (50 rpm) pendant 72 heures à l'obscurité. Les LNCs fonctionnalisées ont été purifiées par trois cycles d'ultrafiltration sur membranes Amicon Ultra-15 (seuil de coupure 100 kDa) avec remise en suspension dans du PBS, puis stérilisées par filtration 0,22 µm.

Caractérisation physico-chimique: La taille hydrodynamique (diamètre Z-average), l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et électrophorèse laser Doppler à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Les échantillons ont été dilués au 1/100 dans de l'eau ultrapure (taille, PDI) ou dans NaCl 1 mM (potentiel zêta). Trois mesures indépendantes ont été réalisées par échantillon.

Culture cellulaire: Les cellules F98 ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) et authentifiées par analyse du caryotype et test de profilage STR. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM/F12 supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin inactivé, 2 mM de L-glutamine, 1 % d'acides aminés non essentiels et 100 U/mL de pénicilline-streptomycine, à 37 °C sous atmosphère humidifiée à 5 % de CO2. Les cellules ont été utilisées entre les passages 5 et 25. Un test de détection des mycoplasmes par PCR a été réalisé mensuellement pour garantir l'absence de contamination.

Internalisation cellulaire par cytométrie en flux: Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits (2×10^5 cellules/puits) 24 heures avant l'expérience. Après incubation avec les peptides seuls (25, 50, 100 µM) ou les LNCs fonctionnalisées (dilution finale 1/100) pendant 1 heure ou 24 heures à 37 °C, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS froid contenant 1 % de BSA, détachées à la trypsine-EDTA, fixées au paraformaldéhyde 4 % (10 min, température ambiante), puis analysées sur un cytomètre MacQUANT Analyzer 10 (MiltenyiBiotec). Les paramètres d'acquisition étaient les suivants : laser bleu 488 nm, filtre 530/30 nm pour le FITC, et 10 000 événements viables ont été enregistrés par échantillon. Le pourcentage de cellules positives et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) ont été déterminés.

Localisation subcellulaire par immunocytochimie: Les cellules ont été ensemencées sur des lames de culture Lab-Tek II (5×10^4 cellules/chambre) pendant 24 heures, puis traitées avec les peptides ou les LNCs pendant 1 heure. Après fixation au paraformaldéhyde 4 % (15 min) et perméabilisation au Triton X-100 0,1 % (10 min), les cellules ont été bloquées avec 5 % de sérum de chèvre. Les microtubules ont été marqués avec un anticorps monoclonal anti-α-tubuline (1:200, 1 h) suivi d'un anticorps secondaire couplé à la Cy3 (1:500, 45 min). Les noyaux ont été contre-colorés au DAPI (5 µg/mL, 5 min). Les lames ont été montées avec du Vectashield et observées au microscope confocal Nikon Eclipse Ti-E (objectifs 40× et 100× à immersion). L'analyse de co-localisation a été réalisée avec le logiciel ImageJ/FIJI en

utilisant le plugin JACoP pour le calcul des coefficients de Pearson et de Mander's.

Viabilité cellulaire (test MTT): Les cellules ont été ensemencées en plaques 96 puits (5×10^3 cellules/puits) 24 heures avant traitement. Après 24 heures d'exposition aux peptides (100 µM) ou aux LNCs fonctionnalisées, 10 µL de solution de MTT (5 mg/mL dans PBS) ont été ajoutés par puits pendant 4 heures à 37 °C. Les cristaux de formazan ont été dissous dans 100 µL de DMSO. L'absorbance a été lue à 570 nm (référence 650 nm) sur un lecteur SpectraMax i2. La viabilité a été exprimée en pourcentage du contrôle non traité.

Analyse statistique: Les données sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences indépendantes. Les comparaisons multiples ont été réalisées par ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey. Un seuil de significativité $p < 0,05$ a été retenu. Les analyses ont été effectuées avec GraphPadPrism 9.0.

RÉSULTATS

Caractérisation physico-chimique des LNCs fonctionnalisées: Les LNCs natives présentaient une taille moyenne de 52 ± 3 nm pour la formulation LNC-50 et de 103 ± 5 nm pour la LNC-100, avec un indice de polydispersité inférieur à 0,15 dans les deux cas, indiquant une population homogène (Tableau I). La fonctionnalisation par les peptides TAT, VIM ou NFL, seule ou en combinaison, n'a pas modifié significativement la taille ni le PDI ($p > 0,05$).

Le potentiel zêta des LNCs natives était proche de la neutralité (environ -1 mV). Après fonctionnalisation, des variations modérées ont été observées : les LNC-TAT-biot présentaient un potentiel plus négatif (-5,4 à -9,1 mV selon la taille), tandis que les LNC-TAT-FITC et LNC-VIM restaient proches de zéro. Ces variations n'ont pas compromis la stabilité colloïdale des suspensions.

Tableau I. Caractérisation physico-chimique des LNCs fonctionnalisées (72 h, 4 °C)

Formulation	Taille (nm)	PDI	Potentiel zêta (mV)
LNC natives	52,1 ± 2,8	0,12	- 0,97 ± 0,3
LNC-TAT-FITC	54,3 ± 3,1	0,14	0,24 ± 0,2
LNC-VIM-FITC	53,2 ± 2,9	0,13	- 0,09 ± 0,2
LNC-NFL-FITC	54,0 ± 3,4	0,15	- 2,15 ± 0,5
LNC-TAT/NFL-FITC	56,2 ± 4,0	0,16	- 2,88 ± 0,6

Valeurs : moyenne ± SEM, n=3.

Internalisation des peptides seuls: L'internalisation des trois peptides FITC-conjugués a été évaluée par cytométrie en flux après 1 heure d'incubation sur les cellules F98. Tous les peptides ont montré une internalisation concentration-dépendante (25–100 µM). Le peptide TAT a été le plus efficace, avec 99,5 % de cellules positives à 100 µM, suivi de VIM (97,6 %) et de NFL (88,8 %) (Tableau II). À faible concentration (25 µM), TAT a internalisé 60,3 % des cellules, contre 31,2 % pour VIM et seulement 17,2 % pour NFL.

Tableau II. Pourcentage de cellules F98 positives après 1 heure d'incubation avec les peptides FITC

Concentration	TAT (%)	VIM (%)	NFL (%)
25 µM	60,3	31,2	17,2
50 µM	92,3	90,8	60,9
100 µM	99,5	97,6	88,8

Cette hiérarchie d'efficacité (TAT > VIM > NFL) à faible dose reflète la nature distincte des mécanismes d'entrée cellulaire : TAT exploite principalement des interactions électrostatiques avec les héparanes sulfates membranaires, tandis que VIM et NFL, de nature amphiphile, dépendent davantage de voies d'endocytose régulées ou d'interactions avec le cytosquelette.

Localisation subcellulaire des peptides: La microscopie confocale a révélé des profils de localisation nettement distincts (Figure 1). TAT s'est accumulé préférentiellement dans le noyau, en raison de sa séquence NLS canonique (RKKRRQRRR) reconnue par l'importine. VIM a montré une double localisation cyto-nucléaire, suggérant sa capacité à exploiter le trafic naturel de la vimentine entre le cytoplasme et le noyau. En revanche, NFL a colocalisé spécifiquement avec les microtubules, sans aucun signal nucléaire détectable, confirmant son rôle d'ancrage cytoplasmique spécifique.

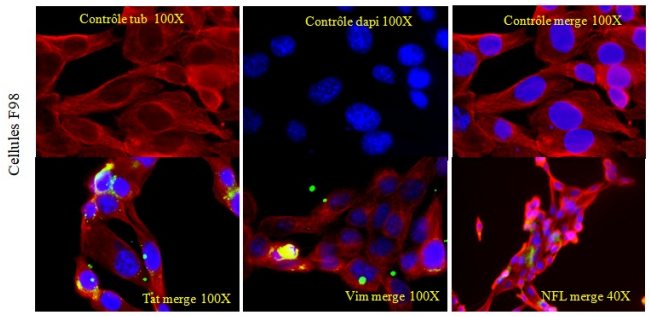


Figure 1. Immunocytochimie des cellules F98 traitées avec les peptides FITC (vert), marquage des microtubules (Cy3, rouge) et des noyaux (DAPI, bleu)

Absence de cytotoxicité et d'effet sur le cycle cellulaire: Le test MTT réalisé après 24 heures d'exposition aux peptides à 100 µM n'a montré aucune réduction significative de la viabilité cellulaire (TAT : 94,2 % ; VIM : 93,1 % ; NFL : 94,0 % ; $p > 0,05$ par rapport au contrôle). L'analyse du cycle cellulaire par iodure de propidium n'a révélé aucune modification des proportions de cellules en phases G0/G1, S ou G2/M, ni d'apparition d'un pic sub-G1 (apoptose) pour aucun des trois peptides (données non montrées). Ces résultats confirment la biocompatibilité intrinsèque des peptides, un prérequis essentiel pour des vecteurs de délivrance où l'effet thérapeutique doit être attribué à la charge active et non au transporteur.

Internalisation des LNCs fonctionnalisées: Les LNCs chargées en DiD (marqueur lipophile) ont été incubées avec les cellules F98 pendant 1 heure, puis l'internalisation a été quantifiée par cytométrie en flux dans le canal DiD. Les LNCs natives ont montré une internalisation basale modeste (environ 15 % de cellules positives). La fonctionnalisation par un seul peptide a significativement augmenté l'internalisation : LNC-TAT (85 %), LNC-VIM (78 %), LNC-NFL (70 %) ($p < 0,01$ vs LNC natives). La double fonctionnalisation TAT/NFL a produit l'internalisation la plus élevée (92 % de cellules positives), suggérant un effet synergique (Figure 2). L'internalisation des LNCs doublement fonctionnalisées était également plus rapide, avec un pic de fluorescence atteint dès 30 minutes.

Localisation subcellulaire des LNCs fonctionnalisées: Par microscopie confocale, les LNCs-TAT ont été retrouvées principalement dans le compartiment périnucléaire et le noyau.

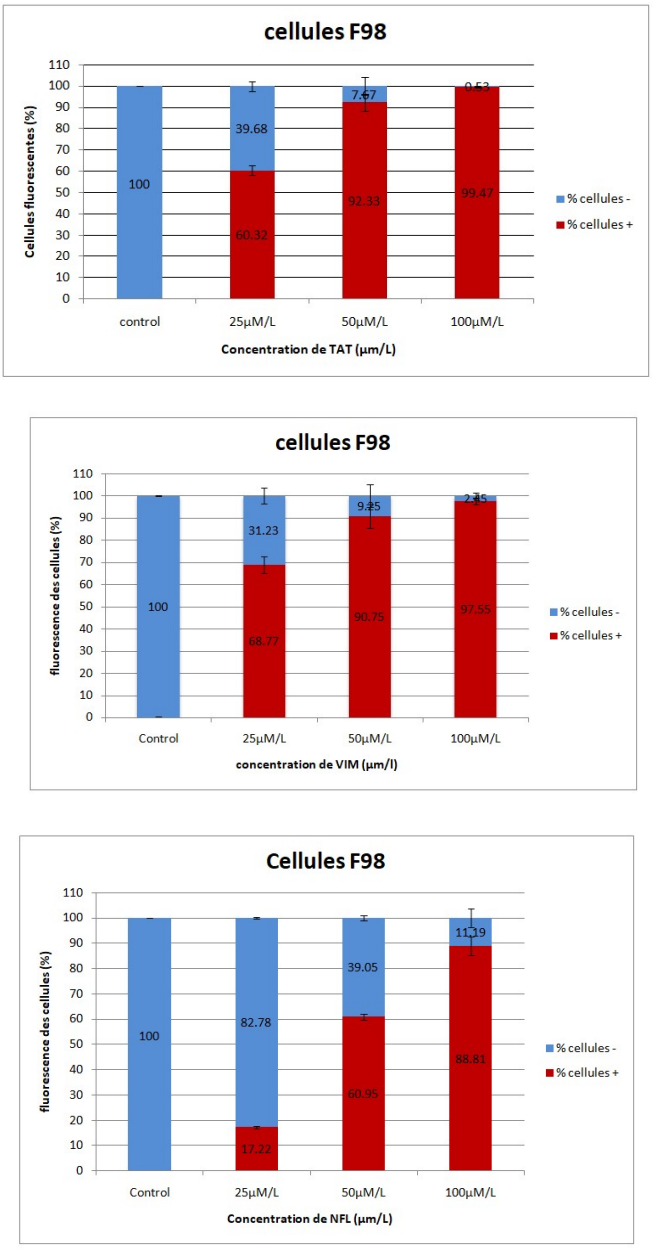


Figure 2. Histogramme de cytométrie en flux montrant le pourcentage de cellules F98 ayant internalisé les LNCs (canal DiD) après 1 heure

Les LNCs-NFL ont colocalisé avec les microtubules, confirmant que le peptide NFL conserve sa propriété d'ancrage au cytosquelette même lorsqu'il est greffé à la surface des nanoparticules. Les LNCs doublement fonctionnalisées TAT/NFL ont montré une localisation mixte : une fraction associée aux microtubules et une autre fraction présente dans le noyau, suggérant un transport séquentiel(Figure 3). Cette observation microscopique conforte l'hypothèse d'un transport actif le long des microtubules (via kinésines/dynéines) guidant la nanoparticule vers le noyau, où TAT prend le relais pour la translocation nucléaire.

Essais d'encapsulation par chromatographie d'exclusion stérique (SEC): Des essais préliminaires de détection de l'association peptide-LNC par SEC ont montré que le peptide TAT-FITC n'était pas co-élué avec la fraction LNC (temps de rétention 3,3–3,5 min) mais apparaissait dans la fraction libre (8–10 min), indiquant une adsorption réversible non détectable par cette méthode. De plus, le marquage FITC de NFL s'est avéré non fonctionnel (absence de signal fluorescent),

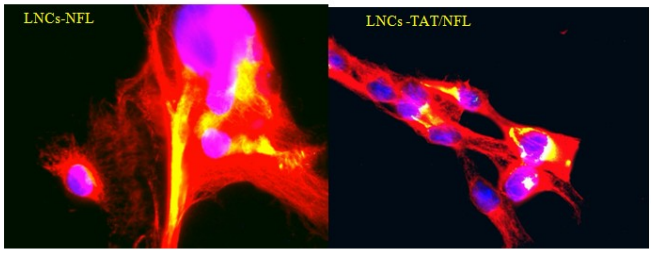


Figure 3. Localisation subcellulaire des LNCs fonctionnalisées

compromettant son suivi en SEC. Ces résultats soulignent que l'association peptide-LNC est principalement de type physique (hydrophobe ou électrostatique) et réversible, et qu'il est nécessaire d'optimiser les méthodes de conjugaison covalente (par exemple, via des groupements maléimide réagissant avec des thiols introduits à la surface des LNCs) pour obtenir une liaison stable.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons développé des nanocapsules lipidiques fonctionnalisées par des peptides pénétrants (TAT, VIM, NFL) et évalué leur capacité à internaliser les cellules de glioblastome F98, avec un intérêt particulier pour la double fonctionnalisation TAT/NFL. Nos principaux résultats montrent que : (i) les trois peptides présentent des profils d'internalisation et de localisation subcellulaire complémentaires et sont dépourvus de cytotoxicité ; (ii) la fonctionnalisation des LNCs améliore significativement leur internalisation, avec un effet synergique pour la double fonctionnalisation ; (iii) le ciblage microtubulaire par NFL et le ciblage nucléaire par TAT peuvent être combinés sur une même nanoparticule. Cette discussion vise à interpréter ces résultats de manière critique et à les contextualiser dans le paysage scientifique actuel de la nanomédecine pour le GBM.

Comparaison des profils des peptides: L'efficacité d'internalisation de TAT (> 99 % à 100 µM) est conforme aux données de la littérature (10,13). Ce peptide cationique riche en arginine interagit électrostatiquement avec les héparanes sulfates membranaires et emprunte principalement la macropinocytose (14). Sa forte accumulation nucléaire est due à la présence d'une séquence NLS (RKKRRQRRR) reconnue par l'importine (15). Le peptide VIM, dérivé de la vimentine, a montré une internalisation intermédiaire et une double localisation cyto-nucléaire. La vimentine est surexprimée dans les cellules de GBM de phénotype mésenchymateux, et son peptide dérivé pourrait exploiter les voies de transport associées (11,16). Enfin, le peptide NFL a été le moins efficace à faible dose mais le plus spécifique, se localisant exclusivement sur les microtubules, comme attendu pour un fragment du site de liaison à la tubuline (12,17). Cette spécificité est un atout pour un ancrage cytoplasmique sans diffusion nucléaire indésirable. L'absence de cytotoxicité et d'effet sur le cycle cellulaire des trois peptides valide leur innocuité en tant que vecteurs. Ce résultat est essentiel pour des applications thérapeutiques où l'effet doit être attribué à la charge active et non au transporteur (18). Nos résultats sont cohérents avec la littérature sur les CPPs, qui généralement présentent une faible toxicité intrinsèque, mais cette sécurité apparente devra être confirmée dans des modèles plus complexes, incluant des co-cultures avec des cellules saines pour évaluer la spécificité.

Intérêt de la double fonctionnalisation TAT/NFL: La double fonctionnalisation TAT/NFL a produit l'internalisation la plus élevée (92 %). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette synergie. D'une part, le peptide NFL pourrait faciliter l'ancrage initial des LNCs à la membrane via son interaction avec les microtubules sous-membranaires ou des protéines associées (19). D'autre part, une fois internalisées, les LNCs-TAT/NFL bénéficient du transport actif le long des microtubules (via kinésines/dynéines) tout en conservant la capacité d'adressage nucléaire conférée par TAT (20). Cette approche « à deux étages » contourne ainsi partiellement le piégeage endosomal, un défi majeur associé à l'endocytose des CPPs. Le peptide NFL favorise l'entrée et l'ancrage initial aux microtubules, les moteurs moléculaires cellulaires (dynéines) prennent en charge la LNC ancrée et la transportent vers le noyau, puis TAT, avec sa NLS, interagit avec le système d'import nucléaire pour détourner la LNC vers le noyau. Ce type de stratégie a été proposé pour d'autres CPPs mais rarement démontré pour le GBM (21). Nos observations microscopiques (colocalisation partielle avec les microtubules et présence nucléaire) confortent cette hypothèse.

Limites méthodologiques et perspectives: Une limite importante de notre étude est l'absence de preuve formelle de la liaison covalente ou stable des peptides aux LNCs. Les essais de chromatographie d'exclusion stérique n'ont pas permis de détecter une association résistant à la dilution et aux forces de cisaillement, suggérant que l'adsorption est principalement de type physique (hydrophobe ou électrostatique) et réversible (22). Des travaux complémentaires sont nécessaires pour optimiser le greffage covalent, par exemple en utilisant des peptides comportant un groupement maléimide réagissant avec des thiols introduits à la surface des LNCs (23). De plus, le marquage FITC de NFL n'étant pas fonctionnel, l'utilisation d'un autre fluorophore (Alexa Fluor 647, Cy5) ou d'une quantification par spectrométrie de masse serait préférable (24).

Une autre limite est l'utilisation exclusive de la lignée F98 (rat). Bien que ce modèle soit largement accepté pour les études précliniques (25), des travaux sur des lignées humaines (U87, T98G) et sur des cellules souches de GBM sont nécessaires pour confirmer la pertinence translationnelle (26). Enfin, des études in vivo dans un modèle orthotopique de GBM devront évaluer la biodistribution, le franchissement de la BHE et l'efficacité antitumorale des LNCs doublement fonctionnalisées chargées d'un agent actif comme le témozolomide ou un siRNA (27). L'absence d'évaluation sur des cellules saines (astrocytes, neurones) limite également l'appréciation de la spécificité potentielle des peptides VIM et NFL, dont le design repose sur l'exploitation de cibles surexprimées dans les cellules tumorales.

Implications pour le traitement du glioblastoma: Le concept de ciblage séquentiel cytoplasmique puis nucléaire via des LNCs fonctionnalisées par NFL et TAT ouvre des perspectives intéressantes pour la chimiothérapie du GBM. De nombreux agents (témozolomide, doxorubicine, inhibiteurs de topoisomérase) agissent sur l'ADN et nécessitent une concentration nucléaire élevée (28). En améliorant la délivrance nucléaire, on pourrait potentialiser leur efficacité tout en réduisant les doses systémiques et donc la toxicité. De plus, cette plateforme pourrait être adaptée à la thérapie génique (plasmides, siRNA ciblant des oncogènes) ou à l'immunothérapie (29). À plus long terme, le développement de systèmes sensibles au microenvironnement tumoral (pH bas, enzymes surexprimées) pour des CPPs « activables » spécifiquement dans la tumeur pourrait améliorer l'index thérapeutique et réduire les effets hors-cible.

CONCLUSION

Ce travail a démontré la faisabilité et le potentiel thérapeutique d'une nouvelle stratégie de ciblage du glioblastome basée sur l'utilisation de nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec des peptides pénétrants. Les résultats obtenus confirment l'hypothèse initiale selon laquelle la combinaison de peptides aux propriétés complémentaires permet d'améliorer à la fois l'internalisation cellulaire et le ciblage subcellulaire des nanovecteurs. L'étude comparative des peptides TAT, VIM et NFL a révélé des profils d'internalisation et de localisation distincts, reflétant leurs mécanismes d'action différents. Le peptide TAT a confirmé sa capacité exceptionnelle à cibler le noyau, tandis que le peptide NFL a démontré une affinité spécifique pour le réseau microtubulaire. La fonctionnalisation des LNCs avec ces peptides a permis d'améliorer significativement leur internalisation dans les cellules F98 de glioblastome, avec un avantage notable pour les systèmes doublement fonctionnalisés (TAT-NFL).

L'absence de cytotoxicité des peptides et des LNCs fonctionnalisées, combinée à leur capacité à atteindre des compartiments subcellulaires spécifiques, en fait des vecteurs prometteurs pour la délivrance ciblée d'agents thérapeutiques. La stratégie de double fonctionnalisation, en particulier l'association TAT-NFL, représente une approche innovante qui exploite les voies de transport intracellulaire naturelles pour acheminer les agents thérapeutiques vers leur site d'action. Ces résultats ouvrent des perspectives importantes pour le traitement du glioblastome, notamment pour améliorer l'efficacité du témozolomide en favorisant son accumulation nucléaire. Les prochaines étapes devront valider cette stratégie dans des modèles plus complexes, incluant des études de franchissement de la barrière hémato-encéphalique et des tests d'efficacité in vivo, en vue d'un développement préclinique ultérieur.

REFERENCES

Louis DN, Perry A, Wesseling P, *et al*. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro Oncol. 2021;23(8):1231-1251.

Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, *et al*. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. Neuro Oncol. 2020;22(12 Suppl 2):iv1-iv96.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al*. Radiotherapy plus concomitant and adjuvanttemozolomide forglioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):987-996.

Aldape K, Brindle KM, Chesler L, *et al*. Challenges to curing primary brain tumours. Nat Rev Clin Oncol. 2019;16(8):509-520.

Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. Nat Rev Cancer. 2020;20(1):26-41.

Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. PharmRes. 2002;19(6):875-880.

Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. Biomaterials. 2006;27(24):4356-4373.

Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 1986;46(12 Pt 1):6387-6392.

Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. Trends PharmacolSci. 2017;38(4):406-424.

Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. J Biol Chem. 1997;272(25):16010-16017.

Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. Cell Mol Life Sci. 2011;68(18):3033-3046.

Bocquet A, Berges R, Frank R, *et al*. Neurofilaments bindtubulin and modulateitspolymerization. J Neurosci. 2009;29(35):11043-11054.

Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(4):559-577.

Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, *et al*. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. Traffic. 2007;8(7):848-866.

Koren E, Torchilin VP. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. Trends Mol Med. 2012;18(7):385-393.

Danielsson F, Peterson MK, Caldeira Araújo H, *et al*. Vimentin Diversity in Health and Disease. Cells. 2018;7(10):147.

Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. Mol Neurobiol. 2008;38(1):27-65.

Zorko M, Langel Ü. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(4):529-545.

Knipe JM, Chen F, Peppas NA. Enzymatic biodegradation of hydrogels for protein delivery targeted to the small intestine. ACS Macro Lett. 2015;4(9):975-979.

Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(10):790-803.

Maiolo JR, Ferrer M, Ottinger EA. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. Biochim Biophys Acta. 2005;1712(2):161-172.

Hupfeld S, Holsaeter AM, Skar M, *et al*. Liposome interactions with biologically relevant proteins. J Liposome Res. 2006;16(3):239-250.

Sawant RR, Torchilin VP. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. AAPS J. 2012;14(2):303-315.

Johnson I, Spence MTZ. The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 11th ed. Life Technologies; 2010.

Barth RF, Kaur B. Rat braintumormodels in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. J Neurooncol. 2009;94(3):299-312.

Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, *et al*. Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev. 2015;29(12):1203-1217.

Allard E, Passirani C, Benoit JP. Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. Biomaterials. 2009;30(12):2302-2318.

Touat M, Idbaih A, Sanson M, Ligon KL. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. Ann Oncol. 2017;28(7):1457-1472.

Xie J, Bi Y, Zhang H, *et al*. Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application. Front Pharmacol. 2020;11:697.

****