

2024-2025

**Thèse**

pour le

**Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie**

**CIBLAGE DE CK1 $\alpha$  : UN RÉGULATEUR CLÉ  
DE L'HOMÉOSTASIE DES CELLULES DE  
TYPE SOUCHE DE GLIOBLASTOME**

-

**TARGETING CK1 $\alpha$ : A KEY REGULATOR OF  
HOMEOSTASIS IN GLIOBLASTOMA STEM  
LIKE CELLS**

**LE GUYON Margaux** |

Née le 12/12/1999 à Angers (49)

Sous la direction Mme GAVARD Julie |

Membres du jury

Nicolas CLERE | Président

Julie GAVARD | Directrice

Guillaume BASTIAT | Co-Directeur

Catherine GRATAS | Membre

Carine ROSSE | Membre

Soutenue publiquement le :  
30 avril 2025



**FACULTÉ  
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

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

signé par l'étudiant(e) le **01 / 04 / 2025**



**FACULTÉ  
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS

"La Faculté de Santé déclare que les opinions émises dans les thèses  
qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres  
à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni  
improbation."



**FACULTÉ  
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS

## **LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS**

**Doyen de la Faculté** : Pr Cédric ANNWEILER

**Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie** : Pr Sébastien FAURE

**Directeur du département de médecine** : Pr Vincent DUBEE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	PHYSIOLOGIE	Médecine
ANGOULVANT Cécile	MEDECINE GENERALE	Médecine
ANNWEILER Cédric	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT	Médecine
ASFAR Pierre	REANIMATION	Médecine
AUBE Christophe	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
AUGUSTO Jean-François	NEPHROLOGIE	Médecine
BAUFRETON Christophe	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
BELLANGER William	MEDECINE GENERALE	Médecine
BELONCLE François	REANIMATION	Médecine
BIERE Loïc	CARDIOLOGIE	Médecine
BIGOT Pierre	UROLOGIE	Médecine
BONNEAU Dominique	GENETIQUE	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
BOUET Pierre-Emmanuel	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
BOURSIER Jérôme	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
BOUVARD Béatrice	RHUMATOLOGIE	Médecine
BRIET Marie	PHARMACOLOGIE	Médecine
CAMPONE Mario	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CASSEREAU Julien	NEUROLOGIE	Médecine
CLERE Nicolas	PHARMACOLOGIE / PHYSIOLOGIE	Pharmacie
COLIN Estelle	GENETIQUE	Médecine
CONNAN Laurent	MEDECINE GENERALE	Médecine
COPIN Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
COUTANT Régis	PEDIATRIE	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	PHYSIOLOGIE	Médecine
CRAUSTE-MANCIET Sylvie	PHARMACOTECHNIQUE HOSPITALIERE	Pharmacie
DE CASABIANCA Catherine	MEDECINE GENERALE	Médecine
DERBRE Séverine	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
DESCAMPS Philippe	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
D'ESCATHA Alexis	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
DINOMAS Mickaël	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION	Médecine
DUBEE Vincent	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
DUVERGER Philippe	PEDOPSYCHIATRIE	Médecine
EVEILLARD Matthieu	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pharmacie
FAURE Sébastien	PHARMACOLOGIE PHYSIOLOGIE	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	ANATOMIE	Médecine
FOUQUET Olivier	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
FURBER Alain	CARDIOLOGIE	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	PNEUMOLOGIE	Médecine
GOHIER Bénédicte	PSYCHIATRIE D'ADULTES	Médecine
GUARDIOLA Philippe	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
GUILLET David	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
HUNAUULT-BERGER Mathilde	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine



# FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

JEANNIN Pascale	IMMUNOLOGIE	Médecine
KAZOUR François	PSYCHIATRIE	Médecine
KEMPF Marie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE	Médecine
LACOEUILLE FRANCK	RADIOPHARMACIE	Pharmacie
LACCOURREYE Laurent	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE	Médecine
LAGARCE Frédéric	BIOPHARMACIE	Pharmacie
LANDREAU Anne	BOTANIQUE/ MYCOLOGIE	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION	Médecine
LEBDAI Souhil	UROLOGIE	Médecine
LEGENDRE Guillaume	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
LEGRAND Erick	RHUMATOLOGIE	Médecine
LEMEE Jean-Michel	NEUROCHIRURGIE	Médecine
LERMITE Emilie	CHIRURGIE GENERALE	Médecine
LEROLLE Nicolas	REANIMATION	Médecine
LIBOUBAN Hélène	HISTOLOGIE	Médecine
LUQUE PAZ Damien	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE	Médecine
MARCHAIS Véronique	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pharmacie
MARTIN Ludovic	DERMATO-VENEREOLOGIE	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION	Médecine
MENEI Philippe	NEUROCHIRURGIE	Médecine
MERCAT Alain	REANIMATION	Médecine
ORVAIN Corentin	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
PAISANT Anita	RADIOLOGIE	Médecine
PAPON Nicolas	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
PELLIER Isabelle	PEDIATRIE	Médecine
PETIT Audrey	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
PICQUET Jean	CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE	Médecine
PODEVIN Guillaume	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
PROCACCIO Vincent	GENETIQUE	Médecine
PRUNIER Delphine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
PRUNIER Fabrice	CARDIOLOGIE	Médecine
PY Thibaut	MEDECINE GENERALE	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	MEDECINE GENERALE	Médecine
REYNIER Pascal	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
RIOU Jérémie	BIostatistique	Pharmacie
RINEAU Emmanuel	ANESTHESIOLOGIE REANIMATION	Médecine
RIQUIN Elise	PEDOPSYCHIATRIE ; ADDICTOLOGIE	Médecine
RODIEN Patrice	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
ROQUELAURE Yves	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
ROUSSEAU Audrey	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROUSSEAU Pascal	CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROY Pierre-Marie	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
SAULNIER Patrick	BIOPHYSIQUE ET BIostatistiques	Pharmacie
SERAPHIN Denis	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
SCHMIDT Aline	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
TESSIER-CAZENEUVE Christine	MEDECINE GENERALE	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	PNEUMOLOGIE	Médecine
UGO Valérie	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine



# FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

URBAN Thierry	PNEUMOLOGIE	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	PEDIATRIE	Médecine
VENARA Aurélien	CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
VERNY Christophe	NEUROLOGIE	Médecine
WILLOTEAUX Serge	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine

## MAÎTRES DE CONFÉRENCES

AMMI Myriam	CHIRURGIE VASCULAIRE ET THORACIQUE	Médecine
BAGLIN Isabelle	CHIMIE THERAPEUTIQUE	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	IMMUNOLOGIE	Médecine
BEGUE Cyril	MEDECINE GENERALE	Médecine
BELIZNA Cristina	MEDECINE INTERNE	Médecine
BERNARD Florian	ANATOMIE	Médecine
BESSAGUET Flavien	PHYSIOLOGIE PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BLANCHET Odile	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
BOISARD Séverine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
BOUCHER Sophie	ORL	Médecine
BRIET Claire	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
BRILLAND Benoit	NEPHROLOGIE	Médecine
BRIS Céline	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Pharmacie
BRUGUIERE Antoine	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
CAPTAIN Olivier	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CHABRUN Floris	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Pharmacie
CHAO DE LA BARCA Juan-Manuel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
CHOPIN Matthieu	MEDECINE GENERALE	
CODRON Philippe	NEUROLOGIE	Médecine
DEMAS Josselin	SCIENCES DE LA READAPTATION	Médecine
DESHAYES Caroline	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE	Pharmacie
DOUILLET Delphine	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
FERRE Marc	BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	PHYSIOLOGIE	Médecine
GHALI Maria	MEDECINE GENERALE	Médecine
GUELFJF Jessica	MEDECINE GENERALE	Médecine
HADJ MAHMOUD Dorra	IMMUNOLOGIE	Pharma
HAMEL Jean-François	BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE	Médicale
HAMON Cédric	MEDECINE GENERALE	Médecine
HELESBEUX Jean-Jacques	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
HERIVAUX Anaïs	BIOTECHNOLOGIE	Pharmacie
HINDRE François	BIOPHYSIQUE	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	MEDECINE GENERALE	Médecine
KHIATI Salim	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
LEFEUVRE Caroline	BACTERIOLOGIE ; VIROLOGIE	Médecine
LEGEAY Samuel	PHARMACOCINETIQUE	Pharmacie
LEPELTIER Elise	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
LETOURNEL Franck	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
MABILLEAU Guillaume	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE	Médecine
MALLET Sabine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
MAROT Agnès	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
MESLIER Nicole	PHYSIOLOGIE	Médecine
MIOT Charline	IMMUNOLOGIE	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	PHILOSOPHIE	Médecine



# FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

NAIL BILLAUD Sandrine	IMMUNOLOGIE	Pharmacie
PAILHORIE Hélène	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Médecine
PAPON Xavier	ANATOMIE	Médecine
PASCO-PAPON Anne	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
PENCHAUD Anne-Laurence	SOCIOLOGIE	Médecine
PIHET Marc	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
PIRAUX Arthur	OFFICINE	Pharmacie
POIROUX Laurent	SCIENCES INFIRMIERES	Médecine
RONY Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE	Médecine
ROGER Emilie	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
SAVARY Camille	PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE	Pharmacie
SCHMITT Françoise	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	PHARMACIE CLINIQUE ET EDUCATION THERAPEUTIQUE	Pharmacie
TEXIER-LEGENDRE Gaëlle	MEDECINE GENERALE	Médecine
VIAULT Guillaume	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie

## AUTRES ENSEIGNANTS

<b>ATER</b>		
BARAKAT Fatima	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
ATCHADE Constantin	GALENIQUE	Pharmacie
<b>PRCE</b>		
AUTRET Erwan	ANGLAIS	Santé
BARBEROUSSE Michel	INFORMATIQUE	Santé
COYNE Ashley	ANGLAIS	Santé
O'SULLIVAN Kayleigh	ANGLAIS	Santé
RIVEAU Hélène	ANGLAIS	Santé
<b>PAST-MAST</b>		
AUBRUCHET Hélène	PHARMACIE DEUST PREPARATEUR	Pharmacie
BEAUVAIS Vincent	OFFICINE	Pharmacie
BRAUD Cathie	PHARMACIE DEUST PREPARATEUR	Pharmacie
CAVAILLON Pascal	PHARMACIE INDUSTRIELLE	Pharmacie
CHAMPAGNE Romain	MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION	Médecine
DILÉ Nathalie	OFFICINE	Pharmacie
GUILLET Anne-Françoise	PHARMACIE DEUST PREPARATEUR	Pharmacie
GUITTON Christophe	MEDECINE INTENSIVE-REANIMATION	Médecine
KAASSIS Mehdi	GASTRO-ENTEROLOGIE	Médecine
LAVIGNE Christian	MEDECINE INTERNE	Médecine
MARSAN-POIROUX Sylvie	COMMUNICATION	Pharmacie
MOAL Frédéric	PHARMACIE CLINIQUE	Pharmacie
PICCOLI Giorgia	NEPHROLOGIE	Médecine
POMMIER Pascal	CANCEROLOGIE-RADIOTHERAPIE	Médecine
SAVARY Dominique	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
<b>PLP</b>		
CHIKH Yamina	ECONOMIE-GESTION	Médecine
<b>AHU</b>		
CORVAISIER Mathieu	PHARMACIE CLINIQUE	Pharmacie
ROBIN Julien	DISPOSITIFS MEDICAUX	Pharmacie

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude aux membres de mon jury : Nicolas CLERE, Catherine GRATAS et Carine ROSSE, qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse et de prendre part à ma soutenance.

Je souhaite ensuite adresser mes sincères remerciements au Docteur Julie GAVARD, ma directrice de Master 1, de Master 2 et, pour finir en beauté, de thèse. Pour commencer par le début : merci de m'avoir permis d'intégrer cette superbe équipe et de travailler à tes côtés. Merci pour ton temps, tes conseils et ton soutien. Ces années m'auront permis de découvrir et de construire mon âme de chercheuse, et sache que cette passion qui est la tienne pour la recherche est une réelle source de motivation au quotidien.

Je souhaite également te remercier de m'avoir permis de donner une teinte plus « pharmaco » à ce projet de recherche captivant, et d'avoir accepté de te lancer avec moi dans l'écriture et la soutenance de cette thèse d'exercice, qui nous prépare pour la deuxième.

Également, je remercie le Docteur BIDÈRE pour nos nombreux échanges qui sont à l'origine de plusieurs expériences et qui m'auront également permis de développer ma curiosité scientifique et d'aiguiser mon sens critique. Aussi Nicolas : un grand merci pour tous tes conseils, pour ta disponibilité et pour l'exemple que tu donnes de l'exercice d'une science exigeante mais passionnante et qui incite à toujours se dépasser.

Il est aussi important pour moi de remercier toute l'équipe enseignante de la Faculté de Pharmacie d'Angers. Ces 6 années d'études à vos côtés m'auront permis de me former et de m'initier à tous les domaines de la pharmacie, mais m'auront surtout permis de trouver ma voie professionnelle. Aussi et plus particulièrement, un grand merci à Monsieur LEGEAY, Madame SAVARY, Monsieur CLERE, Monsieur BASTIAT et Madame MARCHAIS pour votre disponibilité, votre écoute et vos précieux conseils qui m'ont donné goût à la recherche, jusqu'à en faire ma spécialité.

Évidemment, je remercie toute l'équipe SOAP dans laquelle j'évolue, humainement et professionnellement, depuis 4 ans. Merci Laura, Quentin, Tiphaine, Tanguy, Rosalie, Jane, Gwennan, Kilian, Laïs, Valeria, Marine, Yanis, Mehdi et Laetitia.

Tout particulièrement, merci Laura (aka Lolotte) pour tous ces chouettes moments passés ensemble et SURTOUT pour les rendez-vous de 18h dans le module 405, moments où la fatigue se faisait bien sentir et pendant lesquels on aura beaucoup, beaucoup, beaucoup ri. Justement, nous n'étions pas que toutes les deux : merci à Jane (aka JJ), très certainement le protagoniste principal de ces rendez-vous... Je tiens tout particulièrement à te remercier pour toutes les conversations que l'on aura eues, pour tous les moments que l'on a également partagés en dehors du laboratoire : tu es une superbe personne et une réelle source d'inspiration pour moi (et pas seulement parce que tu es mon porte-bonheur de WB). Rosa, ma Rosa, on en aura vécu des choses ensemble ! Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ton aide, ton écoute, tes conseils, nos rigolades, et j'en passe... Ma binôme de bureau, de vaisselle, de café, de soirée, je crois que tout est dit : merci d'être mon amie. Et puisqu'une sentinelle en cache une autre : un grand merci à Kilian (aka Kiki) pour tout une nouvelle fois. Merci d'avoir toujours cru en moi, pour tes conseils, nos nombreuses soirées et pauses à parler, et surtout merci pour ta bonne humeur qui aura illuminé un grand nombre de mes journées. Et dire que quand cette aventure a débuté j'étais ta stagiaire... Aujourd'hui, je soutiens ma première thèse et je pense que ce chemin parcouru n'aurait pas été le même sans ton soutien ! Enfin, un grand merci à mon coach LinkedIn et Canva : Mehdi. Merci d'être toujours aux petits soins et disponible, tu es une superbe rencontre !

Bien évidemment, je n'oublie pas les anciens : Mathilde (aka la grande perche) de laquelle je n'aurai pas réussi à me débarrasser même si sa thèse est terminée et qu'elle n'est plus sur Nantes, Maelle, Lise, Clément, Clotilde, Mathilde, Fiorella et Sara.

À tous, un grand merci pour les discussions scientifiques mais, de manière moins formelle, merci pour tout ce qu'il y a eu autour et qui a rendu ces 4 ans magiques : merci pour les fous rires, merci pour les remontages de moral, merci pour les afterworks, bref merci pour tout ! C'est avec vous que j'ai découvert le monde de la recherche et je peux vous dire que c'est une sacrée aventure que je suis fière et heureuse d'avoir pu la vivre à vos côtés.

Un immense merci à mes amis Mathias, Vincent, Tristan et Jean-Baptiste pour tous les superbes moments partagés ces dernières années et qui m'auront permis de me dire que j'ai des amis en or ! Et si je parle d'amis je ne peux pas oublier ma team ADP ! Alors un grand merci à Mathilde (je vous l'avais dit, elle est toujours là), Rosalie, Antony, Alice, Léa et Léo pour ces lundis soirs endiablés et toutes ces soirées qui m'auront permis de réaliser la chance que j'ai de vous avoir dans ma vie.

Je remercie également mon soutien technique, celle qui m'aura formé à Word ces dernières semaines : Romane. Plus sérieusement, merci pour ta patience, ta compréhension, ton aide et de m'avoir redonné le sourire plus d'une fois dans ce moment quelque peu stressant. J'espère que ces quelques mots te prouveront à quel point je suis heureuse de t'avoir dans ma vie.

Pour finir, je remercie tout particulièrement ma maman, mon papa, mon petit frère, ma petite sœur et ma copine Mona pour leur soutien inconditionnel durant toutes ces années. Ce chemin parcouru et cette thèse c'est aussi votre victoire, c'est aussi grâce à vous et à tout ce que vous avez toujours fait pour moi. Aussi, je n'aurais pas les mots pour vous remercier suffisamment alors gardez cela : je vous aime !

# Plan

**PAGE DE GARDE**

**REMERCIEMENTS**

**TABLE DES ILLUSTRATIONS**

**TABLE DES TABLEAUX**

**TABLE DES IMAGES**

**LISTE DES ABREVIATIONS**

**INTRODUCTION**

**1. Le Glioblastome (GB)**

- 1.1. Classification de l'OMS et Définition
- 1.2. Épidémiologie
- 1.3. Présentations : Cérébrale et Clinique
- 1.4. Facteurs de risque
- 1.5. Prise en charge Thérapeutique

**2. Les Cellules de type Souche du Glioblastome (GSC)**

- 2.1. Découverte et Définition
- 2.2. Propriétés
- 2.3. Hétérogénéité et Plasticité
  - 2.3.1. À l'échelle Moléculaire : Différents sous-types de la Classification de Verhaak
  - 2.3.2. À l'échelle Cellulaire : Plasticité et Classification de Nefitel

**3. La Paracaspase MALT1**

- 3.1. Présentation
- 3.2. MALT1 : Régulateur Bimodal de la Signalisation Immunitaire
  - 3.2.1. Voie canonique NF- $\kappa$ B
- 3.3. MALT1 en Pathologie
  - 3.3.1. MALT1 et Lymphomagenèse
  - 3.3.2. MALT1 et Maladies Auto-Immunes & Inflammatoires
  - 3.3.3. MALT1 et Tumeurs Solides
    - a) Immunité Tumorale
    - b) Carcinogenèse
    - c) Glioblastome
- 3.4. Inhibiteurs de MALT1

**4. La kinase CK1 $\alpha$**

- 4.1. Présentation
  - 4.1.1. Famille des Caséines Kinases
  - 4.1.2. Caséines Kinases 1
  - 4.1.3. CK1 $\alpha$  : Gène et protéine
  - 4.1.4. CK1 $\alpha$  : Une protéine ubiquitaire
- 4.2. CK1 $\alpha$  en Pathologie
  - 4.2.1. Implication dans Diverses Pathologies Non Cancéreuses
  - 4.2.2. Implications dans les Cancers
    - a) Mutations de CK1 $\alpha$  et Cancers
    - b) Surexpression de CK1 $\alpha$  et GB
- 4.3. Activateurs de CK1 $\alpha$
- 4.4. Inhibiteurs de CK1 $\alpha$
- 4.5. Glus moléculaires

**OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE : QUESTIONS ET HYPOTHESES**

**MATERIEL ET METHODES**

**1. Culture cellulaire**

**2. Traitement des cellules**

3. Transfection d'ARN interférant
4. Cytométrie en flux
5. Lysat protéique
6. Co-immunoprécipitation (co-IP)
7. Western-blot (WB)
8. Marquage cellulaire par immunofluorescence (IF)
9. Viabilité cellulaire
10. Test de Formation de Tumorosphères (TFA)
11. Analyses statistiques

## RESULTATS

1. Les Cellules de type Souche de Glioblastome (GSC) présentent une activité basale de MALT1
2. MALT1 opère au sein d'un complexe multiprotéique contenant la kinase CK1 $\alpha$
3. L'ARN interférence ciblant CK1 $\alpha$  réduit l'expansion des GSC
4. Efficacité limitée des glus moléculaires dérivées du lénalidomide dans les GSC
5. Optimisation de l'utilisation des nouvelles générations des glus moléculaires
6. Les nouvelles générations de glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$  bloquant l'expansion des GSC
7. CK1 $\alpha$  module l'abondance lysosomale

## DISCUSSION

8. Quelques pistes pour les mécanismes d'action de CK1 $\alpha$ 
  - 8.1. Existe-t-il un lien entre les deux complexes multiprotéiques CBM et LUBAC dans les GSC ?
  - 8.2. La protéine TRAF6 joue-t-elle un rôle de régulateur négatif sur l'activité protéolytique de MALT1 dans les GSC ?
9. Quel est le rôle de l'activité kinase de CK1 $\alpha$  ?
10. Quels sont les impacts fonctionnels de CK1 $\alpha$  dans l'expansion des GSC ?
11. Quel est l'impact sur les GSC de l'ajout du ciblage de CK1 $\alpha$  au protocole thérapeutique standard ?
  - 11.1. *In vitro*, existe-t-il une synergie entre les glus moléculaires, le TMZ et la radiothérapie ?
  - 11.2. *In vivo*, existe-t-il une synergie entre les glus moléculaires et le TMZ ?
12. Le phénotype observé lors de l'inhibition de CK1 $\alpha$  dans les GSC ne peut-il pas s'expliquer par la perturbation simultanée de plusieurs voies de signalisation ?

## BIBLIOGRAPHIE

## TABLE DES MATIERES

LE GUYON MARGAUX

## Table des illustrations

Figure 1 : Protocole de Stupp. ....	9
Figure 2 : Propriétés des GSC. ....	13
Figure 3 : Voie de signalisation de NF- $\kappa$ B.....	20
Figure 4 : Mode d'action d'une glu moléculaire ciblant CK1 $\alpha$ .....	33
Figure 5 : Les Cellules de type Souche de Glioblastome (GSC) présentent une activité basale de MALT1. ....	52
Figure 6 : MALT1 opère au sein d'un complexe multiprotéique contenant la kinase CK1 $\alpha$ .....	53
Figure 7 : L'ARN interférence ciblant CK1 $\alpha$ réduit l'expansion des GSC. ....	54
Figure 8 : Efficacité limitée des glus moléculaires dérivées du lénalidomide dans les GSC. ....	55
Figure 9 : Optimisation de l'utilisation des nouvelles générations de glus moléculaires.....	56
Figure 10 : Les nouvelles générations de glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$ réduisent l'expansion des GSC. ....	57
Figure 11 : CK1 $\alpha$ module l'abondance lysosomale. ....	58
Figure 12 : Schéma illustrant le rôle simplifié de CK1 $\alpha$ dans la voie de signalisation p53. ....	66
Figure 13 : Schéma illustrant le rôle simplifié de CK1 $\alpha$ dans la voie de signalisation mTOR. ....	67

## Table des tableaux

Tableau 1 : Caractérisation des différents sous-types moléculaires du GB. Adapté de (Verhaak et al. 2010) et (Q. Wang et al.2017). .....	14
Tableau 2 : Liste de tous les substrats connus de MALT1, leurs séquences clivées et leurs fonctions associées. 19	
Tableau 3 : Nom, mode d'action et limite des inhibiteurs de MALT1 les plus étudiés. ....	26
Tableau 4 : Résumé des rôles joués par les isoformes de CK1 $\alpha$ dans des pathologies cancéreuses et maladies neurodégénératives. ....	29
Tableau 5: Caractérisation des GSC. Adapté de Harford-Wright et al, 2017. ....	38
Tableau 6 : Composition et volumes pour 5 gradients de gels Tris Acétate 3%-15%. ....	41
Tableau 7 : Anticorps primaires (haut) et secondaires (bas) utilisés en WB. ....	42
Tableau 8 : Anticorps primaires (haut) et secondaires (bas) utilisés en IF. ....	43

## Table des images

Image 1 : Images de sphères de GSC6 et 9.....	39
---	----

## Liste des abréviations

AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor (Récepteur des Hydrocarbures Aromatiques)
AKT	Protein Kinase B (Protéine Kinase B)
ALCL	Anaplastic Large Cell Lymphoma (Lymphome Anaplasique à Grandes Cellules)
AML	Acute Myeloid Leukemia (Leucémie Myéloïde Aiguë)
APC	Antigen-Presenting Cells (Cellules Présentatrices d'Antigène) / Adenomatous Polyposis Coli (Gène Suppresseur de Tumeurs)
Aza	Azacitidine (Azacitidine, un médicament chimiothérapeutique)
BCL10	B-cell Lymphoma 10 (Lymphome B-Cellulaire 10)
BCR	B-cell Receptor (Récepteur des Cellules B)
BMM	Bone Marrow Microenvironment (Microenvironnement de la Moelle Osseuse)
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 (Protéine impliquée dans la régulation de la transcription)
Brd4	Bromodomain Containing 4 (Protéine impliquée dans la régulation de la transcription)
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T-Cells (Cellules T à Récepteur Antigénique Chimérique)
CBM	CARD11-BCL10-MALT1 Complex (Complexe CARD11-BCL10-MALT1, voie de signalisation)
CCL5	C-C Motif Chemokine Ligand 5 (Ligand de la chimiokine C-C Motif 5)
CCR7	C-C Chemokine Receptor Type 7 (Récepteur de la chimiokine de type C-C 7)
CD28	Cluster of Differentiation 28 (Cluster de Différenciation 28)
CD3	Cluster of Differentiation 3 (Cluster de Différenciation 3)
CD30	Cluster of Differentiation 30 (Cluster de Différenciation 30)
CD4	Cluster of Differentiation 4 (Cluster de Différenciation 4)
CD44	Cluster of Differentiation 44 (Cluster de Différenciation 44)
CD8	Cluster of Differentiation 8 (Cluster de Différenciation 8)
CDK6	Cyclin-Dependent Kinase 6 (Kinase Dépendante de la Cycline 6)
CFLAR	Cellular FLICE-Like Inhibitory Protein (Protéine Inhibitrice de FLICE-like Cellulaire)
CK1	Casein Kinase 1 (Kinase de la Caséine 1)
CLK	CDC-like Kinase (Kinases similaires à la CDC, régulant l'épissage de l'ARN)
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia (Leucémie Lymphocytaire Chronique)
CNS	Central Nervous System (Système Nerveux Central)
CNSL	Central Nervous System Lymphoma (Lymphome du Système Nerveux Central)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Répétitions Palindromiques Courtes Espacées de Manière Régulière)
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (Protéine Associée aux Lymphocytes T Cytotoxiques 4)
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (Ligand de la Chimiokine C-X-C Motif 12)
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (Récepteur de Chimiokine C-X-C Type 4)
CYLD	Cylindromatosis (Gène suppresseur de tumeur)
DNMT3A	DNA Methyltransferase 3 Alpha (Méthyltransférase de l'ADN 3 Alpha)
E2F	E2F Transcription Factor (Facteur de Transcription E2F)

EBV	Epstein-Barr Virus (Virus Epstein-Barr)
EC	Endothelial Cells (Cellules Endothéliales)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Récepteur du Facteur de Croissance Épidermique)
EZH2	Enhancer of Zeste 2 (Améliorateur de Zeste 2, régulateur de la chromatine)
FADD	Fas-Associated Death Domain (Domaine de Mort Associé au Fas)
FDA	Food and Drug Administration (Administration des Aliments et Médicaments)
FOXO1	Forkhead Box O1 (Facteur de Transcription de la Famille Forkhead O1)
GFI1	Growth Factor Independence 1 (Protéine impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire)
GLI1	GLI Family Zinc Finger 1 (Protéine de la famille GLI, impliquée dans la signalisation Hedgehog)
GSC	Glioblastoma Stem-like Cells (Cellules Souches de Glioblastome)
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (Kinase de la Glycogène Synthase 3 Beta)
H3K27me3	Histone H3 Lysine 27 Trimethylation (Triméthylation de la Lysine 27 de l'Histone H3)
HAT	Histone Acetyltransferase (Acétyltransférase d'Histone)
HDAC	Histone Deacetylase (Désacétylase d'Histone)
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha (Facteur Inducible par Hypoxie 1 Alpha)
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR (Antigène Leucocytaire Humain-DR)
HSC	Hematopoietic Stem Cells (Cellules Souches Hématopoïétiques)
IC-261	Casein Kinase 1 Inhibitor (Inhibiteur de la Kinase de la Caséine 1)
IC50	Half-Maximal Inhibitory Concentration (Concentration Inhibitrice à 50%)
IDH	Isocitrate Dehydrogenase (Isocitrate Déshydrogénase)
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1 (Isocitrate Déshydrogénase 1)
IKZF1	Ikaros Family Zinc Finger 1 (Protéine Oncogène Ikaros 1)
IKZF3	Ikaros Family Zinc Finger 3 (Protéine Oncogène Ikaros 3)
IKK	I $\kappa$ B Kinase (Kinase I $\kappa$ B)
IL-17	Interleukin-17 (Interleukine-17)
IL-2	Interleukin-2 (Interleukine-2)
IL-8	Interleukin-8 (Interleukine-8)
IMiDs	Immunomodulatory Drugs (Médicaments Immunomodulateurs)
LB	B Lymphocytes (Lymphocytes B)
LIC	Leukemia-Initiating Cells (Cellules Initiatrices de la Leucémie)
LPAR1	Lysophosphatidic Acid Receptor 1 (Récepteur à l'Acide Lysophosphatidique 1)
LRP6	Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6 (Protéine Apparentée au Récepteur des Lipoprotéines de Basse Densité 6)
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (Kinase à Répétitions Riches en Leucine 2)
LT	T Lymphocytes (Lymphocytes T)
MALT1	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Protein 1 (Protéine du Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses 1)
MDS	Myelodysplastic Syndrome (Syndrome MyéloDysplasique)
MGMT	O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (O6-Méthylguanine-DNA Méthyltransférase)
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin (Cible Mammifère de la Rapamycine)

MYC	Myelocytomatosis (Oncogène c-Myc)
NANOG	Nanog Homeobox (Facteur de Transcription des Cellules Souches)
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B (Facteur Nucléaire Kappa B)
NPC	Neural Progenitor Cells (Cellules Progénitrices Neuronales)
NSC	Neural Stem Cells (Cellules Souches Neuronales)
OLIG2	Oligodendrocyte Transcription Factor 2 (Facteur de Transcription des Oligodendrocytes 2)
p53	Tumor Protein p53 (Protéine Suppresseur de Tumeur p53)
PAR1	Protease-Activated Receptor 1 (Récepteur Activé par la Protéase 1)
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha (Récepteur du Facteur de Croissance Dérivé des Plaquettes Alpha)
PIK3CA/R1	Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha / Regulatory Subunit 1 (Sous-unités Catalytique et Régulatrice de la Phosphoinositide 3-Kinase)
PKC	Protein Kinase C (Protéine Kinase C)
POI	Protein of Interest (Protéine d'Intérêt)
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog (Suppresseur de Tumeur PTEN)
QKI	Quaking (Protéine de Régulation de l'Épissage et Stabilité de l'ARN)
RELB	RELB Proto-Oncogene (Protéine Impliquée dans la Signalisation NF-κB)
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1 (Protéine Régulant la Nécroptose)
RNAseq	RNA Sequencing (Séquençage de l'ARN)
SAR	Structure-Activity Relationship (Relation Structure-Activité)
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (Immunodéficience Combinée Sévère)
scRNAseq	Single-Cell RNA Sequencing (Séquençage de l'ARN à l'Échelle d'une Seule Cellule)
SEP	Multiple Sclerosis (Sclérose en Plaques)
Signalisation CBM	CBM Complex Signaling (Signalisation par le Complexe CBM)
SLC12A5	Solute Carrier Family 12 Member 5 (Transporteur Ionique Neuronal SLC12A5)
SNC	Central Nervous System (Système Nerveux Central)
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2 (Facteur de Transcription Sox2)
SQSTM1 (p62)	Sequestosome 1 (Protéine impliquée dans l'autophagie)
SS	Synovial Sarcoma (Sarcome Synovial)
SSTC-104 / SSTC3	Experimental Inhibitors (Inhibiteurs Expérimentaux SSTC)
SUP	Ubiquitin-Proteasome System (Système Ubiquitine-Protéasome)
SYT1	Synaptotagmin 1 (Protéine impliquée dans l'exocytose)
TCF4	Transcription Factor 4 (Facteur de Transcription 4)
TCGA	The Cancer Genome Atlas (Atlas du Génome du Cancer)
TCR	T-Cell Receptor (Récepteur des Lymphocytes T)
TG003	CLK Kinase Inhibitor (Inhibiteur des Kinases CLK)
TMZ	Temozolomide (Chimiothérapie utilisée dans le traitement du glioblastome)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha (Facteur de Nécrose Tumorale Alpha)
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor (Récepteur du TNF)
TNFR1/2	Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and 2 (Récepteurs du TNF 1 et 2)
TP53	Tumor Protein p53 (Protéine Suppresseur de Tumeur p53)

TPD	Targeted Protein Degradation (Dégradation Ciblée des Protéines)
TRADD	TNF Receptor-Associated Death Domain (Domaine de Mort Associé au Récepteur TNF)
TUBE	Tandem Ubiquitin-Binding Entities (Entité de Liaison à l'Ubiquitine en Tandem)
TTF	Tumor Treating Fields (Champs de Traitement des Tumeurs)
UPS	Ubiquitin-Proteasome System (Système Ubiquitine-Protéasome)
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A (Facteur de Croissance Endothélial Vasculaire A)
Wnt signal	Wnt Signaling Pathway (Voie de Signalisation Wnt)
Wnt/ $\beta$ -caténine	Wnt/ $\beta$ -catenin Pathway (Voie Wnt/ $\beta$ -caténine)
$\mu$ M	Micromolar (Micromolaire)

# Introduction

## 1. Le Glioblastome (GB)

### 1.1. Classification de l'OMS et Définition

Dans la cinquième édition de la classification des tumeurs du Système Nerveux Central (SNC) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le Glioblastome (GB) est défini comme une tumeur de grade 4 (1). Comparativement à l'édition précédente, sont désormais prises en compte des caractéristiques histologiques, génétiques et moléculaires, permettant une classification plus précise des tumeurs du SNC (1). Dans ce contexte, le diagnostic d'un GB est désormais posé sur un gliome diffus, astrocytaire, IDH-sauvage de l'adulte, présentant un cœur nécrotique ainsi qu'une prolifération microvasculaire. En l'absence de données histologiques, le diagnostic repose sur la mise en évidence d'au moins une des trois altérations génétiques suivantes : changements du nombre de copies chromosomiques +7/-10, mutation du promoteur TERT ou amplification du gène de l'EGFR (1).

### 1.2. Épidémiologie

Le Registre des Tumeurs Cérébrales Centrales des États-Unis (CBTRUS) a analysé l'incidence des tumeurs du SNC aux États-Unis, entre 2015 et 2019, en s'appuyant sur la classification de l'OMS datant de 2016. Le rapport statistique décrit le GB comme la plus fréquente (50,1% de toutes les tumeurs malignes, 3,26 pour 100 000 habitants des États-Unis) des tumeurs primaires malignes du SNC, affectant principalement les adultes âgés (âge médian de 65 ans au moment du diagnostic) et avec une occurrence plus fréquente chez les hommes que chez les femmes (1,6 fois plus fréquente). Toujours selon cette base de données américaine, la survie des patients atteints de glioblastome n'est que de 42,7% un an après le diagnostic, et chute à 6,9% cinq ans après le diagnostic, faisant du GB la plus agressive des tumeurs primaires du SNC chez l'adulte (2). Précisons que ces chiffres sont également ceux obtenus lors d'une étude française incluant tous les patients atteints d'un GB nouvellement diagnostiqué et confirmé histologiquement, entre 2008 et 2015 (3).

### 1.3. Présentations : Cérébrale et Clinique

Le GB peut se développer à partir de différentes régions du cerveau. Malgré cela, 95% des tumeurs émergent dans la région supratentorielle (située au-dessus du cervelet), les 5% restants se trouvant dans le tronc cérébral, la moelle épinière ou le cervelet (4).

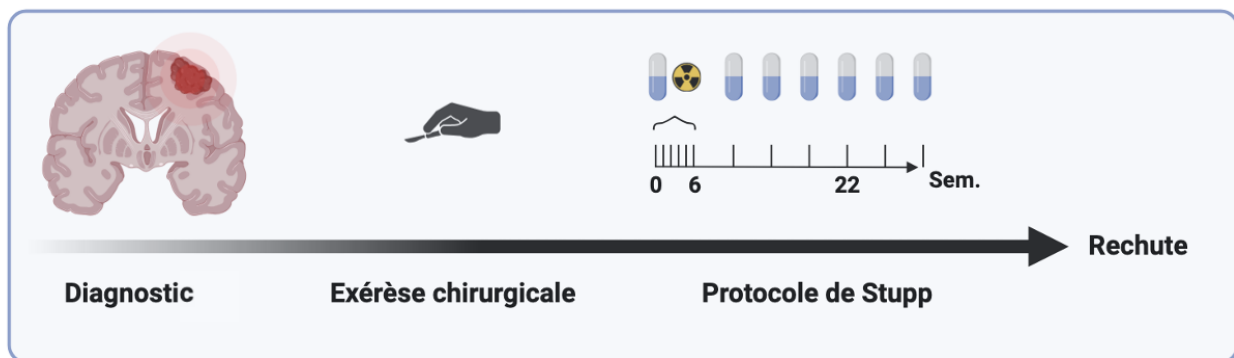
De plus, il s'agit d'un cancer se développant rapidement et affectant plusieurs fonctions primaires. La localisation de la tumeur détermine ainsi les symptômes. Troubles cognitifs, déficits neuronaux, problèmes auditifs et visuels sont classiquement associés aux tumeurs du lobe temporal, tandis que les changements de personnalité sont le signe d'une localisation au niveau du lobe frontal. La pression intracrânienne augmente également avec le volume tumoral, ce qui provoque des maux de tête unilatéraux et localisés, ainsi que des crises d'épilepsie (5).

## 1.4. Facteurs de risque

Bien que les causes précises du développement du GB soient encore débattues, peu de facteurs de risque sont associés à une augmentation de l'incidence de la maladie. Hormis l'âge et le sexe (2), le seul facteur de risque externe établi est l'exposition à de fortes doses de radiations ionisantes (6).

## 1.5. Prise en charge Thérapeutique

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de GB repose sur le protocole de Stupp. Ce dernier a été mis en place en 2005 et n'a que peu évolué depuis. Il consiste en une résection chirurgicale maximale, suivie de 6 semaines de séances concomitantes de radiothérapie (2 Gy 5 jours par semaine, soit 60 Gy au total) et chimiothérapie (prise orale quotidienne de 75mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle de TémOzolomide, TMZ), prolongées par 6 cycles de chimiothérapie adjuvante au TMZ (150 à 200mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle, pendant 5 jours tous les 28 jours)(7)(8)(Figure 1).



**Figure 1 : Protocole de Stupp.**

Les patients nouvellement diagnostiqués subissent une résection chirurgicale maximale, suivie de séances concomitantes de radiothérapie et chimiothérapie au TMZ, prolongées finalement par 6 cycles de chimiothérapie adjuvante au TMZ. Malgré ce protocole invasif, les rechutes sont systématiques.

Plus récemment, l'utilisation de champs électriques alternés (TTF, pour Tumor Treating Fields), en complément du protocole de Stupp, a été approuvée dans le traitement du GB. Il a notamment été démontré que l'utilisation continue de ce dispositif portable et non invasif augmentait de 3 mois la médiane de survie sans progression des patients traités par chimio-radiothérapie, doublant quasiment l'estimation initiale. De même, cela permet d'augmenter la médiane de survie globale de 16 mois, dans le groupe TMZ seul, à 20 mois et demi dans le groupe champs électriques + TMZ (9).

Hormis le protocole de Stupp, des essais cliniques ont été menés pour tenter d'améliorer la survie des patients. Notamment, les molécules anti-angiogéniques (tel que le bévacicumab, commercialisé sous le nom d'Avastin, un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur pro-angiogénique VEGF-A) étaient porteuses de beaucoup d'espoir puisque la croissance des tumeurs de GB repose fortement sur la néovascularisation tumorale, et que ces tumeurs sont physiquement liées à la vasculature : un critère histologique de diagnostic étant l'observation d'une prolifération microvasculaire. Cependant, les essais cliniques menés sur des formes

récurrentes et nouvellement diagnostiquées de GB ne montrent pas d'amélioration de la survie globale des patients (10)(11)(12). Un bénéfice a cependant été noté : le bévacizumab réduit les œdèmes des patients, leur permettant de diminuer, voire arrêter, la prise de corticostéroïdes, améliorant ainsi leur qualité de vie (13). Il faut cependant préciser que le taux d'effets indésirables était plus élevé chez les patients traités par l'anticorps monoclonal, comparé au groupe placebo (10)(11)(12). Malgré cela, le bévacizumab reste couramment utilisé dans la prise en charge palliative des GB récurrents.

Outre le développement majeur du protocole de Stupp en 2005, aucune autre option thérapeutique n'est actuellement disponible, soulignant la réelle nécessité d'implémenter l'arsenal thérapeutique de prise en charge. Localisation, hétérogénéité, propriétés invasives ou encore microenvironnement tumoral complexe sont autant de caractéristiques qui expliquent le réel challenge qu'est celui de traiter un GB (14). Notamment, la grande hétérogénéité phénotypique intra- et inter-tumorale des GB peut être expliquée, en partie, par l'existence d'une sous-population de cellules tumorales, plastiques et versatiles, aux propriétés souches, appelées Cellules de type Souche de Glioblastome (GSC). Cette sous-population est impliquée dans l'initiation et la progression tumorales, ainsi que dans la résistance aux traitements conventionnels de radio -et chimio-thérapies (14).

## 2. Les Cellules de type Souche du Glioblastome (GSC)

### 2.1. Découverte et Définition

Les Cellules Souches Cancéreuses (CSC) ont été originellement identifiées en 1994, dans la Leucémie Myéloïde Aiguë (AML), après l'injection de cellules d'AML humaines à des souris immunodéficientes (souris SCID). Ceci a mené à la découverte des Cellules Initiatrices de la Leucémie (LIC)(15). Par la suite, les propriétés des cellules souches, semblables à celles des Cellules Souches Hématopoïétiques (HSC) normales, ont été décrites. Notamment, ces cellules sont capables de proliférer, s'auto-renouveler et se différencier (16). Suite à cette découverte, l'hypothèse des CSC a été proposée, remettant en cause la stratégie thérapeutique de prise en charge du cancer. En effet, cette hypothèse suggère que l'hétérogénéité tumorale est liée aux propriétés souches des CSC, et que les traitements, s'ils ne peuvent atteindre ou cibler cette sous-population cellulaire, ne pourront guérir les patients car, *in fine*, ces CSC finiront par repeupler la masse tumorale (17)(18). Parallèlement, les CSC ont été associées au développement et à la récurrence de plusieurs autres cancers solides, tels que les cancers du sein et les cancers colorectaux (19).

L'identification de cellules souches cérébrales, capables de repeupler les populations de cellules neuronales, gliales et astrocytaires dans le cerveau adulte, a alimenté l'hypothèse que les CSC pouvaient également exister dans les cancers du cerveau (20)(21). Les découvertes fondamentales de Sheila Singh, du groupe de Peter Dirks, ont mis en évidence que les tumeurs cérébrales sont composées, en partie, de cellules positives pour le marqueur de surface cellulaire CD133 (prominine-1), capables de s'auto-renouveler et d'initier des tumeurs dans des modèles de souris immunodéficientes (22)(23). Ces cellules ont été appelées Cellules de type Souche de Glioblastome, ou GSC. Cette découverte a été confirmée par un autre groupe indépendant, confirmant les propriétés de ces cellules initiatrices de tumeurs (24).

La définition des GSC a ensuite été établie et repose sur une combinaison de caractéristiques fonctionnelles et moléculaires. Notamment, les GSC sont capables de s'auto-renouveler, de proliférer indéfiniment, d'initier des tumeurs mais aussi de se différencier dans plusieurs lignages cellulaires (**Figure 2**). De plus, elles expriment différents marqueurs de surface spécifiques, tels que CD133, CD15, CD44 (25) mais aussi SOX2 (26), OLIG2 (27), NANOG (28), ou NESTIN (29) qui sont des marqueurs principalement partagés avec les cellules souches neurales normales.

Dans la littérature, plusieurs termes sont utilisés pour désigner les GSC. Par exemple, cellules initiatrices de tumeurs cérébrales (BTIC, pour Brain Tumor Initiating Cells) ou cellules souches de tumeurs cérébrales. Le qualificatif « souche » est donc unanime, cependant l'origine de cette sous-population cellulaire fait toujours débat. En effet, une première hypothèse suggère que les GSC proviennent uniquement des Cellules Souches Neurales (NSC), alors qu'une deuxième hypothèse propose une dédifférenciation des astrocytes (30).

## 2.2. Propriétés

L'origine des GSC reste donc incertaine, cependant leur définition est établie et repose sur leurs propriétés souches, telle que leur multipotence et capacité d'auto-renouvellement (**Figure 2**).

Additionnellement, les GSC sont capables de repeupler la masse tumorale après un traitement ou une transplantation (**Figure 2**). En effet, il a été démontré que les GSC CD133 positives étaient capables d'induire une tumeur qui reproduit la tumeur d'origine, et ce même lorsqu'elles sont injectées à une très faible concentration (22).

Les GSC sont également impliquées dans la néovascularisation, formant un réseau dysfonctionnel et aberrant, caractéristique de l'angiogenèse tumorale (**Figure 2**). Effectivement, ces cellules aux propriétés souches peuvent sécréter du VEGF, un facteur pro-angiogénique qui favorise la migration des Cellules Endothéliales (CE) et la formation de tubes vasculaires(31)(32). De manière intéressante, la transdifférenciation potentielle des GSC cette fois-ci en péricytes a été démontré, aidant à la constitution de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur (33)(34).

Autre propriété essentielle des GSC : leur capacité à résister aux traitements standards actuels (**Figure 2**). La résection chirurgicale est le traitement de première ligne du GB, permettant une amélioration de la survie des patients, fonction de l'étendue de la résection (35). Cependant, et comme précédemment mentionné, les GSC sont très invasives et engagées dans des interactions étroites avec les cellules cérébrales saines, ce qui rend leur élimination complète par la chirurgie quasi impossible (25). Les GSC jouent donc un rôle majeur dans les rechutes du GB. Dans cette optique, plusieurs études utilisant des modèles *in vivo* ont défini les capacités migratoires et invasives des GSC. Notamment, l'implantation orthotopique de NSC transformées a révélé une importante invasion de ces cellules, des semaines avant le développement de la tumeur. Les cellules de GB ont notamment migré le long des vaisseaux sanguins et des fibres (36). En suivant les cellules vivantes *in vivo*, Frank Winkler a montré des interactions entre les vaisseaux sanguins et les cellules de GB, et a démontré que ces interactions favorisent la migration des cellules tumorales (37). De plus, en fonction des GSC, le mode migratoire

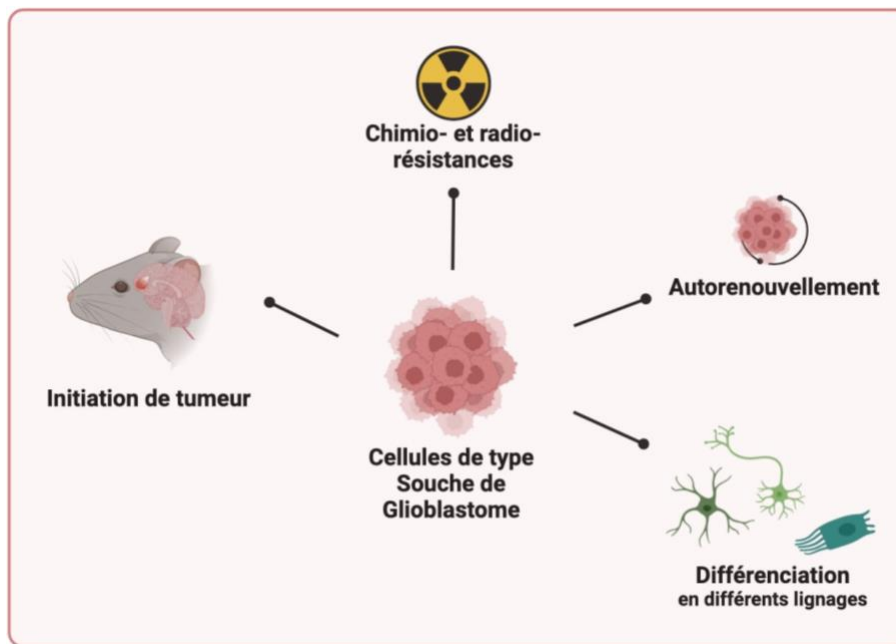
est différent, allant de la migration d'une cellule seule à la migration collective via des projections en forme de doigts (38). Toutes ces caractéristiques font des GSC des cellules hautement migratoires et infiltrantes.

Outre cette capacité à échapper à la résection chirurgicale, il a été démontré que les GSC résistent aux traitements chimio- et radio-thérapeutiques. En effet, une population résiduelle de cellules de GB humaines est capable de survivre après un traitement par des doses létales d'agent chimiothérapeutique BCNU (1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée). Il est intéressant de noter que ces cellules résistantes se sont révélées enrichies en GSC CD133 positives, capables de récapituler une tumeur lorsqu'elles sont injectées dans des modèles de souris (22). De plus, les GSC présentent une expression élevée de gènes anti-apoptotiques et d'effecteurs de la réparation de l'ADN, tels que *MGMT*, empêchant l'action thérapeutique d'alkylation de l'ADN par le TMZ (39). Un paramètre pronostic important à prendre en compte est donc le statut de méthylation du promoteur du gène *MGMT*. Effectivement, ce statut de méthylation est lié au niveau d'expression de l'enzyme, et corrélé à la probabilité de survie des patients atteints de GB. Ainsi, moins le promoteur du gène *MGMT* est méthylé, plus l'enzyme est exprimée dans les GSC, donc moins le TMZ est efficace, diminuant la probabilité de survie des patients (40).

De plus, le groupe de Luis Parada, qui développe des modèles de souris génétiquement modifiées, a démontré le potentiel élevé des GSC dans la récurrence après un traitement au TMZ. En effet, l'administration de TMZ a, dans un premier temps, stoppé la croissance de la tumeur avant que, dans un second temps, la rechute survienne, inévitablement. Cette dernière est causée par une population de GSC quiescentes et exprimant le marqueur Nestine. Il est intéressant de noter que l'éradication de cette sous-population de cellules a complètement stoppé la réapparition de la tumeur (41). Poursuivant sur cette idée, il a également été montré que les GSC sont quiescentes, qu'elles se divisent lentement et ne sont donc pas ciblées par les chimiothérapies, tel que le TMZ conventionnellement utilisé (42). Par conséquent, il a été proposé un modèle dans lequel un réservoir de GSC quiescentes, donc résistantes à la chimiothérapie, donne naissance à une sous-population de GSC hautement proliférantes et donc capables de régénérer la masse tumorale (41)(43).

La radiothérapie s'est également avérée inefficace pour éradiquer les GSC. C'est ce que montre l'étude pionnière, réalisée par le groupe de Jeremy Rich, avec une activation importante de la Réponse aux Dommages de l'ADN (DDR) dans les GSC en réponse aux radiations (44). Ces cellules souches sont ainsi plus résistantes aux rayonnements ionisants, comparativement à des cellules tumorales non-GSC (44).

Dans l'ensemble, ces différents travaux mettent en lumière les capacités adaptatives des GSC pour échapper et résister aux traitements standards actuels, et fournissent également la preuve de leur habilité à repeupler la masse tumorale, même si la chirurgie et les séances de radio -chimio -thérapies éliminent efficacement une partie importante de la tumeur. Il apparaît ainsi évident et urgent que de nouvelles thérapies ciblées soient développées pour éradiquer spécifiquement cette sous-population de cellules initiatrices et multi-résistantes.



**Figure 2 : Propriétés des GSC.**

Les GSC ont la capacité de s'auto-renouveler, d'initier des tumeurs *in vivo* et de proliférer. Elles sont également résistantes aux différents traitements standards et capables de multipotence.

## 2.3. Hétérogénéité et Plasticité

### 2.3.1. À l'échelle Moléculaire : Différents sous-types de la Classification de Verhaak

Verhaak et ses collègues ont publié en 2010 une étude pionnière établissant la classification moléculaire des tumeurs de GB (45). Reposant sur l'intégration *in silico* de données du TCGA (l'Atlas du Génome du Cancer) et sur un ensemble de données transcriptomiques indépendantes sur le GB, le groupe a défini quatre sous-types moléculaires distincts nommés proneural, neural, classique et mésenchymateux. Le paragraphe suivant fournit des informations relatives à l'annotation fonctionnelle des différents sous-types et à leur évolution (45).

Sous-type Proneural : Il est associé à des fréquences plus élevées d'altération PDGFRA, de mutations IDH1, TP53 et PIK3CA/R1, à une expression plus élevée de marqueurs oligodendrocytaires (tels que OLIG2), à une expression plus faible du suppresseur de tumeur p21, à un niveau plus élevé de gènes de développement proneural (tels que ASCL1 et TCF4). L'annotation génético-ontologique de ce sous-type moléculaire a révélé des signatures associées aux processus de prolifération et de cycle cellulaire (

**Tableau 1).**

Sous-type Classique : Il est caractérisé par une amplification du chromosome 7 et une perte du chromosome 10, une amplification et une mutation de l'EGFR (EGFRvIII), une délétion homozygote de CDKN2A, une forte expression du marqueur de cellules souches Nestine et des composants des voies de signalisation Notch et Sonic hedgehog (

**Tableau 1).**

Sous-type Mésoenchymateux : Il est défini par la délétion et l'expression réduite du gène suppresseur de tumeur NF1, les mutations PTEN, l'expression élevée de marqueurs mésoenchymateux et astrocytaires (tels que CHI3L1 et MERTK, respectivement), l'expression accrue des membres de la voie NF-  $\kappa$ B (pour Nuclear Factor-Kappa B) RELB et TRADD (

**Tableau 1).**

Sous-type Neural : Il exprime des marqueurs neuronaux (tels que NEFL, SYT1 et SLC12A5), associés *in silico* aux signatures de projection neuronale, d'axone et de transmission synaptique. Il est intéressant de noter que ce sous-type moléculaire était étroitement lié aux échantillons de tissus cérébraux sains analysés. Cependant, comme indiqué dans l'étude, les lames des tumeurs neurales contenaient peu de cellules normales (45).

Sept ans plus tard et profitant des avancées technologiques, le groupe de Verhaak réalise le séquençage d'ARN à l'échelle d'une seule cellule (scRNAseq) de 133 cellules de GB, extraites de trois tumeurs différentes (46). Cette analyse, couplée à celle réalisée par Anoop Patel (47), a permis de déterminer que le sous-type neural pouvait en effet être constitué de cellules neurales saines, provenant de la marge tumorale, et a donc été retiré de la classification des sous-types moléculaires (

**Tableau 1).** Cette hétérogénéité inter-tumorale sera confirmée, plus tard, par d'autres travaux récapitulant ces trois sous-types moléculaires différents (46).

**Tableau 1 : Caractérisation des différents sous-types moléculaires du GB. Adapté de (Verhaak et al. 2010) et (Q. Wang et al.2017).**

SOUS-TYPE MOLÉCULAIRE	PRONEURAL	CLASSIQUE	MÉSENCHYMATEUX
<b>FRÉQUENCES</b>	29%	39%	29%
<b>MUTATIONS</b>	PDGFRA IDH1 TP53 PIK3CA/R1	EGFRV8 CDKN2A	NF1 PTEN
<b>MOYENNE DE SURVIE (en mois)</b>	17,0	14,7	11,5

Additionnellement à l'établissement de cette classification moléculaire, l'étude a mis en évidence la forte hétérogénéité intra-tumorale du GB, déjà décrite par Patel et ses collègues trois ans auparavant (46)(47). En effet, les tumeurs de GB sont composées de l'ensemble de ces différents sous-types moléculaires, donc possèdent des programmes transcriptionnels variables, un spectre important d'états souches et de différenciation, et des capacités prolifératives irrégulières (47). Dans l'ensemble, cette étude a eu un impact considérable sur la compréhension de la biologie des GB en tant qu'entité hétérogène.

D'autres études se sont intéressées aux différences entre le cœur et la marge des tumeurs de GB. En effet, les marges sont souvent délaissées lors des interventions chirurgicales, contrairement au cœur de la tumeur. Par conséquent, la caractérisation des marges tumorales, éventuellement responsables des rechutes du GB, revêt une grande importance. En combinant des biopsies localisées à des analyses de séquençage de l'ARN, Brian Gill et ses collègues ont déchiffré les caractéristiques moléculaires des marges du GB. Ils ont notamment pu expliquer que l'infiltration importante de la microglie dans la marge des tumeurs mésoenchymateuses du GB était liée à un niveau élevé d'expression de gènes inflammatoires (48). Dans la continuité de ces résultats, un autre groupe a développé la culture *ex vivo* de tissus tumoraux provenant de zones différentes de la même tumeur de GB. Il est intéressant de noter que les échantillons cultivés récapitulaient la tumeur d'origine, et que les tissus de la marge tumorale étaient moléculairement différents de ceux du cœur de la tumeur. Notamment, les cellules localisées au niveau des marges conservaient leurs propriétés hautement invasives, alors que les cellules extraites du cœur de la tumeur résistaient fortement aux thérapies. Il a également été démontré dans cette étude que le sécrétome des cellules du cœur tumoral favorisait l'agressivité des cellules cancéreuses situées en périphérie de la tumeur (49).

En conclusion, le GB est caractérisé par une très grande hétérogénéité, allant de l'hétérogénéité inter-patient classique à l'hétérogénéité intra-tumorale plus complexe. Cette dernière se manifeste à toutes les échelles : de l'organisation spatiale de la tumeur aux cellules tumorales prises individuellement. Comprendre cette pluralité des tumeurs du GB est un défi complexe mais important, qui commence à être élucidé grâce aux progrès technologiques.

### **2.3.2. À l'échelle Cellulaire : Plasticité et Classification de Neftel**

La plasticité cellulaire est un vecteur majeur d'hétérogénéité intra-tumorale. Elle se définit comme la capacité des cellules à modifier leur phénotype sans survenue d'altérations génétiques, mais plutôt en réponse à des signaux environnementaux (50). D'après cette définition, le GB est une tumeur très plastique, et cela est expliqué, en partie, par l'importante contribution des GSC au développement des GB. Dans le cerveau normal, le processus de développement est pyramidal : des NSC donnent naissance à divers progéniteurs, eux-mêmes à l'origine de cellules totalement différenciées et effectrices. Dans le GB, cette hiérarchie pyramidale n'est pas maintenue puisqu'il y a un mélange hétérogène de cellules malignes, existant dans un continuum d'états transcriptionnels, et puisque les différences entre les GSC et les cellules différenciées sont relativement faibles (51).

La possible existence de ces cellules dans différents états, leurs réponses variables aux traitements, ainsi que leur capacité à adapter leur état transcriptionnel pour résister aux thérapies, sont autant de propriétés des GSC qui prouvent que le ciblage spécifique de cette sous-population cellulaire multirésistante est extrêmement complexe.

L'analyse scRNAseq de 28 tumeurs, concomitamment à des expériences de suivi de lignage, étude fondamentale de Cyril Neftel et de ses collègues, a révélé que les cellules de GB existaient dans 4 états cellulaires différents (Neftel et al. 2019). De manière intéressante, cette étude montre que ces 4 états cellulaires récapitulent

les différents sous-types moléculaires précédemment présentés, avec les progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC), les progéniteurs neuronaux (NPC), les astrocytes et les mésenchymateux, et qu'ils coexistent au sein d'une même tumeur. Les différentes altérations génétiques sont expliquées par la proportion importante d'un état cellulaire donné, avec l'altération de CDK4 associée à l'état NPC-like, celle de l'EGFR à l'état astrocyte-like, celle de PDGFRA à l'état OPC-like et celle de NF1 à l'état mésenchymateux-like. Finalement, le suivi des lignages cellulaires *in vivo* a démontré que la génération d'une tumeur, à partir de cellules appartenant à 1 état cellulaire donné, était capable de récapituler une tumeur composée des 4 états cellulaires. La tumeur extraite présentait même des similitudes avec la tumeur initiale, en termes de proportion des différents états cellulaires, ceci démontrant la grande plasticité des GSC, capables donc de passer d'un état cellulaire à un autre (52).

Ainsi, les GSC sont, depuis plusieurs années, le sujet d'étude de plusieurs équipes qui cherchent à déchiffrer les variations de comportements et de statuts transcriptionnels de ces cellules, tenues responsables de l'initiation et des rechutes dans le GB. Notamment, le groupe de Paul Rabadan a mis en évidence l'évolution clonale des GSC induite suite à un traitement (53). Les analyses génomiques et transcriptomiques longitudinales des tumeurs de 14 patients ont permis d'identifier que lors de la récurrence, plus de 60% des patients subissent un changement de sous-type. Également, et à l'aide d'un modèle mathématique, les auteurs ont montré que les cellules responsables de la récurrence étaient présentes dans la tumeur des années avant le diagnostic, et que ces cellules présentaient des gènes hyper-mutés et très exprimés (53). Les GSC sont ainsi très plastiques et capables d'une grande adaptabilité, en réponse, ou non, aux traitements.

Puisque les GSC participent au développement et à la récurrence du GB, et puisqu'elles résistent de manière évidente aux différents traitements utilisés en clinique, elles constituent aujourd'hui un axe de recherche essentiel dans la lutte contre cette tumeur cérébrale toujours incurable. En effet, l'éradication de cette sous-population cellulaire apparaît comme le point de départ d'un meilleur traitement des patients. Dans ce contexte, de nombreux groupes de recherche se sont attelés à identifier les points de vulnérabilité de ces cellules, dans le but de proposer de nouvelles options thérapeutiques.

L'une des voies de vulnérabilité des GSC réside dans le maintien de leur homéostasie lysosomale. Les lysosomes sont les principaux centres métaboliques, de signalisation et de dégradation des cellules (54). Dans les GSC, les lysosomes sont décrits comme participant au maintien de leurs propriétés souches et à leur survie (55)(56)(57). C'est dans ce contexte que notre groupe et d'autres ont établi un lien entre la déstabilisation des lysosomes et l'élimination spécifique des GSC, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de prise en charge qui reposeraient, notamment, sur des repositionnements thérapeutiques (56)(58).

## 3. La Paracaspase MALT1

### 3.1. Présentation

La protéine humaine MALT1 (pour Mucosa Associated Lymphoid Tissue Protein 1) a été identifiée pour la première fois en 1999 à partir d'une translocation chromosomique : t(11;18)(q21;q21), retrouvée dans les stades avancés de lymphomes MALT (59), qui est un lymphome non hodgkinien se développant dans les tissus

lymphoïdes associés aux muqueuses. Effectivement, dans ces lymphomes, le gène codant pour MALT1 : MLT (pour MALT1 Lymphoma-associated Translocation), apparaît fusionné avec le gène BIRC3/API2 (pour Baculoviral IAP Repeat-Containing protein 3), générant la protéine de fusion oncogénique API2-MALT1 (60). Un an plus tard, les travaux du groupe de Vishva Dixit ont permis d'approfondir les connaissances sur la partie C-terminale de cette protéine de fusion (61). En alignant les séquences des caspases humaines déjà connues (1, 2, 3, 8 et 9) avec celle de MALT1, les auteurs ont montré la présence d'un domaine de type caspase en C-terminale de la protéine MALT1 (caractérisé par la cystéine catalytique universellement conservée et la dyade d'histidine nécessaire à la catalyse). Cependant, l'analyse 3D du site catalytique a révélé des différences entre les caspases et MALT1, suggérant des potentielles variations dans la spécificité des substrats. Effectivement, les caspases clivent les résidus aspartates alors que MALT1 clive les résidus arginines. De plus, MALT1, contrairement aux caspases, possède un domaine de mort (DD, pour Death Domain) et trois domaines d'Immunoglobuline (Ig). Ainsi, ces travaux qualifie MALT1 de paracaspase (61). En plus de cette découverte majeure, l'étude met en évidence la liaison directe de MALT1 à BCL10 (pour B-cell Lymphoma/Leukemia 10), une protéine précédemment décrite dans la translocation chromosomique t(1;14)(p22;q32), présente dans de rares cas de lymphomes MALT (61). Enfin, ces travaux ont démontré que la protéine de fusion API2-MALT1 activait la voie NF- $\kappa$ B, et que cela était en partie dû à l'activité catalytique de la paracaspase. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'hyperactivité enzymatique de MALT1 contrôle la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, et est émis pour la première fois l'hypothèse que cette paracaspase aurait un double rôle d'échafaudage et de protéase (61).

En 2003, trois groupes indépendants ont rapporté que MALT1, avec CARMA1 (pour CAspase Recruitment Domain-containing protein 1, aussi appelé CARD11) et BCL10, régulait la voie NF- $\kappa$ B suite à une activation lymphocytaire (62)(63)(64). Dès lors, ce complexe multiprotéique de signalisation est appelé CBM, pour CARMA1-BCL10-MALT1.

À cette époque, et malgré une catégorisation de MALT1 comme paracaspase, la preuve de son activité catalytique faisait toujours défaut. Il faudra attendre près d'une décennie après sa découverte initiale pour montrer que MALT1, et la protéine de fusion API2-MALT1, ont une activité protéase, et sont donc capables de cliver des substrats protéiques grâce à leur domaine paracaspase (65)(66)(67). C'est ainsi que le site catalytique hypothétique de MALT1 a été défini. En effet, la substitution de la cystéine C464 de la paracaspase permet d'abolir son activité protéolytique (66)(67). La découverte des substrats de MALT1 s'est ensuite initiée, et à ce jour, 13 substrats ont été identifiés (

**Tableau 2**). La plupart d'entre eux sont impliqués dans le contrôle direct de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B ou dans la stabilité des ARNm (

**Tableau 2**)(68)(69).

La découverte et caractérisation de MALT1 a ainsi permis de mettre en évidence sa double fonction, de protéase et d'échafaudage moléculaire, jouant un rôle central dans la régulation de la voie NF- $\kappa$ B. L'implication dans cette voie signalisation cellulaire a rapidement été associée à la modulation de l'immunité adaptative, notamment par son rôle clé dans l'activation lymphocytaire. Cependant, au fil des recherches, il est apparu que le champ d'action de MALT1 ne se limitait pas au système immunitaire. Effectivement des études plus récentes

ont révélé son implication dans divers contextes physiopathologiques, notamment dans certains processus oncogéniques, justifiant l'intérêt porté à cette protéine dans ce projet.

### 3.2. MALT1 : Régulateur Bimodal de la Signalisation Immunitaire

Il est important de noter que MALT1 est protéolytiquement inactive dans des cellules non-activées et que son recrutement au complexe de signalisation CBM induit à la fois sa fonction catalytique et celle d'échafaudage (**Figure supplémentaire 1.e**). Ainsi, les dynamiques d'assemblage/désassemblage du complexe multiprotéique, en réponse à divers stimuli dans les cellules immunitaires et non immunitaires, assurent l'activation inductible et transitoire de MALT1, dans des conditions physiologiques (70)(68). Dépendamment du type cellulaire et du stimulus, différents membres de la famille CARD (CARD9, 10, 11 ou 14) sont activés, entraînant l'association et l'oligomérisation de dimères BCL10-MALT1, préalablement formés.

Le complexe CBM le mieux caractérisé est celui des lymphocytes, qui contient CARD11/CARMA1 et permet la transmission des signaux en provenance des récepteurs aux antigènes (TCR et BCR) et des cellules NK, vers les voies de signalisation en aval, dans le but d'établir des réponses immunitaires adaptatives. Également, et intéressement dans le contexte de ce travail, différents Récepteurs Couplés aux Protéines G (GPCR) (tels que AGTR1 et PAR1) ou Récepteurs Tyrosine Kinases (tel que l'EGFR), peuvent induire une activation cellulaire, ainsi qu'une réponse inflammatoire en provoquant l'assemblage du complexe CBM contenant CARMA3 (aussi appelé CARD10) dans plusieurs types de cellules cancéreuses non hématopoïétiques, dont le glioblastome (71)(72).

La double fonction de protéase et d'échafaudage de MALT1, est, comme précédemment mentionné, mieux comprise dans le contexte d'un CBM contenant CARD11, dont l'expression est largement limitée aux lymphocytes et aux cellules cancéreuses du lignage hématopoïétique (73). Ainsi, dans les lymphocytes T activés, la Protéine Kinase C (PKC) et la Caséine Kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) catalysent la phosphorylation de CARMA1/CARD11 (74), entraînant son oligomérisation qui permet, ensuite, le recrutement et la formation de filaments hélicoïdaux de BCL10 (75)(76). Dans ces filaments, chaque protéine BCL10 est associée à une protéine MALT1, via le DD situé en N-terminal de la paracaspase, et ce dimère est orienté de sorte à ce que l'extrémité C-terminale de MALT1 « dépasse » du filament hélicoïdal central (77). De cette façon, la région C-terminale de MALT1, codant pour les motifs de liaison à la protéine TRAF6 (nommés T6BM) et le domaine catalytique, sont accessibles pour se lier à d'autres protéines, subir des modifications post-traductionnelles et exercer son activité de protéolyse. Cette interface exposée est donc le lieu où MALT1 exerce sa fonction d'échafaudage moléculaire, qui s'illustre par son association à l'ubiquitine ligase TRAF6 qui, consécutivement, poly-ubiquitine MALT1. C'est sous cette forme poly-ubiquitinée que MALT1 recrute et active le complexe I $\kappa$ B Kinase (IKK), induisant la voie canonique NF- $\kappa$ B (**Figure 3**) (78)(79).

Parallèlement à cette liaison MALT1/TRAF6, les réarrangements conformationnels et la dimérisation induits permettent la reconnaissance et le clivage des substrats par le domaine paracaspase de MALT1 (80). Il est important de noter que la fonction enzymatique n'est pas nécessaire à celle d'échafaudage, et donc à l'activation, post-stimulation lymphocytaire, de la voie NF- $\kappa$ B. Le clivage des substrats participe plutôt à moduler la signalisation et les réponses immunitaires (81). Des approches de criblage *in silico* et de protéomique ont

permis de prédire qu'environ 30 substrats protéiques pourraient être clivés par MALT1 (69). Parmi ces substrats putatifs, le clivage d'environ 20 protéines a été confirmé par des test de clivage direct (69)(68)(

**Tableau 2).** Les mieux caractérisés sont ceux impliqués dans le contrôle de la signalisation lymphocytaire (tels que A20, CYLD, HOIL-1, BCL10 et l'auto-clivage de MALT1) et dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes (tels que RelB, Regnase-1 et Roquin-1/2) (68). Le clivage des substrats par MALT1 régule donc indirectement l'activation des lymphocytes T et B via le contrôle de l'expression de gènes aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Si l'inactivation génétique et pharmacologique a fourni des preuves irréfutables du rôle central de l'activité enzymatique de MALT1 dans l'activation et l'homéostasie immunitaires, les contributions individuelles des substrats à ces processus restent à caractériser.

**Tableau 2 : Liste de tous les substrats connus de MALT1, leurs séquences clivées et leurs fonctions associées.**

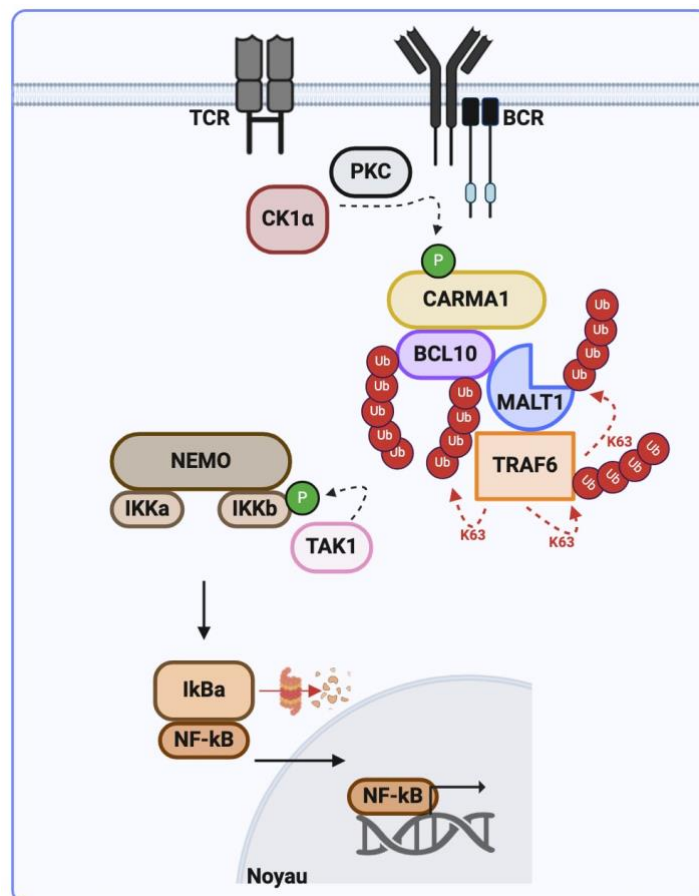
Légende : LT: Lymphocyte T, LB: Lymphocyte B, ARNm : Acide ribonucléique messenger.

SUBSTRAT	SÉQUENCE CLIVÉE	FONCTION
<b>BCL10</b>	LRSR <sub>228</sub> TVS	Adhésion LT
<b>Tensin-3</b>	LVSR <sub>614</sub> CPA	Inhibition adhésion LB
<b>A20</b>	GASR <sub>439</sub> GEA	Régulation positive NF-κB
<b>RelB</b>	LVSR <sub>85</sub> GAA	Régulation positive NF-κB
<b>MALT1</b>	LCCR <sub>149</sub> ATG	Régulation positive NF-κB
<b>MALT1</b>	HCSR <sub>781</sub> TPD (isoforme A) HCSR <sub>770</sub> TPD (isoforme B)	Régulation négative NF-κB
<b>HOIL1</b>	LQPR <sub>165</sub> GPL	Régulation NF-κB
<b>CYLD</b>	FMSR <sub>324</sub> GVG	Régulation positive JNK
<b>Regnase-1</b>	LVPR <sub>111</sub> GGG	Stabilité ARNm
<b>Roquin-1</b>	MVPR <sub>579</sub> GSQ	Stabilité ARNm
<b>Roquin-2</b>	LISR <sub>509</sub> STD	Stabilité ARNm
<b>N4BP1</b>	FVSR <sub>509</sub> GAS	Stabilisation ARNm & VIH1
<b>NIK</b>	CLSR <sub>325</sub> GAH	Signalisation NF-κB constitutive
<b>LIMA1</b>	PDSR <sub>206</sub> ASS	Lymphomagenèse LB
<b>LIMA1</b>	FKSK <sub>289</sub> GNY	Lymphomagenèse LB

### 3.2.1. Voie canonique NF- $\kappa$ B

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B régule des processus cellulaires majeurs tels que la survie, la prolifération, l'inflammation et l'angiogenèse. Ainsi, certains gènes cibles connus de ce facteur de transcription sont des molécules d'adhésion, des chimiokines, des cytokines et des régulateurs du cycle cellulaire (82). Plusieurs stimuli extracellulaires peuvent activer la voie NF- $\kappa$ B, mais seule celle médiée par le CBM sera abordée dans cette partie.

L'assemblage du complexe CBM est un événement indispensable à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Une fois assemblé, TRAF6 peut s'auto-ubiquitiner et ubiquitiner BCL10 et MALT1 (79), générant ainsi une plateforme pouvant recruter la protéine kinase TAK1. NEMO est une protéine membre du complexe IKK (avec IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ) qui reconnaît et se lie aux chaînes K63 d'ubiquitine apposées sur les différents membres du CBM. Elle assure ainsi la proximité entre le CBM et TAK1, favorisant la phosphorylation par TAK1 de IKK $\beta$  (à la sérine S177 et S181)(83). Les kinases du complexe IKK activées, phosphorylent I $\kappa$ B $\alpha$ , chargée de maintenir inactif dans le cytosol le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (P65 et P50). La phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (sur les sérines S32 et S36) permet sa reconnaissance par le complexe E3 ubiquitine ligase SCF  $\beta$ TrCP et donc sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (SUP)(84). Ainsi, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est libre d'entrer dans le noyau et d'induire la transcription de ses gènes cibles (85)(**Figure 3**).



**Figure 3 : Voie de signalisation de NF- $\kappa$ B.**

Dans les lymphocytes activés, la Protéine Kinase C (PKC) et la Caséine Kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) phosphorylent CARMA1, entraînant le recrutement du dimère BCL10-MALT1. Une fois le CBM assemblé, TRAF6 peut s'auto-ubiquitiner et ubiquitiner BCL10 et MALT1, générant une plateforme qui peut recruter la kinase TAK1 et la protéine NEMO (membre

du complexe IKK avec IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ). La proximité entre le CBM et TAK1, favorise la phosphorylation de IKK $\beta$  par TAK1. Une fois activées, les kinases du complexe IKK, phosphorylent IkB $\alpha$ , l'envoyant au protéasome pour être dégradé. Ainsi, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est libre et peut transloquer dans le noyau où il induit la transcription de ses gènes cibles.

### 3.3. MALT1 en Pathologie

#### 3.3.1. MALT1 et Lymphomagenèse

La caractérisation génétique des lymphomes MALT a permis d'identifier des translocations chromosomiques récurrentes associées au développement de cette maladie. Parmi elles, les plus fréquentes sont associées à une transcription ou à une activité exacerbée des composants du CBM. Notamment, les translocations t(1;14)(p22;q32) et t(14;18)(q32;q21), présentes respectivement dans 1 à 2 % et 15 à 20 % des lymphomes MALT, sont associées à une translocation de BCL10 ou MALT1 qui est responsable de l'augmentation de leur transcription. Également, et comme précédemment mentionné, la translocation chromosomique t(11;18)(q21;q21) induit la génération de la protéine de fusion API2-MALT1, responsable de l'activité constitutive de MALT1 (86). Par conséquent, les lymphomes MALT se caractérisent par une activité constitutive de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B induite par l'hyperactivité de MALT1, comme en témoigne le clivage des substrats spécifiques de la protéine de fusion : LIMA1 et NIK, eux-mêmes impliqués dans la pathogenèse de la maladie (87)(88)(

#### **Tableau 2).**

Les Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B (DLBCL) sont la forme la plus courante de lymphomes non hodgkiniens et la tumeur maligne lymphoïde la plus fréquente chez les adultes, dans le monde. Ce cancer se développe à partir de lymphomes de bas grade préexistants, tels que le lymphome MALT, ou via des mutations oncogéniques dans les lymphocytes B (89)(90). Les DLBCL sont divisés en deux sous-types principaux, en fonction de leur cellule d'origine : soit les Centres Germinatifs de type B (GCB), soit les Cellules B Activées (ABC). Le sous-type ABC, moins fréquent que le sous-type GCB (35% VS 50% du total des DLBCL diagnostiqués, respectivement), est cependant corrélé à une évolution plus défavorable des patients. Notons que ce sous-type de lymphome ABC DLBCL est caractérisé par une activation chronique de la voie NF- $\kappa$ B (91). Plusieurs mutations le long de la voie sont d'ailleurs décrites. Il s'agit notamment de mutations activatrices du BCR (20 % des cas) et de CARMA1 (10 % des cas), ainsi que de mutations inactivatrices du régulateur négatif de NF- $\kappa$ B, et substrat de MALT1, A20 (20 % des cas) (92).

De plus en plus de travaux décrivent le concept d'Addiction Non-Oncogénique (NOA) dans le cancer. Bien qu'ils ne soient ni mutés ni impliqués dans l'initiation de la tumorigenèse, les gènes NOA sont essentiels à la progression du processus tumoral (93). Ainsi, les protéines traduites à partir de ces gènes sont piratées au profit de la survie des cellules tumorales, leur ciblage constitue donc une voie de vulnérabilité. Parmi les gènes et voies NOA rapportés (94), CK1 $\alpha$  pourrait présenter un intérêt particulier dans le GB. En effet, et comme précédemment mentionné, le complexe multiprotéique CBM sert d'adaptateur dans l'activation des kinases IKK permettant l'induction de la voie NF- $\kappa$ B, suite à un engagement des récepteurs antigéniques. Il a notamment été montré que CK1 $\alpha$  se lie directement et dynamiquement au CBM, entraînant l'activation de cette voie en réponse à la stimulation du TCR des lymphocytes normaux. Ceci repose essentiellement sur l'association de BCL10 phosphorylé

et de MALT1 ubiquitiné à CK1 $\alpha$ . Notons cependant que la phosphorylation de CARMA1 (en position S608) par cette kinase impacte négativement sa capacité à activer la voie NF- $\kappa$ B. De plus, les cellules de lymphome ABC DLBCL dépendent de CK1 $\alpha$  pour maintenir une signalisation NF- $\kappa$ B constitutive, nécessaire à leur survie (74)(95).

### 3.3.2. MALT1 et Maladies Auto-Immunes & Inflammatoires

La voie NF- $\kappa$ B est centrale à la réponse immunitaire adaptative. Il est ainsi logique qu'une dérégulation de cette voie pro-inflammatoire conduise au développement de maladies auto-immunes et inflammatoires (96).

La Sclérose En Plaques (SEP) est une maladie auto-immune définie par une inflammation chronique du SNC (97). Le modèle animal de l'Encéphalomyélite Allergique Expérimentale (EAE) est celui généralement utilisé pour étudier les effets *in vivo* de la SEP, les deux maladies ayant des similitudes pathologiques (98). L'EAE se caractérise notamment par une différenciation des LT CD4 + en cellules effectrices Th17, qui produisent des niveaux importants d'IL17 pro-inflammatoire dans le SNC. Intéressamment, le CBM, et plus particulièrement MALT1, semble important dans la pathogenèse de l'EAE. En effet, les cellules effectrices Th17 MALT1-KO infiltrent normalement le SNC mais ne sont pas pathogènes, produisant ainsi un niveau réduit d'IL17 puisque la signalisation NF- $\kappa$ B est régulée (99). Le traitement par l'inhibiteur de MALT1 mépazine a d'ailleurs révélé une diminution de l'EAE dans un modèle de souris (100).

Il est intéressant de noter que les souris invalidées génétiquement pour MALT1 (MALT1-KO), donc n'exprimant plus la protéine, ne présentent pas le même phénotype que celles exprimant une protéine MALT1 sans capacité protéolytique (MALT1-PD pour Protease-Dead). Effectivement, l'activation lymphocytaire est fortement déficiente dans les souris MALT1-KO, leur conférant une protection contre le développement de maladies auto-immunes. C'est d'ailleurs ce phénotype qui est observé chez les patients déficients pour la protéine MALT1 : une forte immunodéficience expliquée par l'incapacité des lymphocytes à activer la voie NF- $\kappa$ B suite à une infection (101). Additionnellement à cela, et de manière surprenante, les souris MALT1-PD ont développé des gastrites auto-immunes et des inflammations dans plusieurs organes, conséquences d'un nombre élevé de LT activés et d'un nombre réduit de LT régulateurs (102). À contrario, impacter la fonction d'échafaudage de MALT1 conduit à une protéolyse constitutive, faisant suite à la perte de TRAF6, induisant une inflammation mortelle dans des modèles de souris (78).

Cette divergence phénotypique observée *in vivo* plaide en faveur de fonctions spécifiques et distinctes des deux activités de protéase et d'échafaudage de MALT1 (81).

### 3.3.3. MALT1 et Tumeurs Solides

#### a) Immunité Tumorale

Le complexe CBM joue donc un rôle important dans les réponses immunitaires et la régulation des LT régulateurs, en aval de la signalisation du TCR. Ainsi, plusieurs groupes se sont intéressés au rôle potentiel du CBM dans les réponses immunitaires antitumorales.

Les LT régulateurs, dont l'activation dépend de MALT1, régulent négativement l'immunité antitumorale, permettant ainsi le maintien de l'homéostasie immunitaire (103). Le groupe de Jürgen Ruland a démontré que l'activité protéolytique de MALT1 médiait la fonction suppressive des LT régulateurs. Ainsi, abroger *in vitro* l'expression de BCL10 ou de MALT1 diminue fortement l'expression de CTLA4 (pour Cytotoxic T-Lymphocyte

proteïn 4), protéine inhibitrice exprimée à la surface des lymphocytes T activés et freinant leur activation. Inhiber MALT1 *in vivo* diminue également le phénotype immunosuppresseur de ces lymphocytes régulateurs. Cette immunosuppression est d'ailleurs observée dans le mélanome, type de cancer pour lequel le traitement de souris par l'inhibiteur de MALT1 mépazine, ou l'inactivation génétique de BCL10 dans des LT régulateurs, conduit à une meilleure réponse immunitaire et une diminution du volume tumoral.

Dans l'ensemble, ces travaux ont permis de démontrer que, dans les LT régulateurs, MALT1 est responsable de la genèse d'un environnement tumoral immunosuppresseur (104).

## **b) Carcinogénèse**

L'expression et l'activité catalytique de MALT1, ainsi que du CBM, ont également été décrites comme impliquées dans la prolifération, la croissance et la survie des cellules cancéreuses de tumeurs solides. Par exemple, plusieurs travaux ont établi un lien entre MALT1 et l'agressivité du cancer du sein. La tyrosine kinase HER2/Neu (récepteur tyrosine-protéine kinase erbB-2) est surexprimée dans un grand nombre de cancers du sein et est associée à un mauvais pronostic. Une étude révèle le rôle central de CARMA3 dans l'axe HER2/NF- $\kappa$ B. Dans ce sens, le croisement génétique de souris MALT1-KO avec des souris développant spontanément des cancers du sein surexprimant HER2 a montré une progression retardée de la maladie (105).

Cette activation du complexe CBM a également été observée dans des cellules de cancer du sein surexprimant AGTR1 (récepteur de l'angiotensine II de type 1). Ce récepteur est déjà décrit comme lié à la voie NF- $\kappa$ B, via le CBM, puisque l'abrogation de l'expression de l'un des trois composants du complexe réduit la prolifération *in vitro* de ces cellules (106). En outre, l'activation de MALT1 induit la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (EMT) des cellules tumorales mammaires surexprimant ce récepteur AGTR1. Des travaux ont ainsi montré que l'inhibition de MALT1, par une abolition de son expression ou un traitement par la mépazine, contraind efficacement l'induction de cette transition et réduisait la progression du cancer du sein *in vivo* (107). Également, il a été démontré que le GPCR PAR1 (Récepteur Activé par la Protéase 1) de la thrombine pouvait médier l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'intermédiaire du CBM. Dans cette signalisation, l'activation catalytique de MALT1 conduit à l'expression de gènes pro-oncogéniques, tels que l'IL-8 et des métalloprotéinases, dans des modèles de cancer du sein et d'ostéosarcome. Intéressamment, le traitement de ces cellules par des inhibiteurs de l'activité protéolytique de MALT1 : MI-2 et z-VRPR-fmk, a fortement diminué l'expression de ces gènes *in vitro*, et l'abolition de l'expression de MALT1 a considérablement impacté le développement des métastases *in vivo* (108).

Les cellules de cancer de l'ovaire dépendent également du CBM pour survivre. Une étude a effectivement montré que MALT1 pouvait être activée par le Récepteur de l'Acide LysoPhosphatidique LPAR1 (récepteur de l'acide lysophosphatidique 1) et régulaït l'invasion ainsi que la migration des cellules de cancer de l'ovaire (109)(110,111).

Dans le modèle cellulaire HCC827 de cancer du poumon, la stimulation du récepteur EGFR a conduit à l'activation du CBM. Deux études montrent, dans ce modèle, le rôle de MALT1 dans la survie et prolifération des cellules HCC827 (112)(113). Cependant, si de la fonction protéolytique ou d'échafaudage de MALT1 est responsable de cette signalisation oncogénique est une question encore débattue.

De plus, l'inhibition de MALT1 a été envisagée dans le cadre du traitement du cancer du pancréas. Effectivement, MALT1 est fréquemment retrouvée surexprimée dans ces tissus cancéreux, alors que dans des

tissus sains son expression n'est pas détectable. Ainsi, le traitement par la mépazine a induit la mort de ces cellules cancéreuses, justifiée par une nette réduction de l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (114). Cette même observation est faite dans un modèle de carcinome hépatocellulaire pour lequel le traitement par MI-2 a fortement impacté la croissance des lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire SNU449 et Mahlavu (115).

### c) Glioblastome

Le GB pourrait également dépendre de l'expression et de l'activité de MALT1 pour sa croissance. En effet, dans des lignées de cellules de GB humaines U87 et U251, la voie NF- $\kappa$ B est activée en aval du CBM et suite à une stimulation de l'EGFR. La voie NF- $\kappa$ B étant centrale dans la tumorigenèse des GB, l'inhibition de MALT1 par MI-2 et l'abolition de son expression ont entraîné la mort de ces cellules *in vitro* et *in vivo* (116). La même année, notre groupe a révélé la dépendance des GSC à l'activité protéolytique constitutive de MALT1. Effectivement, l'analyse *in silico* d'échantillons de GB (provenant du TCGA, l'Atlas du Génome du Cancer) a montré une forte corrélation entre l'expression élevée de MALT1 et la diminution de la survie des patients atteints de GB. De plus, l'expression de la paracaspase était significativement plus élevée dans les échantillons de GB que dans les échantillons de tissus sains.

Intéressamment, les travaux de Peter Lucas et son équipe mettent en lumière un rôle clé de MALT1 dans le microenvironnement du GB. Effectivement, les auteurs ont montré que les cellules tumorales induisaient la signalisation MALT1 - NF- $\kappa$ B dans les macrophages associés au GB, et que cela conduisait à leur migration et à leur polarisation vers un phénotype immunosuppresseur, M2. Ainsi, l'inactivation de la protéase MALT1 dans ces macrophages a favorisé leur reprogrammation transcriptionnelle, ce qui a réduit leur migration et rétablit un phénotype macrophagique de type M1. De plus, l'ajout d'un inhibiteur de MALT1 au TMZ a réduit l'immunosuppression présente dans le microenvironnement tumoral, offrant ainsi une potentialité d'améliorer l'efficacité de ce traitement chimio-thérapeutique standard.

Additionnellement, les GSC présentaient une activité protéolytique constitutive de MALT1, appréciable par le clivage de plusieurs de ses substrats (tels que CYLD et Roquin-1 et -2). Cependant, les raisons et causes de l'activation constitutive de MALT1 dans les GSC ne sont pas claires et devront faire l'objet d'une étude plus approfondie. Loin de sa fonction dans la voie NF- $\kappa$ B, l'activité enzymatique de MALT1 s'est montrée essentielle à la survie des GSC. Cet effet fonctionnel s'explique par sa liaison à la protéine de liaison à l'ARN QKI, modulateur connu de l'homéostasie lysosomale. En effet, l'inhibition de MALT1 a conduit à la libération de QKI, favorisant la biogenèse de nombreux lysosomes dysfonctionnels, induisant l'inhibition de mTOR et provoquant un phénomène de mort des GSC dépendante des lysosomes. Enfin, l'inhibition de MALT1 par la mépazine a considérablement impacté la croissance des GSC *in vivo* (56). Ainsi, MALT1 apparaît ainsi comme une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers dont la survie dépend de son activité catalytique.

## 3.4. Inhibiteurs de MALT1

Le fait que MALT1 soit l'unique membre de la famille des protéases à cystéine chez les mammifères rend son ciblage pharmacologique très intéressant, notamment en termes de spécificité. Les opportunités, mais aussi

les défis de son ciblage reposent sur sa double fonction d'échafaudage et de protéase. De plus, et comme précédemment mentionné, son activité protéolytique est particulièrement importante dans l'activation des lymphocytes via la voie NF- $\kappa$ B, mais aussi dans la lymphomagenèse et l'expansion des tumeurs solides. Ainsi, le développement d'inhibiteurs puissants et sélectifs de MALT1 a suscité un grand intérêt scientifique et médical **(Tableau 3)**.

z-VRPR-fmk est le premier inhibiteur de MALT1. Il s'agit d'un térapeptide (Val-Arg-Pro-Arg-fluorométhylcétone) conçu à partir de la séquence clivée optimale d'AtmC9, un substrat de la métacaspase d'*Arabidopsis thaliana*, ayant des caractéristiques catalytiques communes avec la paracaspase MALT1. Lors de son développement, son efficacité à inhiber le clivage de BCL10 par MALT1 et à activer la voie NF- $\kappa$ B, suite à l'engagement du TCR, a été démontrée (66). Comme indiqué précédemment, l'activité de MALT1 est essentielle à la survie des cellules de lymphome DLBCL, qui sont caractérisées par une signalisation NF- $\kappa$ B continuellement activée. Si inhiber le facteur de transcription pléiotrope NF- $\kappa$ B apparaît comme une potentielle stratégie thérapeutique, le ciblage direct de l'activité enzymatique aberrante de MALT1 semble plus pertinent. C'est dans ce contexte que deux groupes ont découvert la forte sensibilité des cellules DLBCL au traitement par z-VRPR-fmk. Effectivement, l'inhibition catalytique de MALT1 a conduit à l'inactivation de la voie NF- $\kappa$ B (117). Malheureusement, la génération d'un métabolite hautement toxique *in vivo* a empêché son utilisation chez l'animal et l'homme (118)**(Tableau 3)**.

Suite à cela, le groupe d'Ari Melnick a mis au point un inhibiteur irréversible de la paracaspase : le MI-2 (119). La caractérisation approfondie du composé a démontré sa liaison préférentielle au site catalytique de MALT1, ainsi que la nécessité d'un groupe chlorométhylamide pour une inhibition enzymatique irréversible. Le traitement des cellules de lymphome DLBCL par MI-2 a montré une nette réduction du clivage des substrats de MALT1, de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ainsi que de la viabilité de ces cellules. Intéressamment, le MI-2 n'est pas toxique pour les modèles murins et diminue fortement la croissance des cellules DLBCL xéno greffées (119). Cependant, son efficacité, y compris *in vitro*, fait encore débat.

La même année, deux groupes indépendants ont identifié que la classe chimique des phénothiazines inhibait puissamment et sélectivement MALT1 (120)(121). Comme pour les autres inhibiteurs, les phénothiazines ont montré une forte inhibition de l'activité catalytique de MALT1 et de la voie NF- $\kappa$ B, dans des lymphocytes T activés, entraînant une réduction significative de la croissance des cellules de lymphome DLBCL (120). Des analyses structurales ont révélé que les phénothiazines sont des inhibiteurs allostériques non compétitifs de la paracaspase (121). Précisons que les phénothiazines étaient alors déjà utilisées en clinique comme antipsychotiques ou sédatifs. Ainsi, toutes les études de toxicités avaient déjà été réalisées et étaient disponibles au moment de la découverte de leur potentiel à devenir des inhibiteurs de MALT1, laissant entrevoir la possibilité d'un repositionnement thérapeutique. C'est notamment le cas de la mepazine, précédemment utilisée pour le traitement de l'anxiété, de la dépression et de la schizophrénie (122)(123)(124). Malgré la connaissance des effets secondaires associés à ce traitement (123), la mepazine a été utilisée en recherche comme potentiel agent anticancéreux. Notamment, l'énantiomère (S) a montré des résultats prometteurs dans des études *in vivo* de différents cancers murins, et *in vitro* de sphéroïdes tumoraux dérivés de patients. En effet, tumeurs syngéniques et organoïdes ont été clairement affectés par l'administration de mepazine (121).

Cet effet antitumoral a également été démontré dans le GB par notre groupe, où le ciblage de MALT1 par les phénothiazines, notamment la mépazine, a engendré une mort cellulaire lysosomale des GSC *in vitro* et dans un modèle de xénogreffe de GSC dérivées de patients (56).

Plus récemment, MLT-747 et -748, deux nouveaux inhibiteurs allostériques réversibles de MALT1, ont été identifiés (125). Leur efficacité pour inhiber l'activité protéolytique de MALT1 a conduit au développement d'une nouvelle génération de composés plus stables métaboliquement : les MLT-943 et MLT-985. Des études *in vivo* montrent une inhibition quasi-complète de l'activité enzymatique dans différents modèles précliniques, y compris celui de lymphome MALT (125).

Enfin, le JNJ-67856633, puissant inhibiteur allostérique réversible de MALT1, a été synthétisé après un criblage à haut débit et plusieurs étapes d'optimisation (126). Des essais cliniques, notamment dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens, sont actuellement conduits avec ce composé.

**Tableau 3 : Nom, mode d'action et limite des inhibiteurs de MALT1 les plus étudiés.**

INHIBITEUR	MODE D'ACTION	LIMITE
<b>z-VRPR-fmk</b>	Inhibition par liaison à la poche catalytique	Toxicité <i>in vivo</i>
<b>MI-2</b>	Inhibition par liaison à la poche catalytique	
<b>Phénothiazines</b>	Inhibition allostérique	Effets secondaires
	Blocage de MALT1 en conformation inactive (liaison à E397)	Inhibition réversible
<b>MLT-748</b>	Inhibition allostérique	Inhibition
<b>MLT-985</b>	Blocage de MALT1 en conformation inactive (liaison à E397)	réversible
<b>JNJ-67856633</b>	Inhibition allostérique	Inhibition
	Blocage de MALT1 en conformation inactive (liaison à E397)	réversible

Dans l'ensemble, il a fallu plus de vingt-cinq ans pour découvrir le gène de la paracaspase MALT1, sa double fonction protéase-échafaudage, son implication dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, mais aussi son rôle critique (avec ses différents partenaires protéiques) dans la lymphomagenèse et les maladies inflammatoires, ainsi que pour mettre au point des inhibiteurs puissants et sélectifs. En tant que régulateur central de la voie NF- $\kappa$ B, MALT1 est au cœur de nombreuses études visant à élucider son implication dans les tumeurs solides, telles que le glioblastome. Si le développement d'inhibiteurs de sa fonction catalytique semble prometteur, notamment en cancérologie, cela ne prévient pas d'une potentielle implication de sa fonction d'échafaudage. Ainsi, le ciblage d'un régulateur de MALT1 apparaît comme intéressant. Un candidat potentiel est la kinase CK1 $\alpha$ , orchestrant l'assemblage du complexe CBM, dont MALT1 fait partie, et protéine essentielle à la survie des cellules de lymphome DLBCL (74).

## 4. La kinase CK1 $\alpha$

### 4.1. Présentation

#### 4.1.1. Famille des Caséines Kinases

Le terme « caséine kinase » est largement employé depuis des décennies pour désigner les protéines kinases ayant la capacité de phosphoryler la caséine *in vitro*. Celles-ci se répartissent en trois classes principales. Les deux premières classes, rebaptisées par la suite protéines kinases CK1 (pour Caséine Kinase 1) et CK2, sont des membres pléiotropes du kinome qui ne sont fonctionnellement pas liés à la caséine. La troisième classe, appelée G-CK (pour Golgi-Casein Kinase), est, elle, responsable de la phosphorylation de la caséine dans l'appareil de Golgi des glandes mammaires en lactation.

Notons que les Caséines Kinases, bien que représentant une proportion minimale de l'ensemble du kinome, semblent être responsables de la génération de 40 à 50 % des phospho-sites non redondants actuellement répertoriés dans les bases de données des phospho-peptides humains (127).

#### 4.1.2. Caséines Kinases 1

Les Caséines Kinases 1 (CK1) appartiennent à un sous-groupe de la famille des protéines sérine thréonine kinases. Ce sous-groupe est composé de 6 isoformes chez l'homme : CK1 $\alpha$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3,  $\delta$  et  $\epsilon$ , CK1 $\alpha$  étant le plus petit. Les 7 isoformes sont codées par des gènes distincts, avec plusieurs variants d'épissage pour certaines isoformes. Leur domaine kinase est très conservé chez les Eucaryotes, même s'il existe des variations au niveau des extrémités N- et C-terminales (128)(129). Il s'agit d'enzymes ATP-dépendantes, monomériques, autonomes, ne nécessitant pas de cofacteurs, et dont l'activité peut être régulée par autophosphorylation de ses résidus C-terminaux (130,131).

L'expression ubiquitaire de ces protéines, additionnée à leurs nombreux substrats, témoigne de la diversité de cette famille et de leur importance dans la transduction de divers signaux physiologiques dans de nombreuses voies de signalisation. On les retrouve notamment impliqué dans la division cellulaire (132), la régulation du cycle cellulaire (133), la ségrégation des chromosomes (134), l'apoptose (135), la réponse aux dommages de l'ADN (136), le rythme circadien (137), la biogenèse des ribosomes (138), le trafic des vésicules (139) et la modulation des voies de signalisation telles que p53 (130), Wnt, Shh (140) et Hippo (141).

#### 4.1.3. CK1 $\alpha$ : Gène et protéine

Le gène CSNK1A1, codant pour la protéine CK1 $\alpha$ , est situé sur le chromosome 5q32. Il s'exprime sous la forme de quatre variants d'épissage alternatif, produisant quatre isoformes protéiques de longueur variable (CK1 $\alpha$ , CK1 $\alpha$ S, CK1 $\alpha$ L et CK1 $\alpha$ LS). La structure cristallographique de la protéine CK1 $\alpha$  humaine a été résolue par diffraction des rayons X et en condition de liaison à de petites molécules, facilitant la conception d'agents ciblés (142)(143).

La nomenclature des 4 isoformes de CK1 $\alpha$  est encore débattue, mais elle distingue la présence ou l'absence d'un insert peptidique "L" (pour long) de 28 acides aminés dans le domaine kinase, et d'un insert "S" (pour short) de 12 acides aminés près de l'extrémité C-ter. Le variant CK1 $\alpha$ L est spécifique aux vertébrés (144) et contient un Signal de Localisation Nucléaire (NLS) dans le peptide L, permettant d'adresser CK1 $\alpha$  au noyau (145). Cependant, des données d'immunofluorescence montrent que, dans plusieurs lignées cellulaires humaines, la majorité de la protéine CK1 $\alpha$  est localisée dans le cytosol, suggérant ainsi que les isoformes sans NLS (sans le peptide L) sont plus exprimées, ou bien que le NLS est non fonctionnel. De plus, la comparaison de l'expression de l'ADNc de CK1 $\alpha$  et CK1 $\alpha$ L dans différents tissus de rat a montré que l'ADNc de CK1 $\alpha$  est plus abondant (146), confirmant que les isoformes cytosoliques (CK1 $\alpha$  et CK1 $\alpha$ S) sont prédominantes chez les mammifères (74).

De plus, les propriétés biochimiques diffèrent entre les différentes isoformes de CK1 $\alpha$ . Notamment, la cinétique de phosphorylation des substrats par la kinase varie entre les formes L et S (146).

Enfin, l'analyse cristallographique révèle également que les 93 premiers acides aminés de la protéine CK1 $\alpha$  forment une boucle en épingle à cheveux  $\beta$  (en particulier les résidus 35 à 41) et lient le CeReBloN (CRBN), qui est une protéine E3 ubiquitine ligase appartenant au complexe CLR4 qui assure l'ubiquitination et la dégradation de CK1 $\alpha$  par le Système Ubiquitine Protéasome (SUP)(143)(142). Cette structure protéique est d'autant plus importante que le mécanisme d'action des glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$ , qui seront présentées ci-après, repose sur la formation d'un complexe ternaire entre la kinase, le CRBN et la glu (**Voir Section Glus moléculaires**).

#### 4.1.4. CK1 $\alpha$ : Une protéine ubiquitaire

La protéine CK1 $\alpha$  est omniprésente à l'échelle de la cellule. Elle est effectivement retrouvée à la membrane cellulaire, au noyau (145) mais aussi au centrosome, aux microtubules, à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique dans des cellules non neuronales en interphase (147). CK1 $\alpha$  est également détectée dans les vésicules synaptiques des neurones (148), aux microtubules du fuseau lors de la mitose (149) et aux structures nucléaires (150). On peut donc dire que la protéine CK1 $\alpha$  est ubiquitaire et, son activité enzymatique étant constitutive (128)(151), il est logique de la trouver impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques, lui ajoutant le qualificatif pléiotrope. En effet, CK1 $\alpha$  est une protéine à spectre d'action large qui participe à la régulation de nombreuses voies de signalisation, impliquant de manière non-exhaustive Wnt/ $\beta$ -caténine, p53, mTOR et la voie canonique NF- $\kappa$ B (152). Ces voies de signalisation ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

## 4.2. CK1 $\alpha$ en Pathologie

### 4.2.1. Implication dans Diverses Pathologies Non Cancéreuses

Compte tenu de la pléiotropie caractéristique de cette protéine, il est facile de concevoir son implication dans de multiples pathologies (

#### **Tableau 4).**

Par exemple, CK1 $\alpha$  est retrouvée surexprimée et impliquée dans la pathogenèse de maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. En effet, une phosphorylation anormale

de la protéine tau est responsable de son agrégation et ceci constitue l'évènement central du développement de la maladie d'Alzheimer. Une étude montre que dans la myosite à corps d'inclusion, maladie liée à l'âge caractérisée notamment par l'apparition de lésions intracellulaires identiques à celles retrouvées dans la maladie d'Alzheimer, CK1 $\alpha$  est impliquée dans l'hyper-phosphorylation de la protéine tau (153).

CK1 $\alpha$  a également été récemment décrite comme impliquée dans l'éryptose, mort cellulaire non-inflammatoire des érythrocytes. Des travaux mettent ainsi en évidence le rôle de régulateur de CK1 $\alpha$  dans la signalisation éryptotique, en ce sens qu'elle orchestre le déclenchement de la mort suicidaire des globules rouges (154).

**Tableau 4 : Résumé des rôles joués par les isoformes de CK1 $\alpha$  dans des pathologies cancéreuses et maladies neurodégénératives.**

MALADIE	RÔLE DE CK1 $\alpha$	VOIE DE SIGNALISATION
<b>Cancer de la prostate</b>	Expression augmentée	Signalisation AR
		Signalisation Wnt
		Signalisation Hippo
		Signalisation p53
<b>Cancer du sein</b>	Expression augmentée, l'isoforme varie selon le sous-type Promotion des métastases Contribution à la sensibilité à 4-Hydroxytamoxifen	Signalisation NF- $\kappa$ B
		Signalisation ER
		Signalisation Wnt Signalisation PI3K/AKT/mTOR
<b>Syndrome myélodysplasique</b>	Mutation Délétion 5q hétérozygote La perte contribue à la sensibilité à la lenalidomide	Signalisation Wnt
<b>Cancer colorectal</b>	Mutation Amplification	Signalisation Wnt
		Signalisation p53
<b>Autres cancers</b> (ovaire, pancréas, foie, poumon, tête et cou, rein, estomac, cervical)	Mutation ou changement dans l'expression des promoteurs de tumorigenèse par altération de la signalisation	
<b>Maladie d'Alzheimer</b>	Expression augmentée	Formation de la plaque amyloïde Hyperphosphorylation Tau

## Maladie de Parkinson

Expression augmentée

Signalisation Dopamine

Cascade de la phosphoprotéine  
32 neuronale régulée par l'AMPC

### 4.2.2. Implications dans les Cancers

Puisque CK1 $\alpha$  participe à des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaire, il n'est pas étonnant de la trouver impliquée dans la tumorigenèse de nombreux cancers, tels que les Syndromes MyéloDysplasiques (MDS), les cancers de la prostate, du sein, colorectaux, du poumon à petites cellules, du pancréas ou encore les carcinomes rénaux (155)(156)(

**Tableau 4**). Renforçant cette idée, l'ARN de CK1 $\alpha$  est surexprimé dans les cancers du cerveau, de la prostate, les lymphomes et les leucémies (130).

Ceci est en grande partie dû à son rôle essentiel dans la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, fréquemment hyperactivée dans les cancers. Dans ce contexte, la dérégulation de CK1 $\alpha$  conduit à une accumulation anormale de la  $\beta$ -caténine et à l'activation, souvent constitutive, de la signalisation Wnt, permettant la croissance tumorale et le processus métastatique (140).

#### a) Mutations de CK1 $\alpha$ et Cancers

Des mutations dans le gène CSNK1A1 sont décrites et retrouvées dans les tissus de plusieurs cancers (156). Prenons l'exemple du MDS 5q -. Ce dernier est caractérisé par une délétion sur le chromosome 5q, où est situé le gène de CK1 $\alpha$  (plus particulièrement en position 5q32), qui joue le rôle de suppresseur de tumeur putatif. Dans l'hématopoïèse, les Cellules Souches (CSH) et progénitrices répondent graduellement à la signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine (157). Effectivement, l'activation constitutive de cette voie de signalisation induit une augmentation du nombre de CSH, suivie de leur apoptose responsable de l'apparition d'une insuffisance de la moelle osseuse (158). En revanche, une activation plus régulée est associée à une expansion de ces CSH avec un potentiel de repeuplement (159). Des travaux montrent que l'haploinsuffisance de CSNK1A1 induit une expansion des CSH et confère un avantage en matière de repeuplement, tandis que la délétion homozygote provoque une aplasie médullaire. Également, l'inactivation hétérozygote de CSNK1A1 sensibilise les cellules à un inhibiteur de CK1 $\alpha$  (comparativement aux cellules ayant deux allèles intacts). Enfin, des mutations somatiques récurrentes dans le gène CSNK1A1 (E98V, D140A, D140Y, sur l'allèle non délété des patients atteints de MDS del(5q)), ont été identifiées (160)(161). Ces travaux, avec d'autres, ont justifié le potentiel thérapeutique de CK1 $\alpha$  dans le traitement des MDS de type 5q -. En effet, le lénalidomide, ciblant CK1 $\alpha$ , est actuellement indiqué en clinique dans le traitement de ce syndrome.

Précisons que des mutations de CK1 $\alpha$ , à faible fréquence, ont également été observées dans une plusieurs tumeurs solides et hématopoïétiques (162).

#### b) Surexpression de CK1 $\alpha$ et GB

Dans le GB, cancer au centre de ce travail, l'expression de CK1 $\alpha$  est également dérégulée positivement, l'impliquant directement dans la progression de cette maladie incurable. Des travaux récents montrent que

l'expression de CK1 $\alpha$ , mais également celle de HIF-1 $\alpha$  (Facteur de transcription Induit par l'Hypoxie) et des protéines liées à l'autophagie, est plus élevée dans les lignées cellulaires de GB que dans les tissus cérébraux normaux (163). De plus, dans des lignées de GB U87MG, l'augmentation de l'expression de CK1 $\alpha$  induit une augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et des protéines liées à l'autophagie, favorisant la prolifération cellulaire. Ainsi, CK1 $\alpha$  pourrait être une cible potentielle pour le traitement du glioblastome (163).

À l'instar de ses multiples rôles dans de nombreuses voies de signalisation, CK1 $\alpha$  est une protéine kinase ambivalente. C'est-à-dire qu'elle peut agir soit comme régulateur positif, soit comme régulateur négatif de divers processus physiologiques et pathologiques. C'est ce qui a justifié le développement d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques de CK1 $\alpha$  : pour approfondir l'étude et la caractérisation de ses différents rôles.

### 4.3. Activateurs de CK1 $\alpha$

Puisque le modèle cellulaire d'étude de ce travail est celui du glioblastome et que dans ce cancer la stratégie de ciblage de CK1 $\alpha$  repose sur son inhibition, plutôt que sur son activation, les activateurs de CK1 $\alpha$  seront présentés succinctement.

Commençons par préciser qu'il est très difficile de développer des activateurs de kinases. Les kinases peuvent présenter une activité i) constitutive, ii) induite par une autre protéine (par exemple, les cyclines pour les CDK), iii) dépendante de la relocalisation intracellulaire ou iv) modulée par des modifications post-traductionnelles. Aucune de ces propriétés n'est facile à manipuler avec des composés chimiques.

Le pyrvinium est un médicament anthelminthique, approuvé par la FDA mais remplacé depuis par des molécules plus efficaces et à plus large spectre, bien qu'il soit toujours disponible (164). Il s'agit d'un inhibiteur puissant de la signalisation Wnt qui potentialise l'activité kinase de CK1 $\alpha$  et stabilise l'Axine (165)(**Figure supplémentaire 2.a**). Il a été montré que la prise orale de pyrvinium atténuait l'expression des cibles de la voie Wnt et prévenait la formation d'adénomes chez les souris APC<sup>min</sup> (min pour Multiple Intestinal Neoplasia) (166), tout en stimulant la cicatrisation des plaies et le remodelage du myocarde (167). Bien que plusieurs travaux mentionnent le pyrvinium comme un activateur de CK1 $\alpha$ , le mécanisme d'action reste controversé. Une analyse biochimique récente réalisée par Chen et al confirme que le pyrvinium renforce l'activité de la kinase CK1 $\alpha$  via un mécanisme de modulation allostérique (168).

Le SSTC-104 est l'ambassadeur de la deuxième génération d'activateur de CK1 $\alpha$ . Il s'agit donc d'un analogue fonctionnel du pyrvinium, aux meilleures propriétés pharmacocinétiques. De la même façon, il active CK1 $\alpha$  et permet de diminuer l'activation aberrante de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, retrouvée dans le Sarcome Synovial (SS) et causée par la protéine de fusion oncogène SYT-SSX (169). De plus, le SSTC3 a diminué la croissance de cellules de cancer colorectal (CRC) *in vitro* et prolongé la survie d'un modèle murin de CRC (170).

Soulignons que l'un des principaux avantages des activateurs de CK1 $\alpha$ , par rapport à d'autres classes d'inhibiteurs de la voie Wnt, est leur toxicité réduite (Shen et al. 2020).

## 4.4. Inhibiteurs de CK1 $\alpha$

À l'instar du glioblastome, et dans plusieurs autres cancers, CK1 $\alpha$  est surexprimée et impliquée dans de nombreux processus favorisant la tumorigenèse. C'est pourquoi des inhibiteurs de cette kinase ont été développés, révélant son potentiel thérapeutique dans la prise en charge des cancers.

Actuellement, les inhibiteurs de CK1 ciblent le site de liaison à l'ATP et fonctionnent via un mécanisme de compétition. Ce site de liaison à l'ATP est le site le plus conservé dans le kinome, et encore plus parmi les isoformes d'une même famille de protéines (172)(173). Une limite importante est donc liée au fait qu'un inhibiteur, conçu pour cibler un site de liaison à l'ATP spécifique, pourra facilement se lier à celui d'autres kinases. Et toute activité hors cible indésirable pourra être associée à des effets secondaires et donc à des conséquences cliniques délétères.

Le paragraphe suivant fournit une description succincte et chronologique des différents inhibiteurs de CK1 $\alpha$  existant.

**CKI-7** : Il s'agit du premier inhibiteur de CK1 à avoir été développé (174) et est maintenant largement utilisé, avec une concentration inhibitrice à 50% (IC50) de 113-236  $\mu$ M (175).

**IC-261** : Il a d'abord été utilisé en tant qu'inhibiteur sélectif des isoformes  $\epsilon$  et  $\delta$  de CK1 (176), jusqu'à ce qu'il soit démontré qu'il bloquait en réalité l'activité de toutes les isoformes, avec une IC50 de 0,19  $\mu$ M pour CK1 $\alpha$  (177).

**TG003** : Il a originellement été identifié comme un inhibiteur des kinases CLK du cycle cellulaire (178), qui impacte également l'activité des kinases CK1 $\delta/\epsilon$ , de manière identique ou supérieure à l'IC261 (179) avec une IC50 de 0,33  $\mu$ M pour CK1 $\alpha$  (177).

**D4476** : Il s'agit de l'inhibiteur de CK1 le plus efficace et le plus largement utilisé, avec une IC50 de 200-300 nM (180).

**Triamterène** : Ce médicament a été approuvé par la FDA dans le traitement des troubles œdémateux (tels que l'insuffisance cardiaque, le syndrome néphrotique et la cirrhose hépatique)(181). De plus, il s'est avéré induire la reprogrammation des cellules souches épiblastiques en inhibant CK1 $\alpha$ , avec une IC50 de 33,5  $\mu$ M. Cependant, il a également impacté l'activité kinase des isoformes  $\delta$  et  $\epsilon$  de CK1 (avec des valeurs IC50 de 6,9 et 30,4  $\mu$ M, respectivement) (182).

**Épiblastine A** : C'est l'ambassadeur de la deuxième génération d'inhibiteur de CK1 $\alpha$  dérivant du triamterène. Développé pour obtenir une inhibition plus puissante de CK1 $\alpha$ , les valeurs IC50 pour CK1 $\alpha$ , CK1 $\delta$  et CK1 $\epsilon$  sont respectivement de 3,8, 0,8 et 3,7  $\mu$ M (182).

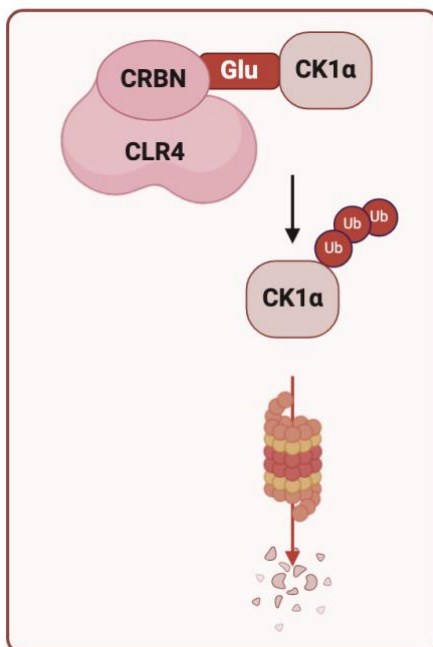
**Longdaysine** : Identifiée par criblage chimique à haut débit, cette petite molécule se lie directement à CK1 $\alpha$  et empêche sa phosphorylation, et conséquente dégradation, de PER1, normalement médiées par CK1 $\alpha$ . Les valeurs d'IC50 pour CK1 $\alpha$  et CK1 $\delta$  sont respectivement de 5,6 et 8,8  $\mu$ M (183).

Pour conclure, à l'heure actuelle il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de CK1 $\alpha$ , le degré élevé d'homologie entre les différents isoformes de CK1 posant des difficultés pour la conception et le développement de médicaments ciblant des isoformes spécifiques. Néanmoins, les molécules disponibles ont été utilisées pour l'étude des fonctions de CK1 $\alpha$ .

## 4.5. Glus moléculaires

Malgré des progrès constants dans le développement de petites molécules inhibitrices, puissantes et sélectives, de nombreuses protéines restent difficiles à cibler. Dans ce contexte, la Dégradation Ciblée des Protéines (TPD) est récemment apparue comme une nouvelle modalité thérapeutique très attrayante dans la prise en charge de maladies comme le cancer, les maladies auto-immunes, inflammatoires et infectieuses, étant donné qu'elles sont en grande partie causées par l'expression aberrante d'une protéine pathogène. Les glus moléculaires ouvrent ainsi l'espoir de l'essor de nouvelles thérapies permettant de répondre à des besoins médicaux non satisfaits (184).

Le Système Ubiquitine-Protéasome (UPS) est un mécanisme central au maintien de l'homéostasie cellulaire puisqu'il permet la dégradation des protéines, de sorte à maintenir la protéostasie. Ce processus



physiologique implique une cascade enzymatique, principalement médiée par les enzymes E3 ubiquitine ligases, qui aboutit à l'ubiquitination d'une protéine d'intérêt (POI) (185). À titre indicatif, plus de 600 E3 ubiquitine ligases sont codées par le génome humain et seulement quelques-unes sont exploitées pour la dégradation ciblée des protéines, parmi lesquelles cereblon (CRBN), VHL, MDM2, DDB1, DCAF15 et SCF  $\beta$ TRCP. Ces protéines peuvent être ciblées par les glus moléculaires qui s'y « collent », ceci induisant des changements de conformation favorisant, *in fine*, la formation d'un complexe ternaire entre la E3 ubiquitine ligase, la glu moléculaire et la POI (186). La formation de ce complexe ternaire permet le rapprochement entre le site catalytique de la E3 ligase et la POI, facilitant le transfert d'ubiquitine sur cette dernière et donc sa dégradation par le protéasome (Figure 4).

**Figure 4 : Mode d'action d'une glu moléculaire ciblant CK1 $\alpha$ .**

La glu va permettre le rapprochement physique entre la protéine CK1 $\alpha$ , et le complexe multiprotéique E3 ubiquitine ligase CLR4. CRBN est l'une des protéines composant ce complexe, elle joue le rôle de récepteur et assure ainsi la fixation de la protéine cible au complexe. Cette fixation permettra la poly-ubiquitination de CK1 $\alpha$ , ayant pour but sa dégradation par le protéasome.

Les glus moléculaires présentent deux avantages principaux, comparativement aux inhibiteurs classiques. Premièrement, elles médient un processus catalytique, reposant sur une liaison transitoire, plutôt que sur une occupation compétitive, et se dissocient avec succès après avoir poly-ubiquitiné la POI (186). Ainsi, une seule molécule peut détruire de nombreuses copies d'une même POI, synonyme de meilleure efficacité à faibles doses. Deuxièmement, alors que les inhibiteurs bloquent le site actif d'une protéine, les glus moléculaires suppriment toutes ses fonctions, synonyme d'une plus grande sensibilité des protéines résistantes aux traitements et d'une plus grande chance d'affecter les fonctions non enzymatiques des protéines pathogènes (187).

Thalidomide, légalidomide et pomalidomide sont des médicaments immunomodulateurs (IMiDs), anti-inflammatoires et anti-angiogéniques, actuellement indiqués dans le traitement du myélome multiple. Dans les années 1950, le thalidomide était utilisé comme sédatif dans plus de 40 pays et était souvent prescrit aux femmes enceintes pour traiter les nausées matinales. Cependant, son potentiel tératogène forcera son retrait du marché (188). Plus récemment, plusieurs études ont révélé son fort potentiel thérapeutique, justifiant un retour sur le marché pour le traitement de la lèpre en 1998, et du myélome multiple en 2006 (189)(190)(191)(192). Cependant, sa tératogénicité a imposé la mise en place d'un contrôle strict du traitement (193), et a inspiré le développement de dérivés plus puissants et moins toxiques. C'est dans ce contexte que le légalidomide et le pomalidomide ont été approuvés par la FDA en 2006 et 2013, respectivement, pour le traitement du myélome multiple.

Précisons qu'à cette période, le (s) mécanisme (s) moléculaire (s) d'action et celui (ceux) expliquant les nombreux effets secondaires n'était (ent) pas encore connu (s). Étant donné les effets variés et sur différents tissus, l'hypothèse était que le thalidomide exerce ses activités en se liant à plusieurs cibles. C'est ainsi, à posteriori d'une utilisation déjà validée en clinique, que la cible unique du thalidomide et de ses dérivés, expliquant à la fois les effets pharmacologiques et tératogènes, a été découverte. Il s'agit de CeReBloN (CRBN) (194), une protéine ubiquitaire appartenant au complexe multiprotéique E3 ligase CLR4 (pour Cullin-RING ligase 4). Au sein de ce complexe, CRBN fonctionne comme le récepteur : les substrats s'y fixent pour être ensuite ubiquitiné. Ainsi, le thalidomide exerçait son action par protéolyse spécifique, médiée par CRBN. Par la suite, il a été montré que CRBN se liait non seulement au thalidomide, mais aussi au légalidomide et pomalidomide. Ainsi, l'abolition de l'expression du CRBN abolissait l'effet antiprolifératif du légalidomide et pomalidomide (195).

En 2014, deux groupes indépendants ont montré que les protéines dégradées suite à l'interaction IMiDs-CRBN sont les oncoprotéines Ikaros (IKZF1) et Aiolos (IKZF3), deux facteurs de transcription impliqués dans la survie des cellules de myélomes multiples (196)(197). Et puisque la surexpression d'un mutant non-dégradable d'IKZF confère aux cellules de myélome une résistance au légalidomide, il a été conclu que les propriétés anti-myélome des IMiDs étaient permises par la dégradation d'IKZF1 et d'IKZF3. Ce mécanisme d'action est aussi vrai pour le pomalidomide, et il a également été montré que la dégradation de ces deux facteurs de croissance entraînait une augmentation de l'expression de l'IL-2 dans les cellules T (198).

Une autre observation a été faite : le légalidomide est le seul IMiD ayant un effet clinique sur l'amélioration du syndrome myélodysplasique (5q-). Ceci est expliqué par le fait que le légalidomide se lie à CRBN et permet également la dégradation de CK1 $\alpha$ , avec IKZF1 et IKZF3 (143). Effectivement, dans le syndrome 5q-

on trouve une haploinsuffisance de CK1 $\alpha$  qui explique que la dégradation additionnelle de CK1 $\alpha$  par le lénalidomide entraîne une mort cellulaire efficace médiée par l'activation de p53 (**Figure 12**). Cependant, il convient de préciser que cette dégradation de CK1 $\alpha$  n'est que modeste, et reste partielle même à des concentrations allant jusqu'à 10  $\mu$ M (143).

Structurellement, les IMiDs possèdent tous une fonction glutarimide, capable de se lier à la poche tri-tryptophane de la surface du CRBN (199). De plus, ces molécules possèdent toutes une fonction supplémentaire qui « dépasse » de la poche de liaison au CRBN et qui est propre à chaque IMiD, justifiant les spécificités de substrats (199).

La découverte de nouvelles glus moléculaires repose aujourd'hui essentiellement sur des approches de criblage. Ci-après, sera détaillée l'origine des molécules utilisées dans ce travail, bien que de nombreuses autres molécules semblent prometteuses.

Basé sur le même principe de fonctionnement, le BTX161, analogue du thalidomide mais non utilisé en clinique, a été développé pour induire la dégradation de CK1 $\alpha$  dans une lignée de cellules d'AML humaine. Des travaux montrent que la dégradation de la kinase, plus efficace que celle médiée par le lénalidomide, active la voie de réponse aux dommages de l'ADN et la voie p53, tout en stabilisant l'antagoniste MDM2 de p53 (**Figure 12**)(200).

De plus, le FPFT-2216, dérivé du thalidomide, s'est montré efficace dans la dégradation des protéines IKZF1, CK1 $\alpha$  (201), IKZF3 et PDE6D (202). PDE6D (pour Phosphodiesterase 6D) est une protéine chaperonne qui module la localisation dans le cytosol des protéines farnésylées, telles que KRAS. Une étude récente explore le potentiel antitumorale *in vitro* et *in vivo* de cette nouvelle glu moléculaire dans cellules de tumeurs lymphoïdes (203). Notamment, le FPFT-2216 a montré un effet inhibiteur plus important sur la prolifération des cellules de lymphome humain que les dérivés connus du thalidomide et a induit une augmentation de l'expression de p53 et de ses cibles transcriptionnelles p21 et MDM2 (**Figure 12**). *In vivo*, quasi toutes les tumeurs des souris ont disparu après 10 jours (chez 5 des 7 souris, jusqu'à 24 jours après la dernière administration de FPFT-2216) (203). Intéressamment pour ce projet, le FPFT-2216 a été responsable d'une diminution de l'activité du complexe CBM, visible via l'inhibition de la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  et NF- $\kappa$ B (**Figure 3**). Le FPFT-2216 inhibe ainsi la croissance tumorale en activant la voie p53 et en inhibant celle du complexe CBM/NF- $\kappa$ B, ces deux effets permis par la dégradation de CK1 $\alpha$ .

Le FPFT-2216 a été le point de départ d'une approche de développement rapide de dégradeurs sélectifs reposant sur la reprogrammation de la spécificité du substrat de l'E3 ubiquitine ligase. C'est dans ce contexte que le TMX-4100 et le TMX-4116 ont été développés. Ils présentent une plus grande sélectivité pour la dégradation de PDE6D et de CK1 $\alpha$ , respectivement (dans ce travail, le TMX-4100 est utilisé comme contrôle puisqu'il ne cible pas CK1 $\alpha$ ) (202). Cette dégradation préférentielle a été conservée dans plusieurs types cellulaires, y compris les cellules lymphocytaires MOLT4, Jurkat et MM.1S (202).

Récemment, le criblage d'une bibliothèque de ligands de CRBN, dans un panel de lignées cellulaires cancéreuses dérivées de patients, a conduit à la découverte du SJ7095, un dégradeur puissant des protéines CK1 $\alpha$ , IKZF1 et IKZF3. L'étude de la Relation Structure-Activité (SAR) a ensuite permis le développement du SJ3149, un dégradeur sélectif et puissant de la protéine CK1 $\alpha$  *in vitro* et *in vivo*. La co-cristallisation de la structure

du SJ3149, en complexe avec CK1 $\alpha$ , le CRBN et DDB1 (autre membre du complexe multiprotéique E3 ligase CLR4), a justifié la dégradation améliorée de CK1 $\alpha$  par ce composé. Dans un panel de 115 lignées cellulaires cancéreuses, le SJ3149 présente une large activité antiproliférative. Ces résultats suggèrent le potentiel de l'utilisation des dégradeurs sélectifs de CK1 $\alpha$  pour le traitement des cancers hématologiques et des tumeurs solides (204).

Cette conclusion est également celle d'une autre étude récente qui présente le développement et le potentiel de deux nouvelles glus moléculaires : le DEG-35 et DEG-77. De manière identique, les protéines cibles sont IKZF2 et CK1 $\alpha$ . Le développement du DEG-35, comme dégradeur nanomolaire d'IKZF2, a reposé sur l'utilisation d'une approche guidée par la structure. Cependant, il s'est avéré que la spécificité de substrat s'étendait à CK1 $\alpha$ , qui a été identifiée par une analyse protéomique et un test de criblage PRISM. Ces travaux montrent que la dégradation d'IKZF2 et de CK1 $\alpha$  bloque la croissance cellulaire et induit une différenciation myéloïde des cellules d'AML, via les voies CK1 $\alpha$ -p53 et IKZF2. De plus, la dégradation médiée par le DEG-35, ou son analogue dérivé plus soluble : le DEG-77, retarde la progression de la leucémie dans les modèles murins et humains d'AML. Ces résultats suggèrent ainsi une stratégie de dégradation multicible (de IKZF2 et CK1 $\alpha$ ) pour améliorer l'efficacité thérapeutique dans l'AML, tout en gardant en tête que cette stratégie pourrait être étendue à d'autres cibles et indications (205).

Ainsi, les glus moléculaires dérivées du thalidomide sont venues bousculer les dogmes établis en proposant une nouvelle stratégie thérapeutique, applicable à de nombreuses maladies : celle de dégrader une protéine pathologique plutôt que de l'inhiber. Le développement de ces molécules s'est initié dans le cadre de cancers hématologiques, mais ce travail met en exergue leur potentiel dans le traitement de tumeurs solides. Précisons également que le thalidomide, et donc ses dérivés structuraux, franchissent la BHE (206), renforçant encore un peu plus leur potentiel dans la prise en charge du glioblastome.

## Objectif du travail de thèse : Questions et Hypothèses

Les glioblastomes sont caractérisés par leur nature hautement invasive, leur résistance aux traitements conventionnels (chirurgie, chimiothérapie, et radiothérapie), et leur capacité à se régénérer après traitements. Dans ce cadre, les Cellules de type Souche du Glioblastome (GSC), qui possèdent des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation, jouent un rôle clé dans l'initiation, la progression, et la résistance tumorales. La recherche sur les GSC revêt donc une pertinence cruciale pour la compréhension et le traitement de cette forme agressive et incurable (médiane de survie 15 mois) de cancer du système nerveux central de l'adulte (14). Dans ce sens, des travaux récents attribuent à MALT1, une paracaspase à champ enzymatique restreint, un rôle important dans le maintien des GSC et l'expansion tumorale. En effet, l'inhibition de son activité protéolytique et la réduction de son expression conduisent à une diminution de la prolifération, de la survie mais aussi de l'expression de marqueurs souches dans les GSC (207).

Il apparaît donc important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant l'activation de MALT1 dans les GSC. Un candidat potentiel pourrait être la Caséine Kinase 1 $\alpha$ , décrite comme orchestrant l'assemblage du complexe multiprotéique CBM, auquel appartient MALT1 (74).

Ce projet vise donc à élucider le rôle de CK1 $\alpha$  dans la régulation de la protéolyse par MALT1, dans les GSC, et à apporter la preuve de concept que cette kinase est un candidat prometteur à l'entrave de l'expansion tumorale. Cela pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques, visant à cibler spécifiquement ces cellules, via CK1 $\alpha$ , et à améliorer les résultats cliniques pour les patients atteints de cette maladie dévastatrice.

# Matériel et méthodes

## 1. Culture cellulaire

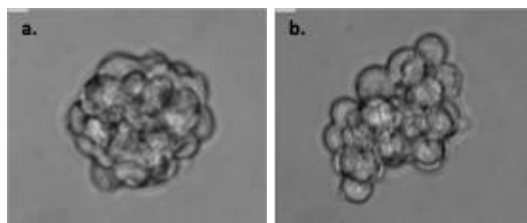
Les Cellules de type Souche de Glioblastome (GSC) ont été préalablement isolées à partir de résections chirurgicales de glioblastomes primaires (Harford-Wright *et al*, 2017), en accord avec la déclaration d'Helsinki sur la protection des patients et après consentements signés, auprès des services de neuro-oncologie de l'Hôpital Saint-Anne (Paris) et Hôtel-Dieu (Nantes). Les caractéristiques principales des GSC (GSC6 et GSC9 utilisées dans ce projet en **rouge**), dont le sous-type moléculaire selon la classification de Verhaak (Verhaak *et al*, 2010; Wang *et al*, 2016) et le statut p53, sont résumées dans le

**Tableau 5** ci-dessous.

**Tableau 5: Caractérisation des GSC. Adapté de Harford-Wright *et al*, 2017.**

#	GENRE	ÂGE	SOUS-TYPE (VERHAAK <i>et al</i> , 2010)	STATUT p53
1	F	68	Mes.	WT
2	H	25	Mes.	MUTATION (homozygote) p. R249S (p.Arg249Ser ; c.747G>C)
4	F	76	Mes.	WT
<b>6</b>	<b>H</b>	<b>68</b>	<b>Mes.</b>	<b>MUTATION (homozygote) p. R249S (p.Arg249Ser ; c.747G&gt;C)</b>
<b>9</b>	<b>H</b>	<b>68</b>	<b>Clas.</b>	<b>MUTATION (homozygote) p. R249S (p.Arg249Ser ; c.747G&gt;C)</b>
12	H	59	Neur.	MUTATION (homozygote) p. R249S (p.Arg249Ser ; c.747G>C)
13	F	73	Neur.	WT
15	H	72	Clas.	MUTATION (homozygote) p. R249S (p.Arg249Ser ; c.747G>C)

Les GSC sont cultivées sous forme de sphères (**Image 1**), non-adhérentes, dans un milieu sans sérum appelé NS34, composé de DMEM/F-12 (Life Technologies), supplémenté en facteurs de croissance neurale (N2, G5 et B27, Life Technologies) et 1% GlutaMAX (Life Technologies), complété par des solutions d'antibiotiques (1% pénicilline - streptomycine et 0,5% amphotéricine B, Life Technologies) et d'anti-mycoplasme/antibiotique/antifongique (1% normocine, Invivogen). Ce milieu permet l'expansion des GSC dans un état non-différencié et la préservation de leur caractère souche. Ces cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur à atmosphère humide, à 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont manipulées sous Poste de Sécurité Microbiologique en pièce de confinement de niveau 2.



**Image 1 : Images de sphères de GSC6 et 9.**

## 2. Traitement des cellules

Les GSC, cultivées en milieu complet NS34, sont traitées par différentes molécules : l'inhibiteur protéolytique de MALT1 : MLT-985 (MedchemExpress), et les différentes générations de glus moléculaires, dans l'ordre : THALIDOMIDE (Selleckchem), POMALIDOMIDE (Selleckchem), LÉNALIDOMIDE (Tocris), BTX161 (MRC Dundee, Ecosse), FPFT-2216 (MedchemExpress), TMX-4100 (MedchemExpress), TMX-4116 (MedchemExpress), SJ3149 (MedchemExpress) et DEG-77 (MedchemExpress). La suspension se fait en DMSO (selon les différentes solubilités des molécules) et la conservation est à -20°C. Pour chaque expérience, les durées de traitement et concentrations sont indiquées.

Dans le but de favoriser la pénétration intracellulaire, le BTX161 a été complexé avec deux réactifs de transfection liposomaux : lipofectamine (Life Technologies) ou Gene Juice (Sigma). Afin de standardiser les traitements, un prémix est également préparé dans un milieu de culture appauvri (OPTIMEM, Life Technologies) et contenant la lipofectamine et le BTX161, dans des concentrations proportionnelles au milieu réactionnel de transfection. Les traitements ont été réalisés en deux étapes : administration à T, en association ou non avec les agents de transfection (LP, lipofectamine, et GJ, gene juice) pour 24h, et administration à T+24h pour 24h de plus, sans les agents de transfection.

## 3. Transfection d'ARN interférant

Les transfections sont réalisées à partir 0,8 million de cellules par condition. Le milieu réactionnel de transfection, pour une condition, est composé de : 96,5µL de milieu Opti-MEM (Life Technologies), 2µL de réactif de transfection RNAiMAX Lipofectamine (Life Technologies) et 1,25µL d'une solution mère à 20µM de d'ARN double-brin contrôle (Low GC Duplex, Life Technologies) ou ciblant CK1α humain (5'-GGCAAGGGCUAAAGGCUGCAACAAA-3', Life Technologies), MALT1 humain (5'-CAGCAUUCUGGAUUGGCAAUGGAA-3', Life Technologies), BCL10 humain - SMART pool (GCCACCAGAUUCACAGUUACGAACAACCUCCAGAUCCGGCAUCCACUGUCAUGUAAAUCAUAGCUGAGAGACAU, Dharmacon), ou CARD10-SMART pool humain (CAGAUGGACUGUCGUUUUAGCGUGUGGCCUUUGGGAAACAAGAGAUCCUUCGACUGGGAACUCGGCUGUACUUCGC, Dharmacon). Ces complexes sont ajoutés au goutte à goutte sur les cellules et incubées à 37°C, sous atmosphère humide et à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 6 heures. Cette étape permet que les complexes ARN/lipofectamine franchissent les membranes cellulaires et ciblent l'ARN messenger (ARNm) cytoplasmique par reconnaissance de base nucléotidique. 1,5mL de milieu complet NS34 est ensuite ajouté à chaque condition et les cellules sont récoltées 3 jours après leur transfection. Ce délai correspond au temps nécessaire pour l'obtention de l'efficacité inhibitrice maximale de l'ARNm cible et de la réduction de l'expression de sa protéine.

## 4. Cytométrie en flux

Pour cette méthode, 1 million de cellules par condition sont incubées en présence d'une sonde passive sensible au pH : LysoTracker Green DND-26 (Life Technologies), pendant 30 minutes et à température ambiante. Cette sonde permet un marquage des compartiments acides intracellulaires, tels que les lysosomes, et est utilisée à la concentration de 100nM. Un lavage au PBS est ensuite réalisé avant de reprendre les cellules dans 200µL de PBS et d'analyser la fluorescence par cytométrie de flux (BD Canto I, Plateforme CytoCell, Nantes). Le contrôle correspond à des cellules ayant subi le même protocole en omettant le LysoTracker (cellules non marquées). L'analyse des données obtenues est faite sur le logiciel FlowJo.

## 5. Lysat protéique

0,8 million de GSC par condition sont centrifugées (500g, 3 minutes, 4°C), lavées en PBS froid puis lysées pendant 30 minutes sur glace en tampon de lyse RIPA (Tris HCl pH 7,4 25mM, NaCl 150mM, SDS 0,1%, Na-Déoxycholate 0,5%, NP-40 10%, EDTA 1mM). Une centrifugation à 10 000g, pendant 10 min et à 4°C est ensuite réalisée de sorte à éliminer les débris cellulaires et la fraction insoluble (dont l'ADN).

La concentration protéique des échantillons est estimée avec le kit de dosage protéique BCA (BiCinchoninique Assay Protein Quantification Kit, #UP40840A, Interchim) en suivant les recommandations du fournisseur. Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur deux réactions successives : l'oxydation du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les protéines et la formation d'un complexe pourpre par l'acide bicinchoninique et le  $\text{Cu}^+$ . Ce complexe absorbe à une longueur d'onde de 562nm captée par le lecteur de plaques FluoStar Optima (BMG LabTech). La concentration protéique des échantillons est évaluée par rapport à une gamme d'une protéine de référence (Albumine de Sérum Bovin (BSA, 2mg/L, #UP36859A, Interchim) à concentrations définies, permettant l'établissement d'une courbe d'étalonnage.

Alternativement, des lysats protéiques de cellules BT549 (lignée cellulaire de cancer du sein triple négatif), MDA-MB-231 (lignée cellulaire de cancer du sein triple négatif), et macrophages M1 (monocytes primaires CD14+ extraits du sang de donneurs de l'EFS Nantes et différenciés à l'aide de GM-CSF) ont été préalablement préparés dans l'équipe (Jane Jardine, équipe SOAP, CRCI<sup>2</sup>NA).

## 6. Co-immunoprécipitation (co-IP)

15 millions de cellules par condition sont lysées dans 500µL de tampon RIPA pendant 30 minutes, sur la glace, comme décrit précédemment. 50µL de ce lysat cellulaire de départ (input) sont conservés pour analyse par western-blot. Les 450µL de lysat restant sont incubés en présence de 30µL de protéines G sépharose (Amersham), préalablement lavées dans du tampon RIPA, pendant 30 minutes, sous agitation et à 4°C (pre-clear). Cette étape de « pre-clear » permet d'éliminer les protéines cellulaires se liant de manière non spécifique aux protéines G. Parallèlement, 40µL de billes de sépharose-protéines G sont incubées avec 1µg d'anticorps IgG2b ciblant BCL10 (Santa Cruz) pendant 30 minutes, sous agitation et à 4°C. Le surnageant du « pre-clear » est ensuite transféré sur le mix protéines G/anticorps et incubé sur la nuit, sous agitation et à 4°C. Les complexes

protéines G/Anticorps/Antigènes cibles, associés aux billes de sépharose, sont ensuite lavés 5 fois dans du tampon RIPA (500 µL) puis dénaturés dans 20µL de Laemmli 2X, à 95°C pendant 5 minutes. Une analyse par western-blot des échantillons est ensuite réalisée.

## 7. Western-blot (WB)

Pour chaque échantillon analysé, 10µg de protéines sont dénaturés par chauffage à 95°C, pendant 5 minutes, dans du tampon Laemmli 2X ou 6X (375mM Tris HCl, 9% SDS, 50% glycérol, 0,03% bleu de bromophénol, 9% β-mercaptoéthanol) ; le choix se fait en fonction de la concentration protéique de l'échantillon. Les échantillons sont déposés sur gel au côté d'un marqueur de taille (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Biorad). Les gels utilisés lors de ce projet sont des gels Tris-Acétate, possédant un gradient d'acrylamide allant de 3% (2,8mL + 30µL APS + 1µL Temed) à 15% (2,8mL + 30µL APS + 1µL Temed) et permettant une meilleure séparation des protéines de plus haute masse moléculaire. Les compositions et volumes sont donnés dans le

**Tableau 6.** L'étape de séparation se fait par électrophorèse sous un champ électrique de 150V pendant 1h20 dans un tampon de migration (Invitrogen NuPAGE Tris-Acetate SDS, Novex).

**Tableau 6 : Composition et volumes pour 5 gradients de gels Tris Acétate 3%-15%.**

GRADIENT DE GEL	3%	15%
H <sup>2</sup> O	24mL	8,92mL
Acrylamide 40%	2,12mL	6mL
3M Tris Acétate pH 7,0	1,88mL	1,08mL

Le transfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Protran 0,45µm NC, GE HealthCare) est ensuite réalisé à 25V pendant 1h30 dans un tampon de transfert (Tris-Glycine, éthanol 20%). La qualité du transfert est appréciée en plaçant la membrane dans une solution de rouge Ponceau (ChemCruz) qui marque toutes les protéines. Des lavages (solution de PBS-Tween 0,05%) sont ensuite réalisés avant une étape de saturation (solution PBS-Tween 0,05%, Lait 5%) pendant 30 minutes.

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire (**Tableau 7**), dilué entre 1/1000 et 1/50 000 dans la solution de saturation, pendant une nuit et à 4°C. Trois lavages successifs de 5 minutes sont réalisés dans la solution de PBS-Tween 0,05% et sous agitation. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire (**Tableau 7**) correspondant, dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans la solution de saturation, pendant 1 heure et à température ambiante. Cette liaison anticorps primaire / anticorps secondaire repose sur la reconnaissance du fragment Fc de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP : HorseRadish Peroxydase), permettant l'oxydation de substrats chimioluminescents en présence de peroxyde d'hydrogène.

**Tableau 7 : Anticorps primaires (haut) et secondaires (bas) utilisés en WB.**

<b>ANTICORPS PRIMAIRE</b>	<b>CONCENTRATION</b>	<b>ISOTYPE</b>	<b>RÉFÉRENCE</b>	<b>FOURNISSEUR</b>
BCL10	1/1 000	IgG2b	SC-13153	Santa Cruz
CK1α	1/20 000	Ig de lapin	ab223144	Abcam
CTSD	1/1 000	IgG2a	610801	BD
CYLD	1/1 000	IgG2b	SC-137139	Santa Cruz
GAPDH	1/50 000	IgG1	SC-47724	Santa Cruz
HOIL-1	1/1 000	IgG1	SC-393754	Santa Cruz
LAMP1	1/1 000	IgG2b	611042	BD
LAMP2	1/8 000	IgG1	SC-18822	Santa Cruz
LIMP2	1/1 000	Ig de lapin	SAB3500449	Sigma
MALT1	1/1 000	IgG1	SC-46677	Santa Cruz
N4BP1	1/1 000	Ig de lapin	CPA2415	Cohesion biosciences
VINCULINE	1/1 000	Ig de lapin	SC-5573	Santa Cruz

<b>ANTICORPS SECONDAIRE</b>	<b>CONCENTRATION</b>	<b>RÉFÉRENCE</b>	<b>FOURNISSEUR</b>
Anti-souris chaînes légères	1/50 000	1050-05	Southern Biotech
Anti-lapin chaînes légères	1/50 000	4060-05	Southern Biotech
Anti-Ig de lapin	1/5 000	4050-05	Southern Biotech
Anti-IgG1	1/5 000	1070-05	Southern Biotech
Anti-IgG2b	1/5 000	1090-05	Southern Biotech
Anti-IgG2a	1/5 000	1080-05	Southern Biotech

De nouveau, 3 lavages successifs de 5 minutes au PBS-Tween 0,05% sont réalisés avant l'étape finale de la révélation. Celle-ci est réalisée par ajout du réactif Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore), qui est le substrat luminescent de la HRP. La réaction induite libère un signal chimioluminescent mesuré par des capteurs spectrophotométriques et le résultat est visualisé à l'aide du système Fusion (Vilbert Lourmat).

## 8. Marquage cellulaire par immunofluorescence (IF)

Pour cette méthode, 0,4 million de cellules sont centrifugées (500g, 3 minutes, 4°C), lavées puis reprises dans 200µL de PBS froid afin d'obtenir une suspension de cellules isolées. Les cellules sont déposées sur lame de polysine (VWR) pendant 30 minutes puis fixées dans une solution de ParaFormaldéhyde (Electron Microscopy Sciences) diluée à 4% dans du PBS pendant 12 minutes. Deux lavages au PBS sont ensuite réalisés avant l'étape de perméabilisation en Triton X-100 (Sigma) diluée à 0,2% dans du PBS, pendant 5 minutes. Après lavage au PBS, la neutralisation des sites aspécifiques pouvant apparaître lors de l'étape suivante d'incubation des anticorps primaires est assurée par l'ajout d'une solution de saturation protéique à l'Albumine de Sérum Bovin (BSA, Sigma) diluée à 4% dans du PBS, pendant 30 minutes.

L'anticorps primaire, dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans la solution de PBS/BSA 4%, est incubé une nuit en atmosphère humide, à 4°C (**Tableau 8, haut**). Deux lavages au PBS sont ensuite réalisés avant l'incubation avec l'anticorps secondaire, dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans la solution de PBS/BSA 4%, pendant 1 heure, à température ambiante et à l'abri de la lumière (**Tableau 8, bas**). L'anticorps secondaire, choisi par reconnaissance d'espèce, est couplé à un fluorochrome qui sera excité et capté par microscopie confocale équipée de lasers adaptés. Ensuite, un nouveau lavage au PBS est réalisé avant la coloration des noyaux cellulaires par un intercalant de l'ADN (DAPI, Life Technologies, 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS 1X, 5 minutes, température ambiante). Un dernier lavage au PBS est ensuite réalisé avant le montage entre lame et lamelle dans la solution de montage et de prolongation de coloration (ProLong, Life Technologies). Il faut ensuite attendre 24h avant de pouvoir visualiser la lame au microscope, de sorte à s'assurer de la polymérisation du montage final.

**Tableau 8 : Anticorps primaires (haut) et secondaires (bas) utilisés en IF.**

ANTICORPS PRIMAIRE	CONCENTRATION	ISOTYPE	RÉFÉRENCE	FOURNISSEUR
HA-Tag	1/400	Ig de lapin	C29F4	Cell Signaling Technology

ANTICORPS SECONDAIRE	CONCENTRATION	FLUOROCHROME	RÉFÉRENCE	FOURNISSEUR
Anti-Ig de lapin	1/400	Alexa 546	A11035	Thermo Fisher Scientific

L'analyse des échantillons marqués par immunofluorescence se fait par microscopie confocale (Nikon A1rHD, Plateforme MicroPICell). Plusieurs champs seront ainsi capturés de manière aléatoire, pour être le plus représentatif possible de l'échantillon, à l'aide d'un objectif à huile à immersion (objectif à huile à immersion 60X). Les paramètres d'acquisition sont déterminés sur les échantillons contrôles et les images obtenues sont analysées sur le logiciel Fiji (ImageJ).

## 9. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est déterminée grâce au test métabolique de CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega). Le CellTiter-Glo est une technique basée sur la quantification d'ATP correspondant, proportionnellement, au nombre de cellules métaboliquement actives.

Ce test est réalisé à partir de 8 000 cellules par puits de 100 $\mu$ L, cultivées dans le milieu complet NS34, en plaque 96 puits. Pour chaque condition, un triplicat technique ainsi qu'un contrôle négatif sont réalisés. Après traitement des cellules, 100 $\mu$ L de réactif CellTiter-Glo sont ajoutés dans chacun des puits et la plaque est placée sous agitation pendant 2 minutes pour favoriser la lyse cellulaire. La plaque est ensuite laissée incubée pendant 5 minutes avant le transfert de 100 $\mu$ L de chaque puits en plaque blanche 96 puits, permettant la lecture de la luminescence par le lecteur de plaque FluoStar Optima (BMG Labtech). La luminescence est émise par réaction de la luciférase, proportionnellement à la quantité d'ATP présente dans chaque puits. Des valeurs brutes de quantité de luminescence seront ensuite analysées pour déterminer un pourcentage de viabilité cellulaire par condition testée comparativement à la condition contrôle.

## 10. Test de Formation de Tumorosphères (TFA)

Au jour 1, 0,03 million de GSC sontensemencées (en triplicat) dans 500 $\mu$ L de NS34 (plaque 24 puits) sous forme de suspension unicellulaire. Au jour 2 et 3, les cellules sont dissociées manuellement pour réduire l'agrégation jusqu'au jour 5. Finalement au jour 5, le nombre de tumorosphères par champ de vision (fov) est calculé manuellement à partir de 5 x 3 (triplicat) fov aléatoires, pour chaque condition. Ce comptage est réalisé en simple aveugle. Est précisée en **Figure 7.c** une représentation schématique de ce protocole.

## 11. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à partir de triplicats biologiques et à l'aide du logiciel GraphPad Prism par le test t-test apparié / non-apparié. Pour chaque test, une valeur statistique p (ou p-value) inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

# Résultats

## 1. Les Cellules de type Souche de Glioblastome (GCS) présentent une activité basale de MALT1

MALT1 est une protéine au double rôle d'échafaudage et d'arginine protéase. Cette enzyme est impliquée dans le clivage d'un nombre restreint de substrats, tels que la dé-ubiquitinase CYLD, la protéine du complexe d'ubiquitination linéaire HOIL-1 et l'endoribonucléase N4BP1. Cette protéolyse permet la régulation optimale de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, ainsi que de phénomènes plus larges comme l'adhésion cellulaire, la stabilité des ARNm et la signalisation mTORC1 (

**Tableau 1**)(210). Il est important de noter qu'en conditions physiologiques, l'activité protéolytique de MALT1 est maintenue silencieuse, mais reste inductible et transitoire. Cependant, dans certaines situations pathologiques, tels que les Lymphomes Diffus à grande Cellules B, MALT1 est constitutivement active (211). D'ailleurs, dans le GB, MALT1 est surexprimée et son expression corrèle fortement avec la survie des patients (Jacobs et al. 2020).

Dans ce contexte, une caractérisation de l'activité protéolytique de MALT1 dans les GSC a été réalisée. Comme précédemment montré dans l'équipe, MALT1 est constitutivement active dans les GSC. Ceci est estimé par l'observation de fragments de clivage des substrats CYLD, HOIL-1 et N4BP1 sur les analyses western-blot (indiqués **Figure 5** par des flèches rouges). Toutefois, des variations dans l'intensité de cette activité (variations de l'intensité des fragments de clivage) sont à noter en fonction des conditions de culture cellulaire (**Figure 5a, b & c**). L'impact de plusieurs paramètres a donc été évalué (**Figure 5a**). Parmi eux, la composition du milieu de culture (nutriments, suppléments, antibiotiques/antifongiques), le nombre de cellules par puits, le volume de milieu et la durée d'ensemencement, le sécrétome des GSC, ainsi que la conformation sous forme de sphères.

Ces résultats suggèrent que les cellules issues de patients possèdent une activité basale et modulable, par différents facteurs extracellulaires, de MALT1. Notamment, un temps long d'ensemencement (72h VS 24h) et une concentration importante de cellules par puit (1 million VS 500 000) sont deux paramètres qui influencent positivement l'activité enzymatique de MALT1 dans les GSC (**Figure 5c**).

La découverte de l'activité protéolytique de MALT1 a conduit au développement d'inhibiteurs puissants et sélectifs (211). Parmi eux, la famille des composés MLT. Plusieurs expériences précédemment réalisées montrent que le MLT-748 permet une abolition de l'activité protéolytique de MALT1 (212). Plus stable métaboliquement, et donc avec un meilleur profil pharmacocinétique, le MLT-985 a également été testé dans les GSC6 et 9 (**Figure 6**). L'analyse par western-blot permet de détecter la forme entière des protéines (indiquée par des flèches noires) et leur fragment de clivage (indiqué par des flèches rouges), dans la condition contrôle (Ctrl)(**Figure 5d**). En revanche, lorsque l'activité protéolytique de MALT1 est inhibée par le MLT-985 (2 $\mu$ M, 72h), CYLD et HOIL-1 ne sont plus clivés, suggérant que l'activité enzymatique de MALT1 est responsable de la protéolyse de ses substrats, dans les GSC en culture.

De la même façon, la réduction de l'expression de MALT1 par ARN interférence (siMALT1 +), aboutit à une disparition du fragment de clivage de HOIL-1 (**Figure 5e**). L'analyse densitométrique de l'intensité du signal de

la protéine MALT1 par rapport à la GAPDH et de la forme clivée de HOIL-1 par rapport à la protéine entière permet d'apprécier, respectivement, l'extinction significative de l'expression protéique de MALT1, ainsi que l'inhibition de son activité protéolytique, par perte du clivage de HOIL-1 dans les GSC6. Une tendance similaire est également observée dans les GSC9 (**Figure 5f**).

Pour conclure, ces résultats renforcent l'idée que la paracaspase MALT1 possède une activité protéolytique basale et modulable dans les GSC, et établissent les conditions de culture garantissant un système d'étude robuste. Cependant, le mécanisme de régulation de l'activité protéolytique de MALT1 dans les GSC reste à élucider.

## 2. MALT1 opère au sein d'un complexe multiprotéique contenant la kinase CK1 $\alpha$

MALT1 est une sous-unité intégrale du complexe de signalisation CARD-BCL10-MALT1 (CBM). L'assemblage du CBM induit à la fois les fonctions d'échafaudage et de protéase de MALT1. Ainsi, les dynamiques d'assemblage/désassemblage du groupe de signalisation, en réponse à divers stimuli dans les cellules immunitaires et non immunitaires, garantissent l'activation inductible et transitoire de MALT1 dans des conditions physiologiques (211). La Caséine Kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) participe également à la signalisation du CBM en orchestrant son assemblage via l'association et la phosphorylation de CARMA1, faisant suite à une activation antigénique des lymphocytes. Dans le sous-type de lymphome ABC DLBCL, CK1 $\alpha$  est un acteur essentiel de l'activité NF- $\kappa$ B aberrante, nécessaire à leur survie (74).

Afin de déterminer si le complexe CK1 $\alpha$ -CBM (C-CBM) est à l'œuvre dans les GSC, une co-immunoprécipitation a été réalisée dans des cellules de patients (GSC9) en utilisant BCL10 comme appât. L'analyse par western-blot montre que BCL10 interagit avec MALT1 et CK1 $\alpha$ , tandis que, comme attendu, le contrôle d'immunoglobuline ne permet de détecter aucun des partenaires protéiques testés (**Figure 6a**). En revanche, la qualité des anticorps commerciaux pour CARMA3, l'isoforme probablement exprimée dans les GSC (207)(The Human Protein Atlas), n'a pas permis de tester sa présence dans le complexe CBM (**Figure 6e**).

Le potentiel rôle de CK1 $\alpha$  comme régulateur de l'activité protéolytique de MALT1 a ensuite été exploré. Pour cela, l'expression de CK1 $\alpha$  est abolie transitoirement par ARN interférent et les substrats de MALT1, CYLD et HOIL-1, sont analysés par western-blot. Comme précédemment montré, nous notons une disparition nette des fragments de clivage des deux substrats de MALT1, en comparaison avec la condition contrôle (siCK1 $\alpha$  -)(**Figure 6b**). Outre l'efficacité de l'extinction de l'expression de CK1 $\alpha$ , l'analyse densitométrique des résultats obtenus en western-blot révèle une inhibition significative de l'activité de MALT1 dans les GSC6 et GSC9 (**Figure 6c**). D'ailleurs, un résultat identique sur la fonction enzymatique de MALT1 est obtenu lorsque l'expression de BCL10 et CARMA3 est temporairement abolie (**Figure 6d**). Ceci met en évidence la nécessité d'avoir un complexe CBM assemblé pour que la protéine MALT1 soit protéolytiquement active dans les GSC.

Pour conclure, ces résultats suggèrent que les protéines BCL10, MALT1 et CK1 $\alpha$  interagissent de manière constitutive dans les GSC, et que l'assemblage du CBM est nécessaire à l'activation protéolytique de MALT1. L'inhibition de l'expression de CK1 $\alpha$  récapitule le phénotype obtenu, suggérant un rôle régulateur de CK1 $\alpha$  sur le CBM (**Figure 6e**). Dans ce contexte, les effets fonctionnels du complexe de signalisation C-CBM restent à éclaircir.

### 3. L'ARN interférence ciblant CK1 $\alpha$ réduit l'expansion des GSC

Des travaux récents montrent que l'expression de MALT1 est inversement corrélée à la probabilité de survie des patients atteints de glioblastome (207). En outre, la réduction de l'expression de cette arginine protéase, par ARN interférence, entrave largement l'expansion des cellules souches dérivées de patients *in vitro*. Ceci est également reproductible lorsque ces mêmes cellules sont traitées par des inhibiteurs pharmacologiques de MALT1, *in vitro* et *in vivo* (207)(212).

Afin de déterminer si CK1 $\alpha$  participe, à l'expansion des GSC, un test métabolique de viabilité cellulaire a été réalisé sur des GSC6 et GSC9 préalablement transfectées par l'ARN interférent ciblant CK1 $\alpha$ . Les résultats montrent une diminution d'environ 30% de la viabilité des cellules de patients, 72h après la transfection inhibitrice (siCK1 $\alpha$ ) (**Figure 7b**).

En outre, les GSC sont définies par leurs propriétés souches, incluant l'auto-renouvellement qui s'apprécie par la capacité des GSC à former des neurosphères secondaires dans un milieu défini sans sérum (25). Cette capacité est évaluée par le Test de Formation des Neurosphères (NFA), dont le protocole est schématisé dans la **Figure 7c**. Simplement, au jour 1 les cellules sont mises en suspension, de sorte à les avoir sous forme de cellules uniques, etensemencées. Aux jours 2 puis au jour 3, les sphères nouvellement formées sont dissociées mécaniquement. Lors du jour 4, les neurosphères ne sont pas dissociées de sorte à pouvoir apprécier et compter, au jour 5, le nombre de sphères formées par condition.

L'analyse d'images en microscopie par transmission révèle que les GSC6 et GSC9, normalement cultivées sous forme de sphères (siC), apparaissent sous la forme de sphères de taille plus petite ou de cellules isolées, en présence de l'ARNi ciblant CK1 $\alpha$  (**Figure 7a**). De plus, les NFA révèlent une diminution du nombre de sphères formées par les GSC9 lorsque l'expression de CK1 $\alpha$ , mais également de MALT1 et BCL10, est abolie transitoirement (**Figure 7d**). Cependant et de manière surprenante, l'inhibition de l'expression de CARMA3 dans ces mêmes cellules conduit à un résultat opposé avec une légère augmentation du nombre de neurosphères secondaires formées. Des expériences complémentaires devront donc être menées pour comprendre ce phénotype.

Pour conclure, ces résultats montrent que la protéine CK1 $\alpha$  impacte la viabilité et le maintien du caractère souche des GSC (**Figure 7e**), mimant le phénotype fonctionnel du blocage de la protéase MALT1. Si le rôle de CK1 $\alpha$  dans l'homéostasie des GSC a été investigué par une approche d'inhibition génétique, de nouvelles molécules ciblant la protéine, et déjà utilisés en clinique, pourraient compléter ces résultats.

## 4. Efficacité limitée des glus moléculaires dérivées du lénalidomide dans les GSC

Les molécules thalidomide, pomalidomide, lénalidomide, BTX161, FPFT-2216 et TMX-4116 (**Figure 8a**) sont des glus moléculaires qui ciblent la protéine CeReBloN (CRBN), membre du complexe multiprotéique CRL4 permettant la dégradation par le protéasome de protéines cibles (213). L'expression du CRBN dans les GSC a donc été validée par western-blot, en prenant comme contrôle positif deux lignées de cellules immunitaires (JURKAT et THP1) dans lesquelles une efficacité d'action du thalidomide et de ses dérivés a déjà été démontrée (**Figure 8b**).

Les protéines dégradées suite à l'interaction thalidomide (et ses dérivés) – CRBN sont les oncoprotéines IKAROS et AIOLOS, deux facteurs de transcription impliqués dans la survie des cellules de myélomes multiples (213). De manière attendue, les GSC n'expriment ni IKAROS ni AIOLOS, contrairement aux lignées contrôles de JURKAT et THP1 (**Figure 8b**). En revanche, CK1 $\alpha$  est exprimée à des niveaux comparables dans les lignées testées.

La kinase CK1 $\alpha$  est également une protéine ciblée par ce mécanisme de dégradation. Elle est plus particulièrement la cible du lénalidomide (143), et de ses dérivés. Cette dégradation de CK1 $\alpha$  est observée dans deux lignées de cancer du sein (BT549 et MDA-MB-231) et une lignée de macrophage lorsque ces dernières sont traitées par 10 $\mu$ M de BTX161 (dérivé du lénalidomide), durant 48h. En effet, l'analyse par western-blot montre une diminution de l'expression de la protéine CK1 $\alpha$  en condition traitée (**Figure 8c**). En revanche, cette inhibition n'est pas retrouvée lorsque des GSC6 sont traitées par du BTX161 et ce même à de plus fortes concentrations (25, 50, 75 et 100 $\mu$ M)(**Figure 8d**). Des agents de transfection (lipofectamine, LP, et gene juice, GJ), induisant une déstabilisation de la membrane cellulaire, ont alors été utilisés dans le but d'optimiser la pénétration intracellulaire du BTX161. L'analyse par western-blot révèle que la condition BTX161 50 $\mu$ M/LP permet une inhibition satisfaisante de la protéine CK1 $\alpha$ , ce qui n'est pas le cas de la condition BTX161 50 $\mu$ M/GJ (**Figure 8d**). Ces résultats suggèrent que l'effet de la glu moléculaire BTX161 n'est pas optimal dans les GSC, en raison d'un déficit de pénétration intracellulaire.

De plus, les mêmes expériences ont été réalisées en traitant des cellules de patients (GSC9) par des doses croissantes de lénalidomide (0,1 ; 0,5 et 1 $\mu$ M), pomalidomide (1, 5, et 10 $\mu$ M) et thalidomide (1 ; 50 et 100 $\mu$ M). À nouveau, l'analyse par western-blot montre une inhibition négligeable de l'expression de la protéine CK1 $\alpha$  par le lénalidomide (thalidomide et pomalidomide servent ici de contrôles négatifs puisqu'ils ne ciblent pas CK1 $\alpha$ )(**Figure 8e**).

Puisque nous n'avons pas détecté d'effet-dose, la cinétique d'action a été questionnée par le traitement de GSC9 par des générations dérivées du lénalidomide : BTX161 (50 $\mu$ M), FPFT-2216 (1 $\mu$ M) et TMX-4116 (1 $\mu$ M). De la même façon que pour les gammes de concentrations, l'analyse western-blot montre une dégradation non-optimale de CK1 $\alpha$  par le BTX161 mais aussi par le FPFT-2219 et le TMX-4116 dans les GSC9, indépendamment du temps de traitement (le TMX-4100 sert ici de contrôle négatif puisqu'il ne cible pas CK1 $\alpha$ )(**Figure 8f**).

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que les premières générations de glus moléculaires, actuellement utilisées en clinique dans le traitement des myélomes multiples, n'entraînent pas ou peu la dégradation de CK1 $\alpha$  dans les GSC. Cependant, nous assistons à un changement de paradigme dans la stratégie d'envisager la prise en charge thérapeutique des cancers avec un intérêt croissant pour la dégradation ciblée de protéines (TPD) pathogéniques, comparativement à l'inhibition protéique. Ainsi, de nouvelles générations de glus moléculaires plus puissantes et sélectives sont en développement.

## 5. Optimisation de l'utilisation des nouvelles générations des glus moléculaires

DEG-77 et SJ3149 (**Figure 9a**) sont deux représentants de la dernière génération de glus moléculaires ciblant, notamment, CK1 $\alpha$ . Leurs activités antiprolifératives observées *in vitro* et *in vivo*, suggèrent le potentiel de l'utilisation des dégradateurs sélectifs de CK1 $\alpha$  pour le traitement des cancers hématologiques mais aussi des tumeurs solides (214)(215). L'expression protéique de CK1 $\alpha$  a donc été étudiée dans des GSC9 traitées soit pendant différents temps (2, 4, 6, 16, 24, 48 et 72 heures), soit par différentes concentrations de SJ3149 et DEG-77 (0,05, 0,5, 1, 25 et 50 $\mu$ M). Les analyses western-blot montrent qu'indépendamment de la concentration et du temps de traitement, SJ3149 et DEG-77 induisent une diminution considérable de l'expression protéique de CK1 $\alpha$ , comparativement au control (« 0 »)( **Figure 9b** et **Figure 9c**).

La kinase CK1 $\alpha$  exerce un rôle de régulateur négatif de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (**Figure supplémentaire 2.a**)(152). En phosphorylant, avec GSK3 $\beta$ , la  $\beta$ -caténine, cette dernière est ubiquitinée puis dégradée par le protéasome, en l'absence de ligands extracellulaires de Wnt (152).

L'efficacité de la dégradation de CK1 $\alpha$  induite par le SJ3149 et le DEG-77 est évaluée par une analyse western-blot de la  $\beta$ -caténine. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de la  $\beta$ -caténine lorsque les GSC9 sont traitées, soit par des doses croissantes de SJ3149 et DEG-77 (**Figure 9b**), soit sur des temps croissants (**Figure 9c**).

Pour conclure, mes résultats suggèrent que les nouvelles générations de glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$  sont des outils puissants et efficaces qu'il conviendra désormais d'utiliser pour poursuivre l'élucidation du rôle de CK1 $\alpha$  dans l'homéostasie des GSC.

## 6. Les nouvelles générations de glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$ bloquant l'expansion des GSC

De la même façon qu'en **Figure 6** et en **Figure 7**, l'implication de CK1 $\alpha$  dans l'activité protéolytique de MALT1, ainsi que dans le maintien du caractère souche des GSC a été étudiée, cette fois-ci au moyen d'une stratégie d'inhibition protéique.

L'analyse par western-blot du statut de clivage des substrats de MALT1 (CYLD, N4BP1 et HOIL-1) révèle que le traitement des GSC9 par SJ3149 et DEG-77 (1 $\mu$ M, 72h) abolit leur clivage, comparativement à la condition contrôle (**Figure 10a**). Ceci récapitule les résultats obtenus avec l'inhibiteur de MALT1 (MLT-985) et l'ARN interférent réduisant l'expression de CK1 $\alpha$ .

En outre, si l'ARN interférant entraînait une diminution d'environ 30% de la viabilité des GSC6 et GSC9, 72h après la transfection, la dégradation de CK1 $\alpha$  par le SJ3149 et le DEG-77 n'entraîne qu'une modeste diminution d'approximativement 10% de la viabilité des GSC1 et GSC9 (**Figure 10b**).

Cependant, la capacité des GSC à former des neurosphères est impactée par le traitement par les glus moléculaires. En effet, les NFA révèlent une diminution du nombre de sphères formées par les GSC6 et GSC9 lorsque CK1 $\alpha$  est dégradée par le protéasome (**Figure 10c**).

Pris dans leur ensemble, mes résultats renforcent l'idée que, dans les GSC, CK1 $\alpha$  agirait comme un régulateur initial de la signalisation du CBM, participant, *in fine*, au maintien de la capacité d'auto-renouvellement des cellules de type souche de glioblastome (**Figure 10d**). La disponibilité de nouveaux outils puissants, ciblant CK1 $\alpha$  et déjà utilisés en clinique, met en perspective le potentiel d'une stratégie thérapeutique reposant sur l'utilisation des glus moléculaires. Cependant, il convient avant tout de caractériser la signalisation précise du C-CBM impliquée dans le maintien du caractère souche des GSC.

## 7. CK1 $\alpha$ module l'abondance lysosomale

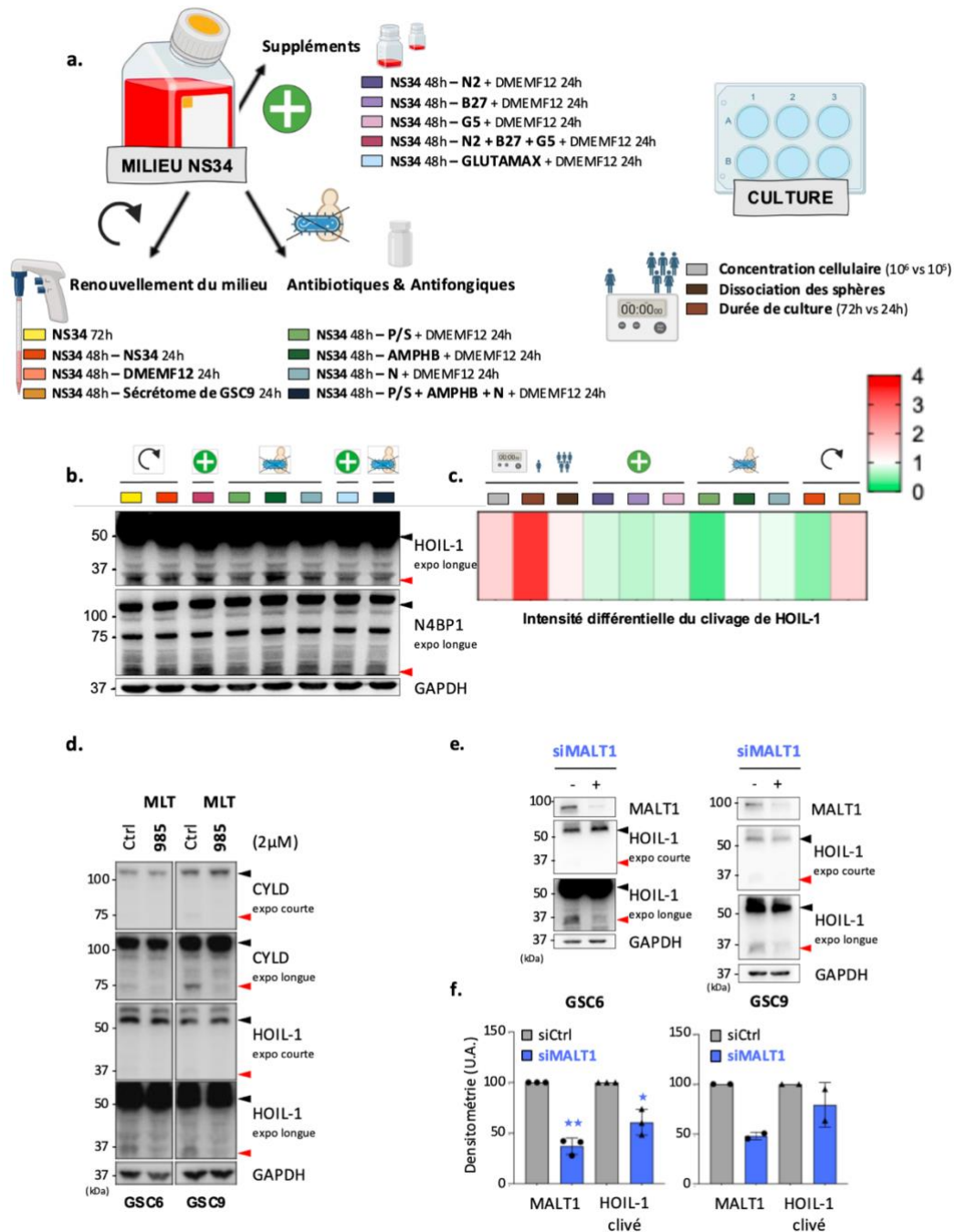
Des travaux de l'équipe ont montré que MALT1 est un régulateur central de l'homéostasie lysosomale dans les GSC (207). En effet, son inhibition est associée à une augmentation aberrante du nombre de lysosomes, conduisant à la mort de ces cellules (207). Il apparaît donc intéressant d'élucider une éventuelle participation de CK1 $\alpha$  à la régulation de l'abondance lysosomale, au travers de son action sur le complexe CBM. Dans ce contexte, une analyse par western-blot des niveaux d'expression de différentes protéines résidentes des lysosomes (LAMP2, LAMP1, CTSD et LIMP2) est réalisée en présence ou non d'ARNi ciblant CK1 $\alpha$ . Une augmentation de l'expression des protéines lysosomales est observée lorsque l'expression de CK1 $\alpha$  est réduite (siCK1 $\alpha$  +) (**Figure 11a**). Afin de confirmer ces résultats, une analyse par immunofluorescence de la protéine lysosomale TMEM192 a été réalisée. TMEM192 est une protéine spécifique de la membrane lysosomale, qui peut être marquée (tag HA ici) et dont la surexpression n'entraîne pas de modifications de la fonction des lysosomes (216). Alors que les cellules ayant reçu une séquence contrôle (siC) montrent un marquage ponctiforme de TMEM192, typique des compartiments lysosomaux, la réduction de l'expression de la protéine CK1 $\alpha$  (siCK1 $\alpha$ ) entraîne une augmentation massive de l'intensité de fluorescence, suggérant une dérégulation de leur formation et/ou maturation (**Figure 11b**). De plus, les lysosomes sont des organites intracellulaires caractérisés par un pH acide entre 4,5 et 5,5. Le maintien de l'homéostasie et de la fonction des lysosomes peut donc être évalué par un suivi du marquage des compartiments acides intracellulaires. Ceci est le principe du marquage par la sonde passive et sensible au pH (LysoTracker). L'analyse par cytométrie de flux révèle une augmentation significative de l'intensité moyenne de fluorescence de cette sonde dans les GSC9 et une tendance, bien que non statistiquement significative, dans les GSC6, lorsque l'expression de CK1 $\alpha$  est éteinte (**Figure 11c**).

De plus, des travaux récents ont montré que l'inhibition de MALT1 déconnecte mTOR des lysosomes et atténue la voie de signalisation mTOR (207). La kinase mTOR est le centre catalytique de deux complexes multiprotéiques structurellement et fonctionnellement distincts : mTORC1 et mTORC2. mTORC1, dans lequel

mTOR est notamment complexé à RAPTOR, régule croissance et prolifération cellulaire dépendamment de la composition extracellulaire en nutriments et facteurs de croissance mais aussi de l'état énergétique et du stress intracellulaire. mTORC1 est notamment retrouvé aux lysosomes. mTORC2, dans lequel mTOR est notamment complexé à RICTOR, régule la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette dépendamment des signalisations induites par les facteurs de croissance. mTORC2 est notamment retrouvé aux ribosomes (217)(**Figure 11d**).

Pour investiguer le potentiel rôle de mTOR dans le phénotype lysosomal observé, et pour déterminer lequel des complexes mTORC1 ou mTORC2 serait impliqué, l'expression de RAPTOR et RICTOR, a été diminuée transitoirement par ARN interférence (3 séquences différentes pour RAPTOR, #1, #2 et #3, et RICTOR, #3, #4 et #5). Le statut de clivage des substrats de MALT1 (N4BP1 et HOIL-1) a ensuite été analysé par western-blot. Les résultats montrent des variations dans l'intensité des fragments de clivage en fonction des séquences mais, dans l'ensemble, la réduction de l'expression de RAPTOR et RICTOR ne diminue pas l'activité protéolytique de MALT1 dans les GSC9 (**Figure 11e**).

Pour conclure, ces résultats suggèrent que l'inhibition transitoire de CK1 $\alpha$  induit une augmentation du nombre de lysosomes dans les GSC, indépendamment de la signalisation de mTOR, récapitulant ainsi le phénotype provoqué par l'inhibition de MALT1 (**Figure 11f**). L'homéostasie lysosomale étant un point de vulnérabilité important des GSC, CK1 $\alpha$  apparaît comme une cible thérapeutique prometteuse pour sa régulation précoce de la signalisation du CBM.

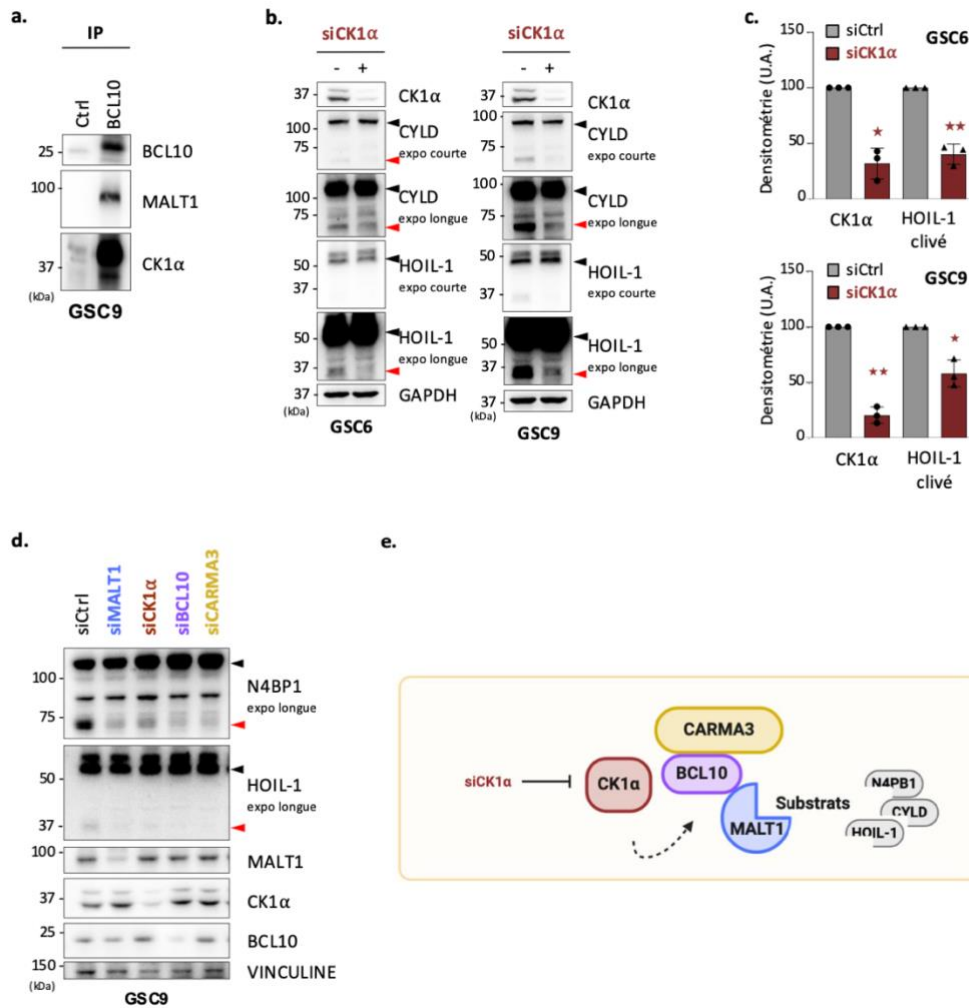


**Figure 5 : Les Cellules de type Souche de Glioblastome (GSC) présentent une activité basale de MALT1.**

a. Schéma récapitulatif des différentes conditions expérimentales testées, ci-après, par western-blot pour la culture de cellules de type souche de glioblastome (GSC9). L'impact du renouvellement du milieu (par différents types de milieux), de sa composition en antibiotiques/antifongiques (P/S pour Pénicilline/Streptomycine, AMPHB pour Amphotéricine B, N pour Normocine) et en suppléments (N2, B27 et/ou G5) a été évalué. b. Analyse par western-blot des niveaux d'expression de deux substrats de MALT1 : HOIL-1 et N4BP1. La protéine entière est indiquée par une flèche noire, le produit de clivage par une flèche rouge. Une exposition (expo longue) est montrée. n = 2. c. Heatmap représentant l'analyse densitométrique de l'intensité du signal correspondant à la forme clivée de HOIL-1 par rapport à celle de la protéine entière. Les données sont normalisées par rapport à la GAPDH. d. GSC6 et GSC9 ont été traités au MLT-985 (2 $\mu$ M, 72h). Le DMSO (Ctrl) est utilisé comme contrôle. e et f. GSC6 et GSC9 ont été préalablement transfectées avec une séquence d'ARN double brin ciblant MALT1 (siMALT1 ou +). Un ARN duplex non-ciblant est utilisé en contrôle (siCtrl ou -). d et e. Analyse par western-blot des niveaux d'expression de la protéine MALT1 ainsi que de ses substrats : HOIL-1 (d et e) et CYLD (d). La protéine entière est indiquée par une flèche noire, le produit de clivage par une flèche rouge. Deux expositions (expo courte et longue) sont montrées. La GAPDH sert de contrôle de charge protéique. La masse moléculaire (en kDa) est indiquée sur la gauche. f. Analyse densitométrique du niveau d'expression de MALT1. L'intensité du signal correspondant à la forme clivée de HOIL-1 est rapportée à celle de la protéine entière. Les données sont normalisées par rapport à la GAPDH et exprimées en unité arbitraire (U.A.). Les graphes représentent pour chaque lignée GSC6 (n = 3) et GSC9 (n = 2) la moyenne +/- sd.

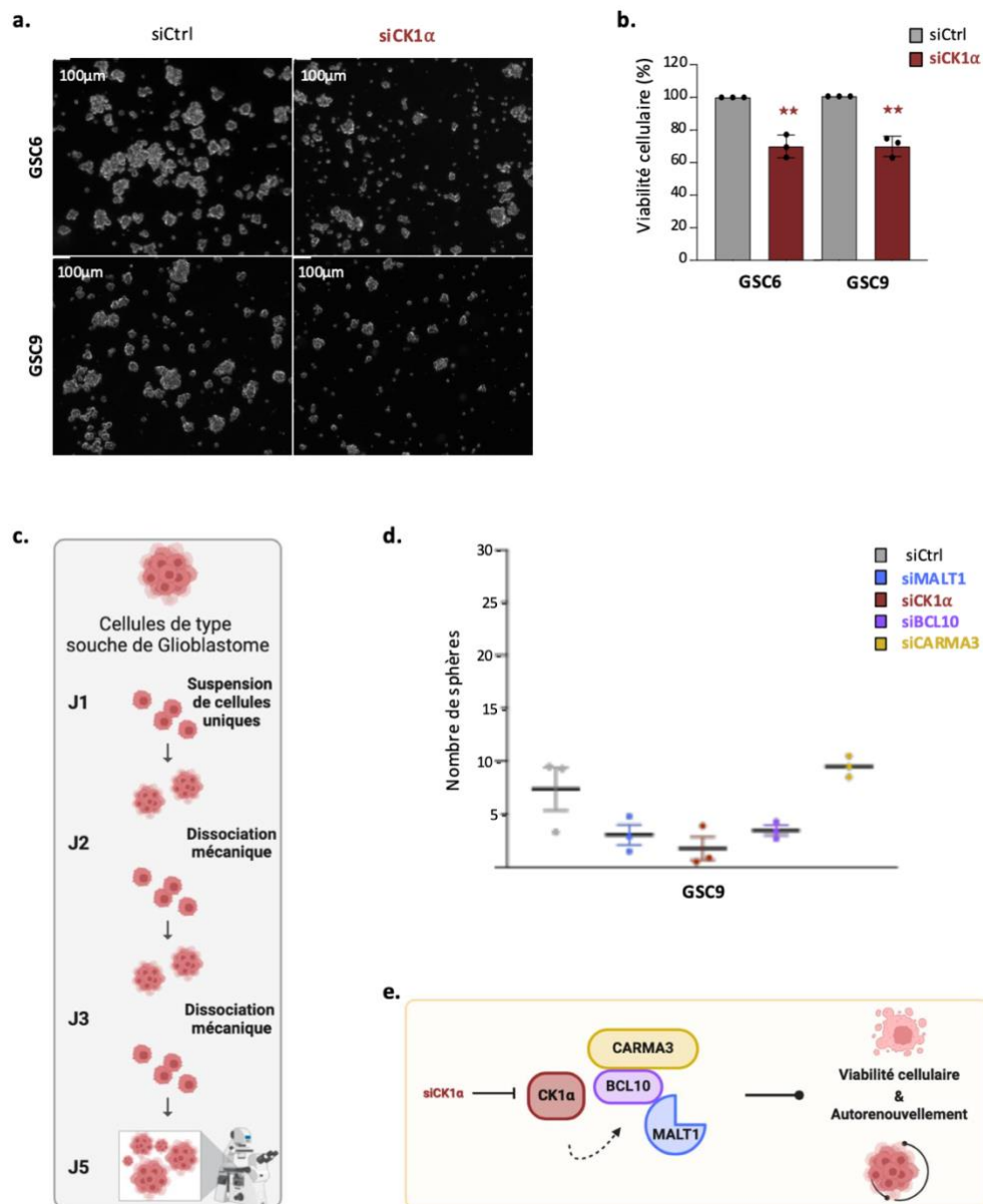
Chaque panel est représentatif d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire.

Analyses statistiques par t-test apparié et intervalle de confiance de 95%. p\* < 0,05, p\*\* < 0,01.



**Figure 6 : MALT1 opère au sein d'un complexe multiprotéique contenant la kinase CK1α.**

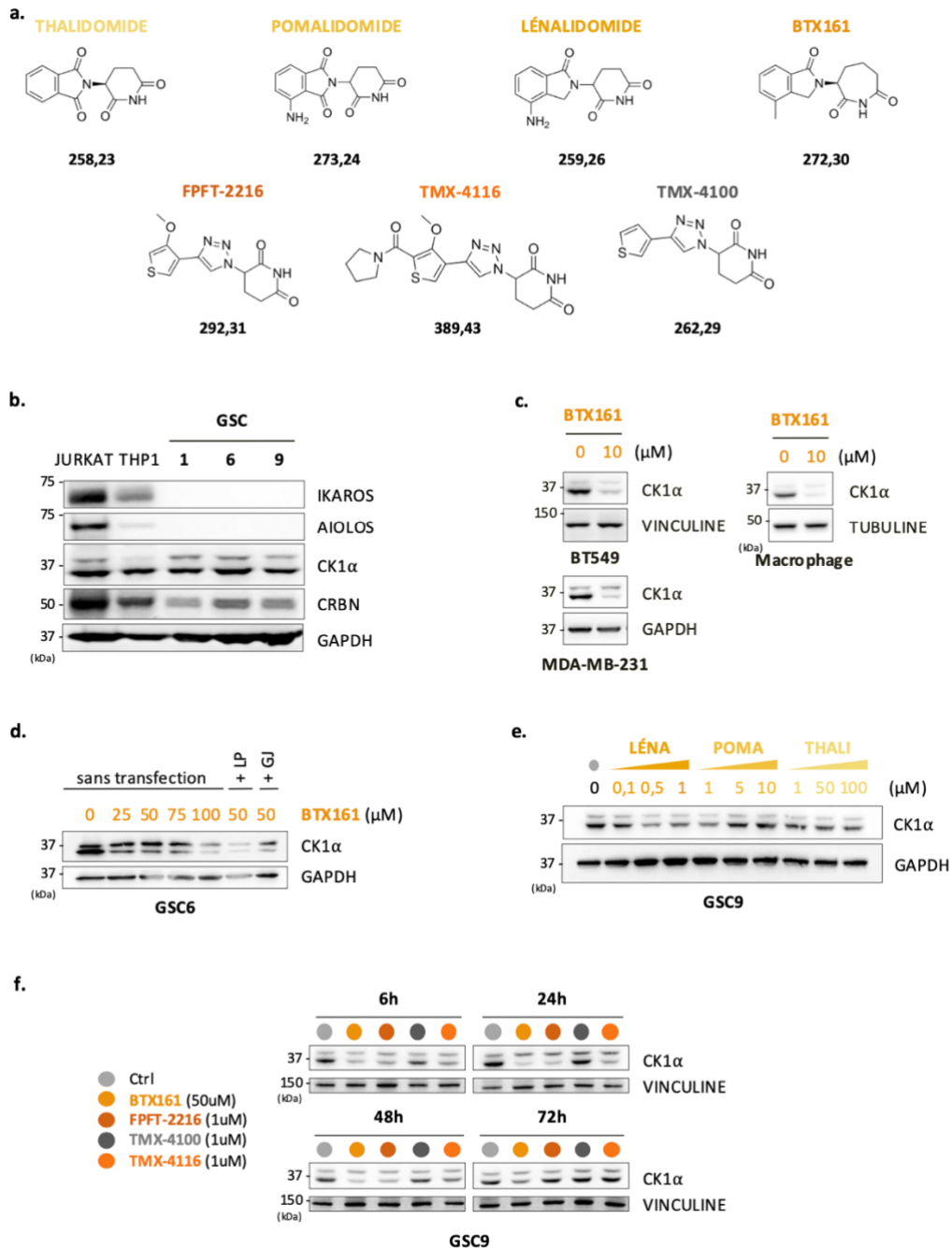
a. La protéine BCL10 endogène a été immunoprécipitée (IP) dans les lysats protéiques de cellules de glioblastome de type souche (GSC9). Une immunoglobuline de même isotype (Ctrl) est utilisée en contrôle de spécificité. Une analyse par western-blot de protéines est réalisée afin de détecter la présence des protéines MALT1 et CK1 $\alpha$  en complexe avec BCL10. **b - d.** GSC6 (**b et c.**) et GSC9 (**b - d.**) ont été préalablement transfectées avec une séquence d'ARN double brin ciblant CK1 $\alpha$  (siCK1 $\alpha$  ou +) (**b - d.**), MALT1 (siMALT1), BCL10 (siBCL10) ou CARMA3 (siCARMA3) (**d.**). Un ARN duplex non-ciblant est utilisé en contrôle (siCtrl ou -). **b et d.** Analyse par western-blot des niveaux d'expression des protéines CK1 $\alpha$ , MALT1 et BCL10 ainsi que des substrats de MALT1 : HOIL-1 (**b et d.**), CYLD (**b.**) et N4BP1 (**d.**). La protéine entière est indiquée par une flèche noire, le produit de clivage par une flèche rouge. Une exposition (expo longue, **d.**) ou deux (expo courte et longue, **b.**) sont montrées. GAPDH et VINCULINE servent de contrôle de charge protéique. La masse moléculaire (en kDa) est indiquée sur la gauche. **c.** Analyse densitométrique du niveau d'expression de CK1 $\alpha$ . L'intensité du signal correspondant à la forme clivée de HOIL-1 est rapportée à celle de la protéine entière. Les données sont normalisées par rapport à la GAPDH et exprimés en unité arbitraire (U.A.). **e.** Schéma montrant que le clivage des substrats de MALT1 (ici HOIL-1, CYLD et N4BP1) nécessite l'expression de CK1 $\alpha$ . Chaque panel est représentatif d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire. Analyses statistiques par t-test apparié et intervalle de confiance de 95%. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.



**Figure 7 : L'ARN interférence ciblant CK1α réduit l'expansion des GSC.**

**a, b et d.** Les cellules de type souche de glioblastome (GSC6 et GSC9) ont été préalablement transfectées avec une séquence d'ARN double-brin ciblant CK1α (siCK1α)(**a, b et d.**), MALT1 (siMALT1), BCL10 (siBCL10) ou CARMA3 (siCARMA3)(**d.**). Un ARN duplex non-ciblant est utilisé en contrôle (siCtrl). **a.** Images représentatives par microscopie par transmission des GSC6 et GSC9, 72h après la transfection par des ARN double-brin. n = 3. Barres d'échelles = 100µm. **b.** La viabilité cellulaire des GSC6 et GSC9 est estimée par la mesure d'ATP selon le test métabolique Cell Titer Glo après 72h. Les données normalisées sont présentées sous forme de moyenne +/- sd. **c.** Représentation schématique du protocole de Test de Formation des Neurosphères (NFA) **d.** Quantification du nombre de sphères par champs de vue. **d.** Schéma illustrant le rôle de la protéine CK1α dans le maintien de l'homéostasie (viabilité et autorenewement) des GSC.

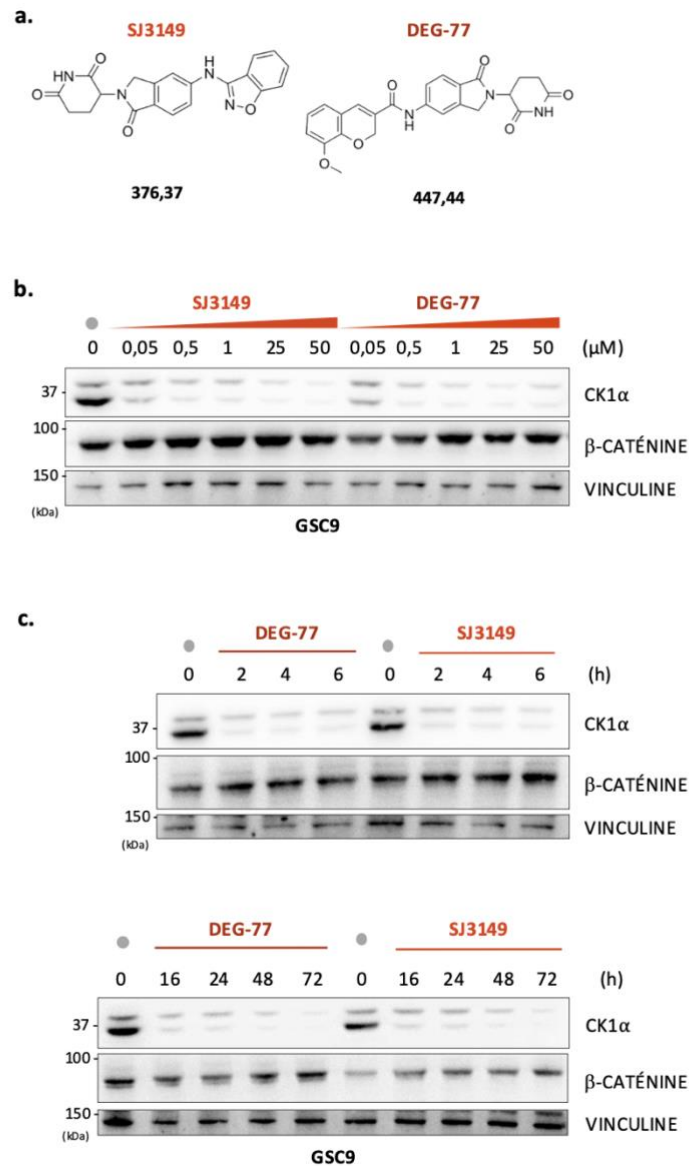
Chaque panel est représentatif d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire. Analyse statistique par t-test apparié et intervalle de confiance de 95%. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.



**Figure 8 : Efficacité limitée des glus moléculaires dérivées du lénalidomide dans les GSC.**

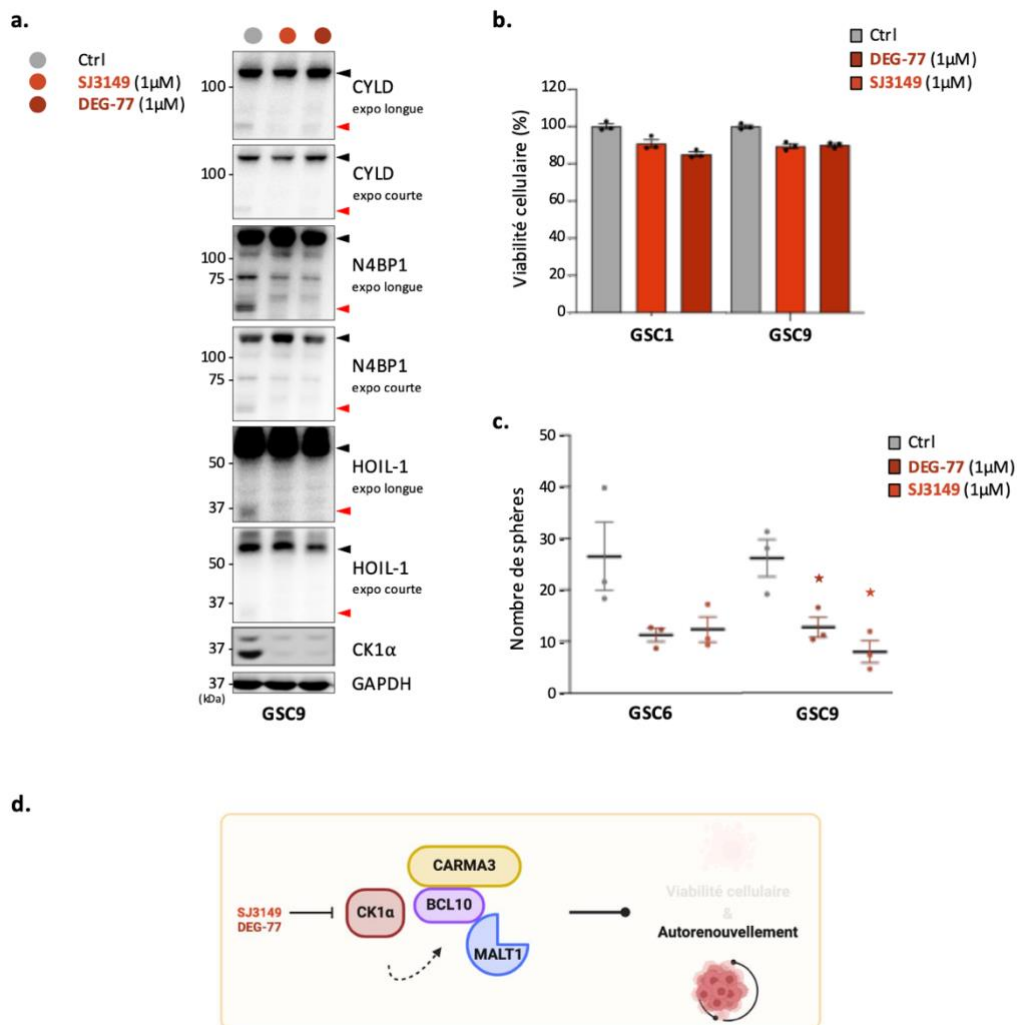
a. Structures chimiques et poids moléculaires du thalidomide, pomalidomide, lénalidomide, BTX161, FPFT-2216, TMX-4116 et TMX-4100, premières générations de glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$  (depuis le LÉNALIDOMIDE). b. Analyse par western-blot, dans les lysats protéiques de cellules de type souche de glioblastome (GSC1, GSC6 et GSC9), des niveaux d'expression de substrats (IKAROS, AIOLOS et CK1 $\alpha$ ) et de l'effecteur (CRBN) de la dégradation par les glus moléculaires. Deux lignées de cellules immunitaires (JURKAT et THP1) sont ajoutées comme contrôle positif d'expression de ces protéines. n = 1. c. Les trois types cellulaires BT549 (cancer du sein), MDA-MB-231 (cancer du sein) et macrophage ont été traités au BTX161 (10 $\mu$ M, 48h). Analyse par western-blot du niveau d'expression de CK1 $\alpha$ . d. Les GSC6 ont été traitées pendant 48h avec des doses croissantes de BTX161 (0, 25, 50, 75 et 100 $\mu$ M), sans transfection ou en présence d'agents de transfection lipofectamine (LP) ou gene juice (GJ) à la dose de 50 $\mu$ M. Analyse par western-blot du niveau d'expression de CK1 $\alpha$ . n = 1. e. Les GSC9 ont été traitées par des doses croissantes de lénalidomide (LÉNA, 0,1, 0,5 et 1 $\mu$ M), pomalidomide (POMA, 1, 5 et 10 $\mu$ M) et thalidomide (THALI, 1, 50 et 100 $\mu$ M). Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif. Analyse par western-blot, après 24h, du niveau d'expression de la protéine CK1 $\alpha$ . n = 1. f. Les GSC9 ont été traitées par BTX161 (50 $\mu$ M), FPFT-2216 (1 $\mu$ M), TMX-4100 (1 $\mu$ M) et TMX-4116 (1 $\mu$ M) durant différents temps (2, 24, 48 ou 72h). Analyse par western-blot du niveau d'expression de CK1 $\alpha$ . n = 1. b – f. VINCULINE, TUBULINE et GAPDH servent de contrôle de charge protéique. La masse moléculaire (en kDa) est indiquée sur la gauche.

Chaque panel est représentatif d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire.



**Figure 9 : Optimisation de l'utilisation des nouvelles générations de glus moléculaires.**

**a.** Structures chimiques et poids moléculaires du SJ3149 et DEG-77, nouvelle génération de glus moléculaires ciblant CK1α. **d.** Les GSC9 ont été traitées par des doses croissantes de SJ3149 ou DEG-77 (0,05, 0,5, 1, 25 et 50 μM, 24h). Le DMSO (0) est utilisé comme contrôle négatif. Analyse par western-blot des niveaux d'expression des protéines CK1α et β-CATÉLINE. n = 1. **c.** Les GSC9 ont été traitées par DEG-77 ou SJ3149 (1 μM) durant différents temps (2, 4, 6, 16, 24, 48 et 72h). Analyse par western-blot des niveaux d'expression des protéines CK1α et β-CATÉLINE. n = 1. **b et c.** La VINCLINE sert de contrôle de charge protéique. La masse moléculaire (en kDa) est indiquée sur la gauche.



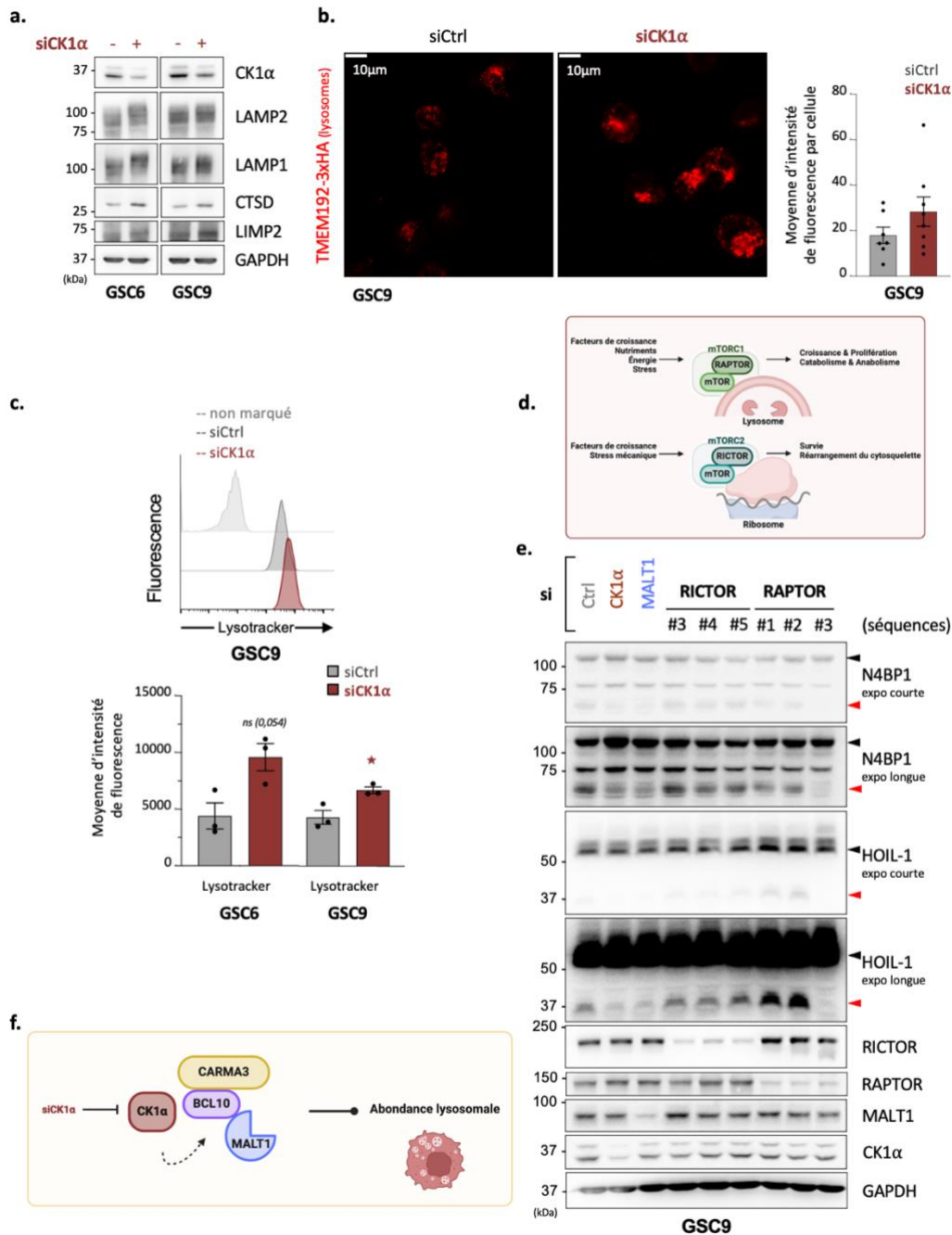
**Figure 10 : Les nouvelles générations de gus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$  réduisent l'expansion des GSC.**

a - c. Les GSC1 (b.) GSC6 (c.) et GSC9 (a - c) ont été traitées par SJ3149 ou DEG-77 (1µM, 72h). Le DMSO (Ctrl) est utilisé comme contrôle négatif. a. Analyse par western-blot des niveaux d'expression de la protéine CK1 $\alpha$  ainsi que des substrats de MALT1 : CYLD, N4BP1 et HOIL-1. La protéine entière est indiquée par une flèche noire, le produit de clivage par une flèche rouge. La GAPDH sert de contrôle de charge protéique. La masse moléculaire (en kDa) est indiquée sur la gauche. Deux expositions (expo courte et longue) sont montrées. b. La viabilité cellulaire des GSC1, GSC4 et GSC9 est estimée par la mesure d'ATP selon le test Cell Titer Glo après 72h. Les données normalisées sont présentées sous forme de moyenne +/- sd. c. Quantification du nombre de sphères par champs de vue.

d. Schéma illustrant le rôle de la protéine CK1 $\alpha$  dans l'expansion (autorenewement) des GSC.

Chaque panel est représentatif d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire.

Analyses statistiques par t-test non-apparié et intervalle de confiance de 95%.  $p^* < 0,0332$ .



**Figure 11 : CK1 $\alpha$  module l'abondance lysosomale.**

**a – c.** Les cellules de type souche de glioblastome (GSC6 et GSC9) ont été préalablement transfectées avec une séquence d'ARN double-brin ciblant CK1 $\alpha$  (siCK1 $\alpha$  ou +). Un ARN duplex non-ciblant est utilisé en contrôle (siCtrl ou -). **a.** Analyse par western-blot du niveau d'expression de protéines lysosomales : LAMP2, LAMP1, CTSD et LIMP2. L'efficacité du ciblage par ARN interférence est validée par l'immunoblot contre CK1 $\alpha$ . **b.** Analyse par microscopie confocale du marquage de la protéine lysosomale TMEM192x3HA (rouge) (barre d'échelle = 10 $\mu$ m) et représentation graphique de la quantification de l'intensité de fluorescence.  $n = 1$ . **c.** Analyse par cytométrie de flux de l'intensité de fluorescence du marquage des compartiments acides lysosomaux par la sonde LysoTracker. Des GSC6 et GSC9 non marquées (non marqué) sont utilisées comme contrôle négatif. Les graphes montrent les moyennes (+/- sd) d'intensité de fluorescence du LysoTracker dans les GSC6 et GSC9. **d.** Schéma simplifié représentant la place de mTOR dans les complexes mTORC1 (lysosomes) et mTORC2 (cytosol) des GSC. **e.** Les cellules de type souche de glioblastome (GSC9) ont été préalablement transfectées avec une séquence d'ARN double-brin ciblant CK1 $\alpha$  (siCK1 $\alpha$  ou +), MALT1 ou bien 3 séquences différentes ciblant RICTOR (#3, #4, #5) ou RAPTOR (#1, #2 et #3). Un ARN duplex non-ciblant est utilisé en contrôle (Ctrl). Analyse par western-blot des niveaux d'expression de CK1 $\alpha$ , MALT1, RICTOR et RAPTOR, ainsi que de deux substrats de MALT1 : N4BP1 et HOIL-1. La protéine entière est indiquée par une flèche noire, le produit de clivage par une flèche rouge. Deux expositions (expo courte et longue) sont montrées. La GAPDH sert de contrôle de charge protéique. La masse moléculaire (en kDa) est indiquée sur la gauche. **f.** Schéma illustrant le rôle de la protéine CK1 $\alpha$  dans le maintien de l'homéostasie lysosomale des GSC.

Chaque panel est représentatif d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire.

Analyses statistiques par t-test apparié et intervalle de confiance de 95%.  $p^* < 0,05$ .

## Discussion

Des travaux récents de mon équipe ont montré le rôle central de la paracaspase MALT1 dans la viabilité et l'expansion des GSC (207). Cependant, les cascades de signalisation régulant son activité restent mal connues. Dans le système immunitaire normal ou pathologique, l'activation de MALT1 se déroule au sein d'un complexe multiprotéique qui requiert la kinase CK1 $\alpha$  (74).

Ainsi, mon travail a pour but de déterminer si CK1 $\alpha$  est un régulateur de l'homéostasie des GSC, et d'apporter la preuve de concept que son ciblage, par les glus moléculaires, est une stratégie prometteuse à l'heure où le point de départ d'une meilleure prise en charge des patients atteints de GB pourrait reposer sur l'éradication spécifique de cette sous-population cellulaire.

Mes résultats commencent par la caractérisation du complexe CBM dans les GSC, et établissent que CK1 $\alpha$  interagit avec MALT1, qui présente une activité protéolytique basale. De plus, la réduction de l'expression de CK1 $\alpha$  bloque l'activité protéolytique de MALT1 et réduit l'expansion des GSC. Cet effet est associé à une dérégulation du flux lysosomal et à la mort des GSC. Ainsi, CK1 $\alpha$  fonctionnerait tel un rempart contre une augmentation de la quantité de lysosomes, nocive pour les GSC, contrôlant *in fine* la survie de ces cellules. C'est dans ce contexte, et pour se rapprocher de la clinique, que plusieurs générations de glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$  ont été testées et optimisées. Les dernières générations de ces petites molécules montrent une efficacité remarquable, reproduisant largement les effets observés avec l'inhibition de CK1 $\alpha$  par ARN interférent, et renforçant ainsi leur potentiel pour une application clinique.

## 8. Quelques pistes pour les mécanismes d'action de CK1 $\alpha$

Si le lien entre la kinase pléiotrope CK1 $\alpha$  et l'homéostasie des GSC a été établi dans ce travail, la signalisation intermédiaire reste à élucider. C'est dans ce sens que l'implication du complexe LUBAC et de la protéine TRAF6, dans le phénotype médié par l'inhibition de CK1 $\alpha$ , a été explorée.

### 8.1. Existe-t-il un lien entre les deux complexes multiprotéiques CBM et LUBAC dans les GSC ?

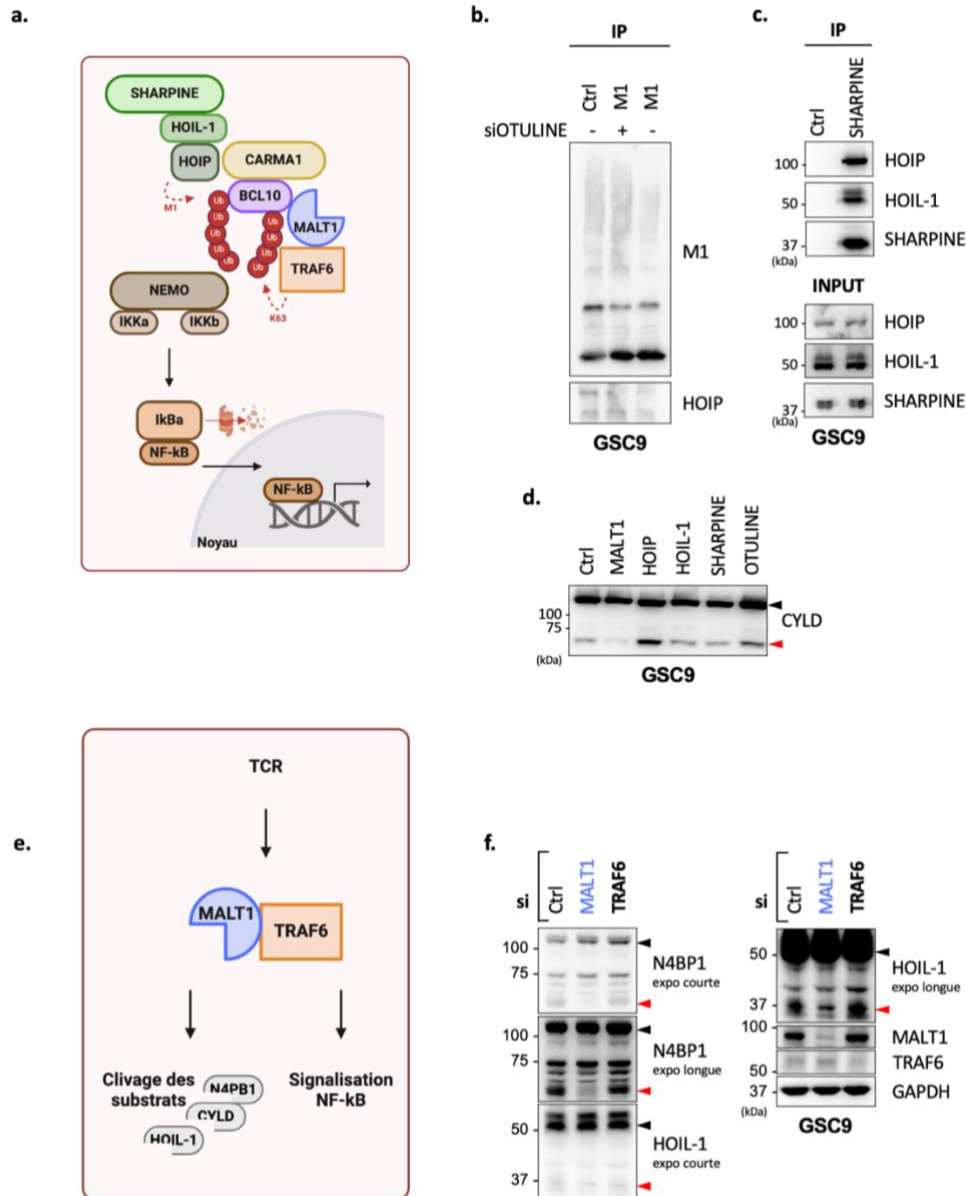
Le LUBAC (pour Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex) est, comme le CBM, impliqué dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Ce complexe multiprotéique E3 ligase a la capacité unique de lier des chaînes d'ubiquitine « linéaires » ou « liées à M1 », non-dégradatives (c'est-à-dire n'adressant pas au protéasome pour destruction) (218).

Il est composé du substrat de MALT1 : HOIL-1, de la protéine interagissant avec HOIL-1 : HOIP, centre catalytique du complexe, et de l'adaptateur : SHARPINE. Dans les lymphocytes non-activés, NF- $\kappa$ B est maintenu inactif dans le cytoplasme par sa liaison à l'inhibiteur de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ). L'activation de la voie canonique NF- $\kappa$ B induit l'assemblage du CBM, qui sert de plateforme pour le recrutement du LUBAC. Une fois recruté au CBM, le LUBAC appose des chaînes M1 d'ubiquitine sur BCL10. Ces modifications post-traductionnelles permettent le recrutement d'un nouveau complexe : IKK, composé des kinases IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et du modificateur essentiel de NF- $\kappa$ B NEMO, qui

reconnait spécifiquement les chaînes d'ubiquitine.  $I\kappa B\alpha$  sera alors phosphorylé puis dégradé, laissant NF- $\kappa$ B libre dans le cytoplasme et donc capable de transloquer dans le noyau pour induire la transcription de ces gènes cibles (**Figure supplémentaire 1.a**).

De plus, il semblerait que le clivage de HOIL-1, par MALT1, réduise l'ubiquitination linéaire de NEMO et de BCL10, atténuant ainsi la signalisation NF- $\kappa$ B (219)(220). Dans ce sens, des travaux suggèrent que la poly-ubiquitination K63 de BCL10, médiée par le partenaire de MALT1 TRAF6, permettrait son adressage au LUBAC, qui serait nécessaire au recrutement de NEMO au CBM et donc à la transmission de la signalisation NF- $\kappa$ B (221).

Les deux complexes multiprotéiques CBM et LUBAC apparaissent ainsi étroitement liés dans la voie NF- $\kappa$ B. Il serait donc intéressant de questionner le rôle du LUBAC dans la régulation de la signalisation du CBM dans les GSC, qui intervient dans un contexte où la voie NF- $\kappa$ B n'est pas activée. Une caractérisation préliminaire de ce complexe dans les GSC révèle un LUBAC fonctionnel (**Figure supplémentaire 1.b**) et préassemblé (**Figure supplémentaire 1.c**) dans les cellules dérivées de patient GSC9. De plus, la diminution de l'expression de HOIP, HOIL-1, SHARPINE et OTULINE (une dé-ubiquitinase régulant le LUBAC) par ARN interférent montre que le LUBAC module l'activité protéolytique de MALT1. En effet, le clivage du substrat de MALT1 CYLD semble augmenter lorsque la protéine HOIP est moins exprimée et, à contrario, diminué lorsque les protéines HOIL-1 et SHARPINE sont moins exprimées (**Figure supplémentaire 1.d**). Si l'activité enzymatique du LUBAC semble directement impacter celle du CBM, il conviendrait également d'investiguer le rôle d'une potentielle interaction physique de ces deux complexes. Pour cela, le recrutement du LUBAC au CBM pourrait être étudié par co-immunoprécipitation.



### Figure supplémentaire 1 : Quelques pistes pour les mécanismes d'action de CK1α.

a. Schéma simplifié illustrant la place du complexe LUBAC dans la voie canonique NF-κB. **b, d et f.** Les cellules de type souche de glioblastome (GSC9) ont été préalablement transfectées avec une séquence d'ARN double-brin ciblant OTULINE (siOTULINE + ou OTULINE), MALT1 (MALT1), HOIP (HOIP), HOIL-1 (HOIL-1) ou SHARPINE (SHARPINE). Un ARN duplex non-ciblant est utilisé en contrôle (Ctrl). **b.** Les chaînes d'ubiquitine M1 endogènes sont immunoprécipitées (IP) dans les lysats protéiques de cellules de glioblastome de type souche (GSC9). Une immunoglobuline de même isotype (Ctrl) est utilisée en contrôle de spécificité. Une analyse par western-blot de protéines est réalisée afin de détecter la présence de ces chaînes d'ubiquitine M1 en complexe avec la protéine HOIP.  $n = 2$ . **c.** La protéine SHARPINE endogène est immunoprécipitée (IP) dans les lysats protéiques de cellules de glioblastome de type souche (GSC9). Une immunoglobuline de même isotype (Ctrl) est utilisée en contrôle de spécificité. Une analyse par western-blot de protéines est réalisée afin de détecter la présence de SHARPINE en complexe avec les protéines HOIP et HOIL-1. L'INPUT est également ajouté comme contrôle de la qualité de l'IP. **d et f.** Analyse par western-blot du niveau d'expression des protéines MALT1, TRAF6 et des substrats de MALT1 : N4BP1, HOIL-1 (f.) et CYLD (d.). La protéine entière est indiquée par une flèche noire, le produit de clivage par une flèche rouge. Deux expositions (expo courte et longue) sont montrées. La protéine entière est indiquée par une flèche noire, le produit de clivage par une flèche rouge. **e.** Schéma illustrant la double fonction de MALT1, avec l'implication de la protéine TRAF6 dans la propriété d'échafaudage. **b, c, d et f.** La GAPDH sert de contrôle de charge protéique. Elle est absente en **d**. La masse moléculaire (en kDa) est indiquée sur la gauche, excepté en **b**. Chaque panel est représentatif d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire.

## 8.2. La protéine TRAF6 joue-t-elle un rôle de régulateur négatif sur l'activité protéolytique de MALT1 dans les GSC ?

MALT1 est une protéine au double rôle de paracaspase et d'échafaudage. Cette deuxième fonction contribue au recrutement de la E3 ubiquitine ligase TRAF6 au CBM, induisant l'activation de la voie canonique NF- $\kappa$ B. L'interaction TRAF6-MALT1 régule négativement l'activité protéolytique basale de MALT1 dans les lymphocytes T au repos (78)(**Figure supplémentaire 1.e**). Puisque les GSC possèdent une activité basale de MALT1, il serait intéressant d'étudier l'impact de TRAF6 sur l'activité enzymatique de MALT1 et l'homéostasie lysosomale et cellulaire des GSC.

Mes résultats préliminaires montrent que lorsque l'expression de TRAF6 est diminuée par ARN interférent, le clivage des substrats de MALT1 (N4BP1 et HOIL-1) est augmenté (**Figure supplémentaire 1.f**). De plus, la réduction d'expression de TRAF6 n'impacte pas la viabilité des GSC (résultats non montrés).

Il conviendra désormais d'évaluer si dans les GSC, comme dans les lymphocytes, TRAF6 régule MALT1 via l'apposition de chaînes K63 d'ubiquitine. Pour cela, MALT1 sera immunoprécipité à partir de lysat de GSC exprimant ou non TRAF6 pour ensuite étudier le profil d'ubiquitination par western-blot. Également, des expériences de TUBE (pour Tandem Ubiquitin-Binding Entities), permettant de détecter et d'isoler spécifiquement les protéines ubiquitinées en utilisant des domaines de liaison à l'ubiquitine (222), pourront être réalisées pour confirmer ou infirmer ce mécanisme de régulation de MALT1.

De plus, des résultats préliminaires semblent montrer une faible expression de TRAF6 dans les GSC. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la surexpression de TRAF6 sur l'activité protéolytique constitutive de MALT1. D'autant plus que la répression de l'expression de l'isoforme TRAF3, par hyperméthylation de son promoteur, est déjà décrite dans le GB comme étant un mécanisme protecteur vis-à-vis de la mort cellulaire induite par la peroxydation des lipides (223). Ainsi, l'étude du statut de méthylation du promoteur de TRAF6 permettrait de savoir si ce même mécanisme régulateur est à l'œuvre dans les GSC, et donc de répondre à la question : la faible expression de TRAF6 dans les GSC explique-t-elle l'activité enzymatique basale de MALT1 ?

## 9. Quel est le rôle de l'activité kinase de CK1 $\alpha$ ?

Les travaux réalisés dans le cadre de mon projet suggèrent que CK1 $\alpha$  s'assemble dans le complexe CBM au sein duquel MALT1 exerce son activité protéolytique (**Figure 5 et Figure 6**). En effet, MALT1 interagit avec BCL10 et CK1 $\alpha$  dans les GSC, cultivées en condition optimale en facteurs de croissance. Alors que les GSC n'expriment pas CARMA1 mais CARMA3 (56), son association à ce complexe n'a pas pu être établie, faute d'anticorps spécifiques. Des travaux antérieurs ont permis de montrer que CK1 $\alpha$  phosphoryle la protéine CARMA1, en réponse à l'activation des récepteurs antigéniques dans les lymphocytes (224)(225). Ceci induit un changement de conformation puis le recrutement du dimère BCL10-MALT1, culminant dans l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (226). Ce mécanisme serait également piraté dans les cellules de lymphomes ABC DLBCL. Dans ce contexte, l'extinction de l'expression de CK1 $\alpha$  abolit la signalisation NF- $\kappa$ B aberrante et est toxique pour ces cellules (226) (224). Bien que la contribution de l'activité kinase de CK1 $\alpha$  à cette fonction dans les GSC reste inconnue, il est possible que CK1 $\alpha$  permette l'assemblage du complexe CBM au sein duquel MALT1, régulateur central de l'homéostasie lysosomale, serait protéolytiquement actif. Ainsi, afin d'élucider le rôle de la

fonction kinase de CK1 $\alpha$ , une approche par perte de fonction pourrait être envisagée, via l'expression d'une forme catalytiquement inactive (D136N), soit via la transduction de vecteurs lentiviraux, soit par édition génique (knock-in par CRISPR-Cas9). L'impact sur l'activité protéase de MALT1 pourrait alors être évalué.

## 10. Quels sont les impacts fonctionnels de CK1 $\alpha$ dans l'expansion des GSC ?

Mes résultats suggèrent que l'inhibition transitoire de CK1 $\alpha$  induit une augmentation du nombre de lysosomes, fatale aux GSC (**Figure 11**), récapitulant le phénotype provoqué par l'inhibition de MALT1 (56) (212). Il paraît cependant nécessaire de caractériser plus précisément l'effet fonctionnel provoqué par l'inhibition de CK1 $\alpha$ . Un phénomène de mort cellulaire est-il induit et si tel est le cas de quel(s) type(s) s'agit-il ?

Premièrement, les lysosomes sont des éléments essentiels à l'homéostasie cellulaire de par les nombreuses fonctions qu'ils accomplissent. Notamment, ces organites peuvent contribuer à une forme particulière de mort cellulaire programmée, appelée mort cellulaire lysosomale, dont l'incident central est la Perméabilisation de la Membrane Lysosomale (PML)(227). De plus, les lysosomes participent activement aux processus autophagiques via leur fonction dégradative sélective des macromolécules. Il serait donc intéressant d'étudier les impacts de l'inhibition de CK1 $\alpha$  sur l'homéostasie lysosomale et autophagique, par un suivi des marqueurs de la fonction lysosomale et autophagique par western-blot, imagerie et cytométrie. Alternativement, la baisse du nombre de cellules viables dans les cellules ayant reçu un ARNi contre CK1 $\alpha$  pourrait dépendre d'une modification du taux de prolifération. Outre des suivis du cycle cellulaire (incorporation EdU, expression des cyclines et p-H3, (228)), des tests fonctionnels spécifiques des cellules souches (mesure de l'auto-renouvellement, formation de sphères secondaires, ou expression de marqueurs souches) pourraient permettre de préciser le rôle de CK1 $\alpha$  dans l'homéostasie des GSC.

Enfin, si une première investigation *in vitro* a été menée lors de ce projet, une caractérisation *in vivo* permettrait de confirmer ces résultats. Dans ce contexte, un modèle inductible serait particulièrement pertinent. En effet, des cellules de patients exprimant un shARN ciblant CK1 $\alpha$  et placé sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline seraient implantées en intracrânien. Ainsi, cette stratégie de xénogreffe orthotopique permettrait le suivi de la croissance tumorale, ainsi que de la survie des animaux (228).

## 11. Quel est l'impact sur les GSC de l'ajout du ciblage de CK1 $\alpha$ au protocole thérapeutique standard ?

### 11.1. *In vitro*, existe-t-il une synergie entre les glus moléculaires, le TMZ et la radiothérapie ?

Le protocole thérapeutique de prise en charge des patients atteints de GB repose sur une résection chirurgicale maximale, suivi de séances concomitantes de chimiothérapie, au TMZ, et de radiothérapie (**Figure 1**)(7). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer *in vitro* si le ciblage de CK1 $\alpha$  par les glus moléculaires agit en synergie avec les thérapies standards. Une stratégie pourrait être de traiter, dans un premier temps, des GSC par SJ3149

ou DEG-77 pendant 16 heures (temps permettant l'obtention d'une dégradation efficace de CK1 $\alpha$ , comme montré dans la **Figure 9**), puis, dans un second temps, par TMZ. Cet ordre est justifié par le fait que CK1 $\alpha$  participe à la DDR (152), qui pourrait compromettre l'action de l'agent alkylant de l'ADN TMZ, d'autant plus que les GSC sont résistantes à ce traitement. Suite à cela, les cellules seraient irradiées (dose unique 2 Gy) et un test de viabilité cellulaire réalisé (soit par le suivi en Incucyte d'une sonde de viabilité, soit par la mesure de l'activité métabolique cellulaire par le test CellTiter Glo). Cela permettrait enfin de déterminer le score de Bliss, un indice qui compare l'effet sur la viabilité d'une combinaison thérapeutique à ceux des traitements seuls.

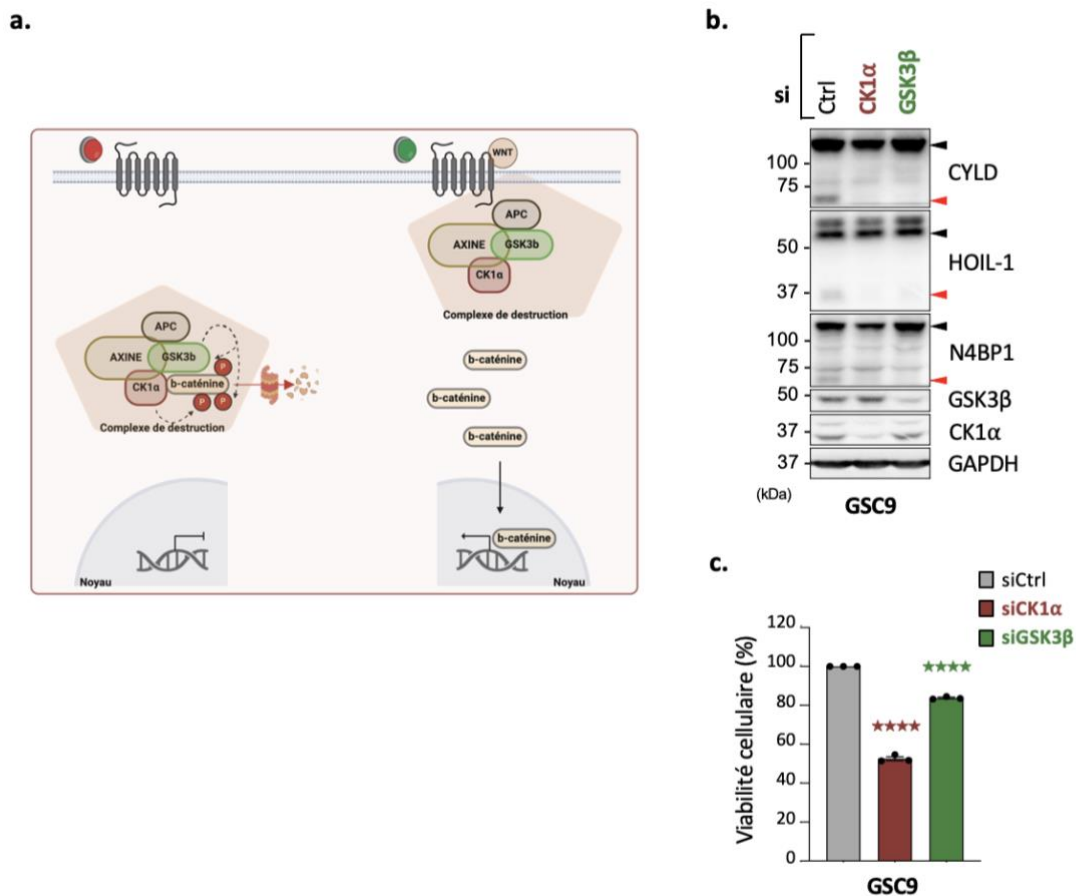
## 11.2. *In vivo*, existe-t-il une synergie entre les glus moléculaires et le TMZ ?

Dans la suite logique des analyses *in vitro*, qui révèlent d'ores et déjà le potentiel des glus moléculaires dans le ciblage des GSC, il serait intéressant d'évaluer s'il existe une synergie entre les dégradeurs de CK1 $\alpha$  et le TMZ, dans un modèle de souris immunodéficientes. Pour cela, une stratégie de xénogreffe orthotopique pourra être mise en place pour suivre la croissance tumorale et la survie des animaux.

## 12. Le phénotype observé lors de l'inhibition de CK1 $\alpha$ dans les GSC ne peut-il pas s'expliquer par la perturbation simultanée de plusieurs voies de signalisation ?

CK1 $\alpha$  est une protéine pléiotrope, donc impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, il serait également pertinent de déterminer si le ciblage de CK1 $\alpha$  altère d'autres signalisations intracellulaires. Par exemple, CK1 $\alpha$  participe à la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en régulant, de concert avec la kinase GSK3 $\beta$ , les niveaux protéiques de  $\beta$ -caténine cytosolique (229). En l'absence de ligand Wnt, la  $\beta$ -caténine est retrouvée dans le cytoplasme, membre de son propre complexe de destruction (avec les protéines AXINE, APC, CK1 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ ). Au sein de ce complexe, CK1 $\alpha$  peut primo-phosphoryler la  $\beta$ -caténine, qui est ensuite bi-phosphorylée par GSK3 $\beta$ . Cette forme tri-phosphorylée de la  $\beta$ -caténine est un signal d'adressage au protéasome pour dégradation, l'empêchant d'atteindre le noyau (**Figure supplémentaire 2.a**). Lorsqu'un ligand Wnt se fixe à son récepteur, le complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine est recruté à la membrane, laissant cette dernière libre de s'accumuler dans le cytoplasme et de transloquer dans le noyau pour transcrire ses gènes cibles (**Figure supplémentaire 2.a**).

Ainsi, un potentiel rôle de GSK3 $\beta$  dans la signalisation du CBM serait donc intéressant à envisager et investiguer. Dans ce sens, mes résultats préliminaires suggèrent que la réduction de l'expression de GSK3 $\beta$  par ARN interférence réduit l'activité protéolytique de MALT1 (**Figure supplémentaire 2.b**) et diminue d'environ 20% la viabilité des GSC (**Figure supplémentaire 2.c**). L'impact de GSK3 $\beta$  sur l'homéostasie lysosomale restera cependant à étudier.



## Figure supplémentaire 2 : Le phénotype observé lors de l'inhibition de CK1 $\alpha$ dans les GSC ne peut-il pas s'expliquer par la perturbation simultanée de plusieurs voies de signalisation ?

**a.** Schéma simplifié de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. **b et c.** Les cellules de type souche de glioblastome (GSC9) ont été préalablement transfectées avec une séquence d'ARN double-brin ciblant CK1 $\alpha$  (siCK1 $\alpha$ ) ou GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Un ARN duplex non-ciblant est utilisé en contrôle (Ctrl). **b.** Analyse par western-blot des niveaux d'expression des protéines CK1 $\alpha$ , GSK3 $\beta$  ainsi que des substrats de MALT1 : CYLD, HOIL-1 et N4BP1. La protéine entière est indiquée par une flèche noire, le produit de clivage par une flèche rouge. La GAPDH sert de contrôle de charge protéique. La masse moléculaire (en kDa) est indiquée sur la gauche. **c.** La viabilité cellulaire des GSC9 est estimée par la mesure d'ATP selon le test métabolique Cell Titer Glo après 72h. Les données normalisées sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  sd.

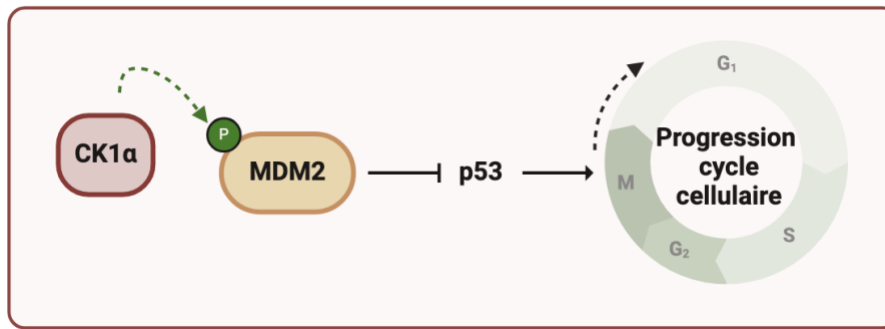
Chaque panel est représentatif d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire.

Analyses statistiques par t-test non-apparié et intervalle de confiance de 95%. p\*\*\*\* < 0,0332.

Tout comme pour CK1 $\alpha$ , le rôle de la fonction kinase de GSK3 $\beta$  est à préciser. Une fois la caractérisation des missions de ces deux kinases dans l'activité protéolytique de MALT1 et l'homéostasie des GSC, il conviendra d'investiguer leur potentielle collaboration. Dans ce but, les profils de phosphorylation des différents membres du CBM, en présence ou non de CK1 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ , seront étudiés par Phos-Tag (puis phospho-protéomique).

Également, CK1 $\alpha$  participe au cycle cellulaire en phosphorylant MDM2, inhibiteur connu du suppresseur de tumeur p53. Cette phosphorylation activatrice permet à la protéine MDM2 de jouer son rôle de régulateur négatif, et donc au cycle cellulaire de progresser (**Figure 12**).

L'analyse du statut p53 de notre modèle cellulaire révèle une nouvelle fois une hétérogénéité dans les GSC, avec une majorité exprimant une version mutée de p53. Ainsi, il apparaît important d'évaluer l'impact du ciblage de CK1 $\alpha$  sur la division cellulaire. Cela pourra notamment être fait par une analyse du cycle cellulaire.

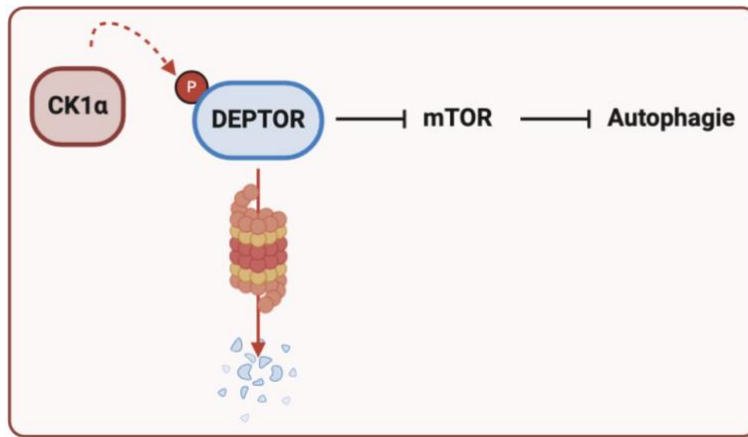


**Figure 12 : Schéma illustrant le rôle simplifié de CK1 $\alpha$  dans la voie de signalisation p53.**

CK1 $\alpha$  phosphoryle MDM2, inhibiteur connu du suppresseur de tumeur p53. Cette phosphorylation activatrice permet à la protéine MDM2 de jouer son rôle de régulateur négatif, et donc au cycle cellulaire de progresser.

Enfin, CK1 $\alpha$  est également impliquée dans la voie mTOR, et donc indirectement dans l'autophagie. Effectivement, CK1 $\alpha$  phosphoryle DEPTOR, régulateur négatif connu de la voie mTOR. Cette phosphorylation dégradative l'envoie directement au protéasome, l'empêchant donc d'exercer son rôle d'inhibiteur. Ainsi, la voie mTOR est activée pour permettre la croissance et la prolifération cellulaire, en favorisant notamment des processus anaboliques à ceux cataboliques caractéristiques de l'autophagie (**Figure 13**). De plus, MALT1 est un régulateur de l'homéostasie endolysosomale et de la terminaison de l'autophagie dans les GSC (56). Son inhibition entraîne en effet une augmentation de la quantité de lysosomes, associée à un dysfonctionnement de cet organelle qui se traduit par une PML, ainsi qu'une abortion du flux autophagique dans les GSC (56).

Il serait donc intéressant d'analyser l'effet de l'inhibition de CK1 $\alpha$ , sur le flux autophagique, la qualité et fonction des lysosomes, ainsi que la signalisation mTOR. Pour se faire, le statut de phosphorylation de DEPTOR pourra également être exploré par Phos-Tag. Une étude par immunofluorescence et western-blot de marqueurs autophagiques (tels que p62 et LC3B) et lysosomaux (tels que LAMP2, CATHEPSINE D, LIMP2) pourra également être réalisée. Plus particulièrement pour les marqueurs autophagiques, le niveau protéique de p62, qui augmente lors d'une activation ou d'un défaut de flux autophagique, pourra être étudié par western-blot. En outre, le profil de lipidation de LC3B pourra être établi. En effet, la protéine LC3B est présente dans les cellules sous deux formes : lipidée, témoin d'une activation du processus autophagique, et non lipidée. L'analyse par western-blot révèle ainsi deux bandes protéiques qui renseignent sur le déroulement du processus autophagique : l'accumulation de la forme lipidée (normalement dégradée) signant un flux autophagique important ou bien un défaut dans le processus autophagique. L'analyse par immunofluorescence de ces deux marqueurs reposera sur la visualisation de puncta en cas d'induction de l'autophagie (par opposition à un marquage cellulaire diffus en absence d'autophagie).



**Figure 13 : Schéma illustrant le rôle simplifié de CK1 $\alpha$  dans la voie de signalisation mTOR.**

CK1 $\alpha$  phosphoryle DEPTOR, régulateur négatif connu de la voie mTOR. Cette phosphorylation dégradative l'envoie directement au protéasome où il sera détruit, l'empêchant donc d'exercer son rôle d'inhibiteur. Ainsi, la voie mTOR est activée pour permettre la croissance et la prolifération cellulaire, en favorisant notamment des processus anaboliques à ceux cataboliques caractéristiques de l'autophagie.

## Bibliographie

1. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2 août 2021;23(8):1231-51.
2. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. *Neuro Oncol.* 5 oct 2022;24(Suppl 5):v1-95.
3. Fabbro-Peray P, Zouaoui S, Darlix A, Fabbro M, Pallud J, Rigau V, et al. Association of patterns of care, prognostic factors, and use of radiotherapy–temozolomide therapy with survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a French national population-based study. *J Neurooncol.* 2019;142(1):91-101.
4. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, et al. Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers (Basel).* 10 août 2011;3(3):3242-78.
5. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 1 janv 2017;18(1):3-9.
6. Prasad G, Haas-Kogan DA. Radiation-induced gliomas. *Expert Rev Neurother.* oct 2009;9(10):10.1002/pmic.200800802.
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 10 mars 2005;352(10):987-96.
8. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology.* 1 mai 2009;10(5):459-66.
9. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 15 déc 2015;314(23):2535-43.
10. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, et al. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med.* 16 nov 2017;377(20):1954-63.
11. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy–temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 20 févr 2014;370(8):709-22.
12. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 20 févr 2014;370(8):699-708.
13. Nagpal S, Harsh G, Recht L. Bevacizumab improves quality of life in patients with recurrent glioblastoma. *Chemother Res Pract.* 2011;2011:602812.
14. Bikfalvi A, da Costa CA, Avril T, Barnier JV, Bauchet L, Brisson L, et al. Challenges in glioblastoma research: focus on the tumor microenvironment. *Trends Cancer.* janv 2023;9(1):9-27.
15. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 17 févr 1994;367(6464):645-8.

16. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* juill 1997;3(7):730-7.
17. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* déc 2003;3(12):895-902.
18. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* nov 2001;414(6859):105-11.
19. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 6 oct 2017;23(10):1124-34.
20. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 27 mars 1992;255(5052):1707-10.
21. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell.* nov 2007;1(5):515-28.
22. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* nov 2004;432(7015):396-401.
23. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 15 sept 2003;63(18):5821-8.
24. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 1 oct 2004;64(19):7011-21.
25. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 15 juin 2015;29(12):1203-17.
26. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 9 déc 2003;100(25):15178-83.
27. Trépant AL, Bouchart C, Rorive S, Sauvage S, Decaestecker C, Demetter P, et al. Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms. *Tumour Biol.* mars 2015;36(3):1943-53.
28. Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J.* 4 août 2010;29(15):2659-74.
29. Jin X, Jin X, Jung JE, Beck S, Kim H. Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 19 avr 2013;433(4):496-501.
30. Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells. *Cell.* 30 mars 2012;149(1):36-47.
31. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, et al. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Research.* 15 août 2006;66(16):7843-8.
32. Treps L, Perret R, Edmond S, Ricard D, Gavard J. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2017;6(1):1359479.

33. El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idbaih A, et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain*. avr 2010;133(Pt 4):973-82.
34. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 28 mars 2013;153(1):139-52.
35. Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 1 nov 2016;2(11):1460-9.
36. Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, et al. Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia*. sept 2011;13(9):784-91.
37. Winkler F, Kienast Y, Fuhrmann M, Von Baumgarten L, Burgold S, Mitteregger G, et al. Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia*. sept 2009;57(12):1306-15.
38. Volovetz J, Berezovsky AD, Alban T, Chen Y, Lauko A, Aranjuez GF, et al. Identifying conserved molecular targets required for cell migration of glioblastoma cancer stem cells. *Cell Death Dis*. 26 févr 2020;11(2):1-12.
39. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*. 2 déc 2006;5(1):67.
40. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 10 mars 2005;352(10):997-1003.
41. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. août 2012;488(7412):522-6.
42. Deleyrolle LP, Harding A, Cato K, Siebzehnrubl FA, Rahman M, Azari H, et al. Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. *Brain*. mai 2011;134(5):1331-43.
43. Xie XP, Laks DR, Sun D, Ganbold M, Wang Z, Pedraza AM, et al. Quiescent human glioblastoma cancer stem cells drive tumor initiation, expansion, and recurrence following chemotherapy. *Dev Cell*. 10 janv 2022;57(1):32-46.e8.
44. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. déc 2006;444(7120):756-60.
45. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*. 19 janv 2010;17(1):98.
46. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 10 juill 2017;32(1):42-56.e6.
47. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 20 juin 2014;344(6190):1396-401.

48. Gill BJ, Pisapia DJ, Malone HR, Goldstein H, Lei L, Sonabend A, et al. MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 août 2014;111(34):12550-5.
49. Bastola S, Pavlyukov MS, Yamashita D, Ghosh S, Cho H, Kagaya N, et al. Glioma-initiating cells at tumor edge gain signals from tumor core cells to promote their malignancy. *Nat Commun*. 16 sept 2020;11(1):4660.
50. Yuan S, Norgard RJ, Stanger BZ. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov*. juill 2019;9(7):837-51.
51. Yabo YA, Niclou SP, Golebiewska A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 4 mai 2022;24(5):669-82.
52. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*. 8 août 2019;178(4):835-849.e21.
53. Minata M, Audia A, Shi J, Lu S, Bernstock J, Pavlyukov MS, et al. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation. *Cell Rep*. 12 févr 2019;26(7):1893-1905.e7.
54. Ballabio A, Bonifacino JS. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. févr 2020;21(2):101-18.
55. Shingu T, Ho AL, Yuan L, Zhou X, Dai C, Zheng S, et al. Qki deficiency maintains stemness of glioma stem cells in suboptimal environment by downregulating endolysosomal degradation. *Nat Genet*. janv 2017;49(1):75-86.
56. Jacobs KA, André-Grégoire G, Maghe C, Thys A, Li Y, Harford-Wright E, et al. Paracaspase MALT1 regulates glioma cell survival by controlling endo-lysosome homeostasis. *EMBO J*. 2 janv 2020;39(1):e102030.
57. Le Joncour V, Filppu P, Hyvönen M, Holopainen M, Turunen SP, Sihto H, et al. Vulnerability of invasive glioblastoma cells to lysosomal membrane destabilization. *EMBO Mol Med*. juin 2019;11(6):e9034.
58. Jensen SS, Petterson SA, Halle B, Aaberg-Jessen C, Kristensen BW. Effects of the lysosomal destabilizing drug siramesine on glioblastoma in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 7 mars 2017;17(1):178.
59. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, et al. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*. 1 juin 1999;93(11):3601-9.
60. Akagi T, Motegi M, Tamura A, Suzuki R, Hosokawa Y, Suzuki H, et al. A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene*. 14 oct 1999;18(42):5785-94.
61. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*. oct 2000;6(4):961-7.
62. Che T, You Y, Wang D, Tanner MJ, Dixit VM, Lin X. MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 16 avr 2004;279(16):15870-6.
63. Ruland J, Duncan GS, Wakeham A, Mak TW. Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity*. nov 2003;19(5):749-58.

64. Ruefli-Brasse AA, French DM, Dixit VM. Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science*. 28 nov 2003;302(5650):1581-4.
65. McAllister-Lucas LM, Lucas PC. Finally, MALT1 is a protease! *Nat Immunol*. mars 2008;9(3):231-3.
66. Rebeaud F, Hailfinger S, Posevitz-Fejfar A, Tapernoux M, Moser R, Rueda D, et al. The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol*. mars 2008;9(3):272-81.
67. Coornaert B, Baens M, Heyninck K, Bekaert T, Haegman M, Staal J, et al. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat Immunol*. mars 2008;9(3):263-71.
68. Ruland J, Hartjes L. CARD-BCL-10-MALT1 signalling in protective and pathological immunity. *Nat Rev Immunol*. févr 2019;19(2):118-34.
69. Bell PA, Scheuermann S, Renner F, Pan CL, Lu HY, Turvey SE, et al. Integrating knowledge of protein sequence with protein function for the prediction and validation of new MALT1 substrates. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022;20:4717-32.
70. Juilland M, Thome M. Holding All the CARDs: How MALT1 Controls CARMA/CARD-Dependent Signaling. *Front Immunol* [Internet]. 30 août 2018 [cité 27 févr 2025];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01927/full>
71. Gui Z, Zhang Y, Zhang A, Xia W, Jia Z. CARMA3: A potential therapeutic target in non-cancer diseases. *Front Immunol*. 22 déc 2022;13:1057980.
72. McAuley JR, Freeman TJ, Ekambaram P, Lucas PC, McAllister-Lucas LM. CARMA3 Is a Critical Mediator of G Protein-Coupled Receptor and Receptor Tyrosine Kinase-Driven Solid Tumor Pathogenesis. *Front Immunol* [Internet]. 15 août 2018 [cité 20 mars 2025];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01887/full>
73. Meininger I, Krappmann D. Lymphocyte signaling and activation by the CARMA1-BCL10-MALT1 signalosome. *Biol Chem*. 1 déc 2016;397(12):1315-33.
74. Bidère N, Ngo VN, Lee J, Collins C, Zheng L, Wan F, et al. Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. *Nature*. 5 mars 2009;458(7234):92-6.
75. David L, Li Y, Ma J, Garner E, Zhang X, Wu H. Assembly mechanism of the CARMA1-BCL10-MALT1-TRAF6 signalosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 févr 2018;115(7):1499-504.
76. Matsumoto R, Wang D, Blonska M, Li H, Kobayashi M, Pappu B, et al. Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Immunity*. déc 2005;23(6):575-85.
77. Schlauderer F, Seeholzer T, Desfosses A, Gehring T, Strauss M, Hopfner KP, et al. Molecular architecture and regulation of BCL10-MALT1 filaments. *Nat Commun*. 2 oct 2018;9(1):4041.
78. O'Neill TJ, Seeholzer T, Gewies A, Gehring T, Giesert F, Hamp I, et al. TRAF6 prevents fatal inflammation by homeostatic suppression of MALT1 protease. *Sci Immunol*. 12 nov 2021;6(65):eabh2095.
79. Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell*. 7 mai 2004;14(3):289-301.

80. Qiao Q, Yang C, Zheng C, Fontán L, David L, Yu X, et al. Structural architecture of the CARMA1/Bcl10/MALT1 signalosome: nucleation-induced filamentous assembly. *Mol Cell*. 26 sept 2013;51(6):766-79.
81. Gewies A, Gorka O, Bergmann H, Pechloff K, Petermann F, Jeltsch KM, et al. Uncoupling Malt1 threshold function from paracaspase activity results in destructive autoimmune inflammation. *Cell Rep*. 20 nov 2014;9(4):1292-305.
82. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- $\kappa$ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Sig Transduct Target Ther*. 21 sept 2020;5(1):1-23.
83. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*. mai 2007;26(22):3214-26.
84. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 8 févr 2008;132(3):344-62.
85. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 22 nov 1999;18(49):6853-66.
86. Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer*. 15 oct 1983;52(8):1410-6.
87. Rosebeck S, Madden L, Jin X, Gu S, Apel IJ, Appert A, et al. Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF-kappaB activation. *Science*. 28 janv 2011;331(6016):468-72.
88. Nie Z, Du MQ, McAllister-Lucas LM, Lucas PC, Bailey NG, Hogaboam CM, et al. Conversion of the LIMA1 tumour suppressor into an oncogenic LMO-like protein by API2-MALT1 in MALT lymphoma. *Nat Commun*. 8 janv 2015;6(1):5908.
89. Kiesewetter B, Lamm W, Dolak W, Lukas J, Mayerhoefer ME, Weber M, et al. Transformed mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: A single institution retrospective study including polymerase chain reaction-based clonality analysis. *Br J Haematol*. août 2019;186(3):448-59.
90. Maeshima AM, Taniguchi H, Toyoda K, Yamauchi N, Makita S, Fukuhara S, et al. Clinicopathological features of histological transformation from extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue to diffuse large B-cell lymphoma: an analysis of 467 patients. *Br J Haematol*. sept 2016;174(6):923-31.
91. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 12 avr 2018;378(15):1396-407.
92. Liang X, Cao Y, Li C, Yu H, Yang C, Liu H. MALT1 as a promising target to treat lymphoma and other diseases related to MALT1 anomalies. *Med Res Rev*. juill 2021;41(4):2388-422.
93. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 6 mars 2009;136(5):823-37.
94. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. juin 2010;2(6):a000109.
95. Carvalho G, Le Guelte A, Demian C, Vazquez A, Gavard J, Bidère N. Interplay between BCL10, MALT1 and IkappaBalpha during T-cell-receptor-mediated NFkappaB activation. *J Cell Sci*. 15 juill 2010;123(Pt 14):2375-80.

96. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor- $\kappa$ B in autoimmunity. *Trends Immunol.* juin 2013;34(6):282-9.
97. Goldenberg MM. Multiple Sclerosis Review. *P T.* mars 2012;37(3):175-84.
98. Steinman L, Zamvil SS. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol.* nov 2005;26(11):565-71.
99. Brüstle A, Brenner D, Knobbe CB, Lang PA, Virtanen C, Hershenfield BM, et al. The NF- $\kappa$ B regulator MALT1 determines the encephalitogenic potential of Th17 cells. *J Clin Invest.* déc 2012;122(12):4698-709.
100. Mc Guire C, Elton L, Wieghofer P, Staal J, Voet S, Demeyer A, et al. Pharmacological inhibition of MALT1 protease activity protects mice in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 21 juill 2014;11:124.
101. Punwani D, Wang H, Chan AY, Cowan MJ, Mallott J, Sunderam U, et al. Combined immunodeficiency due to MALT1 mutations, treated by hematopoietic cell transplantation. *J Clin Immunol.* févr 2015;35(2):135-46.
102. Bornancin F, Renner F, Touil R, Sic H, Kolb Y, Touil-Allaoui I, et al. Deficiency of MALT1 Paracaspase Activity Results in Unbalanced Regulatory and Effector T and B Cell Responses Leading to Multiorgan Inflammation. *The Journal of Immunology.* 15 avr 2015;194(8):3723-34.
103. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* juin 2019;16(6):356-71.
104. Rosenbaum M, Gewies A, Pechloff K, Heuser C, Engleitner T, Gehring T, et al. Bcl10-controlled Malt1 paracaspase activity is key for the immune suppressive function of regulatory T cells. *Nat Commun.* 28 mai 2019;10(1):2352.
105. Pan D, Zhu Y, Zhou Z, Wang T, You H, Jiang C, et al. The CBM Complex Underwrites NF- $\kappa$ B Activation to Promote HER2-Associated Tumor Malignancy. *Mol Cancer Res.* janv 2016;14(1):93-102.
106. Ekambaram P, Lee JY (Lloyd), Hubel NE, Hu D, Yerneni S, Campbell PG, et al. The CARMA3-Bcl10-MALT1 Signalosome Drives NF $\kappa$ B Activation and Promotes Aggressiveness in Angiotensin II Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Research.* 28 févr 2018;78(5):1225-40.
107. Lee JYL, Ekambaram P, Carleton NM, Hu D, Klei LR, Cai Z, et al. MALT1 Is a Targetable Driver of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Claudin-Low, Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Res.* 1 mars 2022;20(3):373-86.
108. McAuley JR, Bailey KM, Ekambaram P, Klei LR, Kang H, Hu D, et al. MALT1 is a critical mediator of PAR1-driven NF- $\kappa$ B activation and metastasis in multiple tumor types. *Oncogene.* déc 2019;38(49):7384-98.
109. Mahanivong C, Chen HM, Yee SW, Pan ZK, Dong Z, Huang S. Protein kinase C alpha-CARMA3 signaling axis links Ras to NF-kappa B for lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator expression in ovarian cancer cells. *Oncogene.* 21 févr 2008;27(9):1273-80.
110. Klemm S, Zimmermann S, Peschel C, Mak TW, Ruland J. Bcl10 and Malt1 control lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 janv 2007;104(1):134-8.

111. Douanne T, Chapelier S, Rottapel R, Gavard J, Bidère N. The LUBAC participates in lysophosphatidic acid-induced NF- $\kappa$ B activation. *Cellular Immunology*. 1 juill 2020;353:104133.
112. Pan D, Jiang C, Ma Z, Blonska M, You MJ, Lin X. MALT1 is required for EGFR induced NF- $\kappa$ B activation and contributes to EGFR-driven lung cancer progression. *Oncogene*. 18 févr 2016;35(7):919-28.
113. Israël L, Glück A, Berger M, Coral M, Ceci M, Unterreiner A, et al. CARD10 cleavage by MALT1 restricts lung carcinoma growth in vivo. *Oncogenesis*. 6 avr 2021;10(4):32.
114. Konczalla L, Perez DR, Wenzel N, Wolters-Eisfeld G, Klemp C, Lüddeke J, et al. Biperiden and mepazine effectively inhibit MALT1 activity and tumor growth in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 15 mars 2020;146(6):1618-30.
115. Kurden-Pekmezci A, Cakiroglu E, Eris S, Mazi FA, Coskun-Deniz OS, Dalgic E, et al. MALT1 paracaspase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cancer cell survival and growth. *Life Sci*. 15 juin 2023;323:121690.
116. Liu X, Yue C, Shi L, Liu G, Cao Q, Shan Q, et al. MALT1 is a potential therapeutic target in glioblastoma and plays a crucial role in EGFR-induced NF- $\kappa$ B activation. *J Cell Mol Med*. juill 2020;24(13):7550-62.
117. Ferch U, Kloo B, Gewies A, Pfänder V, Düwel M, Peschel C, et al. Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 26 oct 2009;206(11):2313-20.
118. Eichhold TH, Hookfin EB, Taiwo YO, De B, Wehmeyer KR. Isolation and quantification of fluoroacetate in rat tissues, following dosing of Z-Phe-Ala-CH<sub>2</sub>-F, a peptidyl fluoromethyl ketone protease inhibitor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1 nov 1997;16(3):459-67.
119. Fontan L, Yang C, Kabaleeswaran V, Volpon L, Osborne MJ, Beltran E, et al. MALT1 Small Molecule Inhibitors Specifically Suppress ABC-DLBCL In Vitro and In Vivo. *Cancer Cell*. 11 déc 2012;22(6):812-24.
120. Nagel D, Spranger S, Vincendeau M, Grau M, Raffegerst S, Kloo B, et al. Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL. *Cancer Cell*. 11 déc 2012;22(6):825-37.
121. Schlauderer F, Lammens K, Nagel D, Vincendeau M, Eitelhuber AC, Verhelst SHL, et al. Structural analysis of phenothiazine derivatives as allosteric inhibitors of the MALT1 paracaspase. *Angew Chem Int Ed Engl*. 23 sept 2013;52(39):10384-7.
122. Lomas JL. Treatment of schizophrenia pacatal and chlorpromazine compared. *Br Med J*. 13 juill 1957;2(5036):78-80.
123. Sarwer-Foner GJ, Koranyi EK. The Clinical Investigation of Pacatal in Open Psychiatric Settings. *Can Med Assoc J*. 1 sept 1957;77(5):450-9.
124. Whittier JR, Klein DF, Levine G, Weiss D. Mepazine (pacatal): Clinical trial with placebo control and psychological study. *Psychopharmacologia*. 1 juill 1960;1(4):280-7.
125. Quancard J, Klein T, Fung SY, Rénatus M, Hughes N, Israël L, et al. An allosteric MALT1 inhibitor is a molecular corrector rescuing function in an immunodeficient patient. *Nat Chem Biol*. mars 2019;15(3):304-13.
126. Lu T, Connolly PJ, Philippar U, Sun W, Cummings MD, Barbay K, et al. Discovery and optimization of a series of small-molecule allosteric inhibitors of MALT1 protease. *Bioorg Med Chem Lett*. 1 déc 2019;29(23):126743.

127. Venerando A, Ruzzene M, Pinna LA. Casein kinase: the triple meaning of a misnomer. *Biochemical Journal*. 13 mai 2014;460(2):141-56.
128. Gross SD, Anderson RA. Casein Kinase I: Spatial Organization and Positioning of a Multifunctional Protein Kinase Family. *Cellular Signalling*. 1 nov 1998;10(10):699-711.
129. Fulcher LJ, Sapkota GP. Functions and regulation of the serine/threonine protein kinase CK1 family: moving beyond promiscuity. *Biochem J*. 11 déc 2020;477(23):4603-21.
130. Schittek B, Sinnberg T. Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Molecular Cancer*. 11 oct 2014;13(1):231.
131. Jiang J. CK1 in Developmental Signaling: Hedgehog and Wnt. *Curr Top Dev Biol*. 2017;123:303-29.
132. Hoang ATN, Hoe KL, Lee SJ. CSNK1G2 differently sensitizes tamoxifen-induced decrease in PI3K/AKT/mTOR/S6K and ERK signaling according to the estrogen receptor existence in breast cancer cells. *PLOS ONE*. 16 avr 2021;16(4):e0246264.
133. Hoang LN, Lee SJ. Casein kinase 1 controls the shuttling of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in endometrial carcinoma induced by breast cancer hormonal therapy: Relevance of GPER1/Src. *Cell Signal*. août 2023;108:110733.
134. Phadnis N, Cipak L, Polakova S, Hyppa RW, Cipakova I, Anrather D, et al. Casein Kinase 1 and Phosphorylation of Cohesin Subunit Rec11 (SA3) Promote Meiotic Recombination through Linear Element Formation. *PLoS Genet*. mai 2015;11(5):e1005225.
135. Nguyen Hoang AT, Lee H, Lee SJ. Casein kinase I inhibitor D4476 influences autophagy and apoptosis in chloroquine-induced adult retinal pigment epithelial-19 cells. *Exp Eye Res*. mai 2022;218:109004.
136. Greer YE, Gao B, Yang Y, Nussenzweig A, Rubin JS. Lack of Casein Kinase 1 Delta Promotes Genomic Instability - The Accumulation of DNA Damage and Down-Regulation of Checkpoint Kinase 1. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170903.
137. Beale AD, Kruchek E, Kitcatt SJ, Henslee EA, Parry JSW, Braun G, et al. Casein Kinase 1 Underlies Temperature Compensation of Circadian Rhythms in Human Red Blood Cells. *J Biol Rhythms*. avr 2019;34(2):144-53.
138. Brina D, Miluzio A, Ricciardi S, Biffo S. eIF6 anti-association activity is required for ribosome biogenesis, translational control and tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. juill 2015;1849(7):830-5.
139. Goto A, Sakai S, Mizuike A, Yamaji T, Hanada K. Compartmentalization of casein kinase 1  $\gamma$  CSNK1G controls the intracellular trafficking of ceramide. *iScience*. 15 juill 2022;25(7):104624.
140. Shen C, Nayak A, Melendez RA, Wynn DT, Jackson J, Lee E, et al. Casein Kinase 1 $\alpha$  as a Regulator of Wnt-Driven Cancer. *Int J Mol Sci*. 18 août 2020;21(16):5940.
141. Fulford AD, Holder MV, Frith D, Snijders AP, Tapon N, Ribeiro PS. Casein kinase 1 family proteins promote Slimb-dependent Expanded degradation. *Elife*. 30 sept 2019;8:e46592.
142. Petzold G, Fischer ES, Thomä NH. Structural basis of lenalidomide-induced CK1 $\alpha$  degradation by the CRL4CRBN ubiquitin ligase. *Nature*. avr 2016;532(7597):127-30.
143. Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, MacBeth KJ, Hurst SN, Udeshi ND, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 $\alpha$  in del(5q) MDS. *Nature*. juill 2015;523(7559):183-8.

144. Bedri S, Cizek SM, Rastarhuyeva I, Stone JR. Regulation of protein kinase CK1 $\alpha$ LS by dephosphorylation in response to hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys*. 15 oct 2007;466(2):242-9.
145. Fu Z, Chakraborti T, Morse S, Bennett GS, Shaw G. Four casein kinase I isoforms are differentially partitioned between nucleus and cytoplasm. *Exp Cell Res*. 1 oct 2001;269(2):275-86.
146. Yong TJK, Gan YY, Toh BH, Sentry JW. Human CKI $\alpha$ L and CKI $\alpha$ S are encoded by both 2.4- and 4.2-kb transcripts, the longer containing multiple RNA-destablising elements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 24 juill 2000;1492(2):425-33.
147. Dubois T, Howell S, Zemlickova E, Aitken A. Identification of casein kinase I $\alpha$  interacting protein partners. *FEBS Lett*. 24 avr 2002;517(1-3):167-71.
148. Gross SD, Hoffman DP, Fiset PL, Baas P, Anderson RA. A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I  $\alpha$  associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J Cell Biol*. août 1995;130(3):711-24.
149. Brockman JL, Gross SD, Sussman MR, Anderson RA. Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 oct 1992;89(20):9454-8.
150. Gross SD, Loijens JC, Anderson RA. The casein kinase I $\alpha$  isoform is both physically positioned and functionally competent to regulate multiple events of mRNA metabolism. *J Cell Sci*. août 1999;112 ( Pt 16):2647-56.
151. Kang DE, Soriano S, Xia X, Eberhart CG, De Strooper B, Zheng H, et al. Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell*. 20 sept 2002;110(6):751-62.
152. Jiang S, Zhang M, Sun J, Yang X. Casein kinase 1 $\alpha$ : biological mechanisms and theranostic potential. *Cell Communication and Signaling*. 24 mai 2018;16(1):23.
153. Kannanayakal TJ, Mendell JR, Kuret J. Casein Kinase 1  $\alpha$  associates with the tau-bearing lesions of inclusion body myositis. *Neurosci Lett*. 31 janv 2008;431(2):141-5.
154. Tkachenko A, Onishchenko A. Casein kinase 1 $\alpha$  mediates eryptosis: a review. *Apoptosis*. févr 2023;28(1-2):1-19.
155. Long NH, Lee SJ. Targeting casein kinase 1 for cancer therapy: current strategies and future perspectives. *Front Oncol [Internet]*. 8 nov 2023 [cité 22 mars 2025];13. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2023.1244775/full>
156. Lishman-Walker E, Coffey K. Casein Kinase 1 $\alpha$ —A Target for Prostate Cancer Therapy? *Cancers*. janv 2024;16(13):2436.
157. Luis TC, Naber BAE, Roozen PPC, Brugman MH, de Haas EFE, Ghazvini M, et al. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell*. 4 oct 2011;9(4):345-56.
158. Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SEW, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*. oct 2006;7(10):1048-56.
159. Trowbridge JJ, Xenocostas A, Moon RT, Bhatia M. Glycogen synthase kinase-3 is an in vivo regulator of hematopoietic stem cell repopulation. *Nat Med*. janv 2006;12(1):89-98.

160. Schneider RK, Ademà V, Heckl D, Järås M, Mallo M, Lord AM, et al. Role of casein kinase 1A1 in the biology and targeted therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell*. 13 oct 2014;26(4):509-20.
161. Heuser M, Meggendorfer M, Araujo Cruz MM, Koehler L, Goehring G, Ganster C, et al. Casein Kinase 1A1 (CSNK1A1) Is Recurrently Mutated in MDS Patients with Deletion of Chromosome 5q. *Blood*. 6 déc 2014;124(21):4643.
162. Liu X, Huang Q, Chen L, Zhang H, Schonbrunn E, Chen J. Tumor-derived CK1 $\alpha$  mutations enhance MDMX inhibition of p53. *Oncogene*. janv 2020;39(1):176-86.
163. Nie W, Luo X, Lu D, Yuan P, Liu B, Xu H, et al. Casein kinase 1 $\alpha$  1 is involved in the progression of glioblastoma through HIF-1 $\alpha$ -mediated autophagy. *J Neurophysiol*. 1 oct 2022;128(4):910-8.
164. Ishii I, Harada Y, Kasahara T. Reprofile a classical anthelmintic, pyrvinium pamoate, as an anti-cancer drug targeting mitochondrial respiration. *Front Oncol*. 2012;2:137.
165. Thorne CA, Hanson AJ, Schneider J, Tahinci E, Orton D, Cselenyi CS, et al. Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1 $\alpha$ . *Nat Chem Biol*. nov 2010;6(11):829-36.
166. Li B, Flaveny CA, Giambelli C, Fei DL, Han L, Hang BI, et al. Repurposing the FDA-approved pinworm drug pyrvinium as a novel chemotherapeutic agent for intestinal polyposis. *PLoS One*. 2014;9(7):e101969.
167. Saraswati S, Alfaro MP, Thorne CA, Atkinson J, Lee E, Young PP. Pyrvinium, a potent small molecule Wnt inhibitor, promotes wound repair and post-MI cardiac remodeling. *PLoS One*. 29 nov 2010;5(11):e15521.
168. Shen C, Li B, Astudillo L, Deutscher MP, Cobb MH, Capobianco AJ, et al. The CK1 $\alpha$  Activator Pyrvinium Enhances the Catalytic Efficiency (kcat/Km) of CK1 $\alpha$ . *Biochemistry*. 24 déc 2019;58(51):5102-6.
169. Barham W, Frump AL, Sherrill TP, Garcia CB, Saito-Diaz K, VanSaun MN, et al. Targeting the Wnt Pathway in Synovial Sarcoma Models. *Cancer Discov*. nov 2013;3(11):10.1158/2159-8290.CD-13-0138.
170. Li B, Lee E, Robbins DJ. Casein kinase1 $\alpha$  activators, a precision weapon for CRC. *Oncotarget*. 19 oct 2017;8(57):96462-3.
171. Shen C, Nayak A, Melendez RA, Wynn DT, Jackson J, Lee E, et al. Casein Kinase 1 $\alpha$  as a Regulator of Wnt-Driven Cancer. *Int J Mol Sci*. 18 août 2020;21(16):5940.
172. Gray N, Détiavaud L, Doerig C, Meijer L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr Med Chem*. sept 1999;6(9):859-75.
173. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Muzio LL. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*. août 2017;40(2):271-80.
174. Chijiwa T, Hagiwara M, Hidaka H. A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide, and affinity purification of casein kinase I from bovine testis. *J Biol Chem*. 25 mars 1989;264(9):4924-7.
175. Nyati S, Ranga R, Ross BD, Rehemtulla A, Bhojani MS. Molecular Imaging of GSK3 $\beta$  and CK1 $\alpha$  kinases. *Anal Biochem*. 15 oct 2010;405(2):246-54.
176. Behrend L, Milne DM, Stöter M, Deppert W, Campbell LE, Meek DW, et al. IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic

checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. *Oncogene*. nov 2000;19(47):5303-13.

177. Kurihara T, Sakurai E, Toyomoto M, Kii I, Kawamoto D, Asada T, et al. Alleviation of Behavioral Hypersensitivity in Mouse Models of Inflammatory Pain with Two Structurally Different Casein Kinase 1 (CK1) Inhibitors. *Mol Pain*. 1 janv 2014;10:1744-8069-10-7.
178. Muraki M, Ohkawara B, Hosoya T, Onogi H, Koizumi J, Koizumi T, et al. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem*. 4 juin 2004;279(23):24246-54.
179. Isojima Y, Nakajima M, Ukai H, Fujishima H, Yamada RG, Masumoto K hei, et al. CKIepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 sept 2009;106(37):15744-9.
180. Rena G, Bain J, Elliott M, Cohen P. D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rep*. janv 2004;5(1):60-5.
181. Sarafidis PA, Georgianos PI, Lasaridis AN. Diuretics in clinical practice. Part I: mechanisms of action, pharmacological effects and clinical indications of diuretic compounds. *Expert Opin Drug Saf*. mars 2010;9(2):243-57.
182. Ursu A, Illich DJ, Takemoto Y, Porfetye AT, Zhang M, Brockmeyer A, et al. Epiblastin A Induces Reprogramming of Epiblast Stem Cells Into Embryonic Stem Cells by Inhibition of Casein Kinase 1. *Cell Chem Biol*. 21 avr 2016;23(4):494-507.
183. Hirota T, Lee JW, Lewis WG, Zhang EE, Breton G, Liu X, et al. High-throughput chemical screen identifies a novel potent modulator of cellular circadian rhythms and reveals CKIalpha as a clock regulatory kinase. *PLoS Biol*. 14 déc 2010;8(12):e1000559.
184. Sasso JM, Tenchov R, Wang D, Johnson LS, Wang X, Zhou QA. Molecular Glues: The Adhesive Connecting Targeted Protein Degradation to the Clinic. *Biochemistry*. 20 juill 2022;
185. Chen YJ, Wu H, Shen XZ. The ubiquitin-proteasome system and its potential application in hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Lett*. 1 sept 2016;379(2):245-52.
186. Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov*. mars 2022;21(3):181-200.
187. Burslem GM, Smith BE, Lai AC, Jaime-Figueroa S, McQuaid DC, Bondeson DP, et al. The Advantages of Targeted Protein Degradation Over Inhibition: An RTK Case Study. *Cell Chem Biol*. 18 janv 2018;25(1):67-77.e3.
188. Miller MT, Strömmland K. Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology*. 1999;60(5):306-21.
189. Melchert M, List A. The thalidomide saga. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(7-8):1489-99.
190. Knobloch J, Rüther U. Shedding light on an old mystery: thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects. *Cell Cycle*. 1 mai 2008;7(9):1121-7.
191. Teo SK, Resztak KE, Scheffler MA, Kook KA, Zeldis JB, Stirling DI, et al. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes and Infection*. 1 sept 2002;4(11):1193-202.
192. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 18 nov 1999;341(21):1565-71.

193. Zeldis JB, Williams BA, Thomas SD, Elsayed ME. S.T.E.P.S.: a comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. *Clin Ther.* févr 1999;21(2):319-30.
194. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science.* 12 mars 2010;327(5971):1345-50.
195. Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, Miller K, Gandhi AK, Kang J, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia.* nov 2012;26(11):2326-35.
196. Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science.* 17 janv 2014;343(6168):301-5.
197. Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong M, Ott CJ, Mitsiades CS, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science.* 17 janv 2014;343(6168):305-9.
198. Gandhi AK, Kang J, Havens CG, Conklin T, Ning Y, Wu L, et al. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.). *Br J Haematol.* mars 2014;164(6):811-21.
199. Fischer ES, Böhm K, Lydeard JR, Yang H, Stadler MB, Cavadini S, et al. Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature.* août 2014;512(7512):49-53.
200. Minzel W, Venkatachalam A, Fink A, Hung E, Brachya G, Burstain I, et al. Small Molecules Co-targeting CK1 $\alpha$  and the Transcriptional Kinases CDK7/9 Control AML in Preclinical Models. *Cell.* 20 sept 2018;175(1):171-185.e25.
201. Gemechu Y, Millrine D, Hashimoto S, Prakash J, Sanchenkova K, Metwally H, et al. Humanized cereblon mice revealed two distinct therapeutic pathways of immunomodulatory drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 13 nov 2018;115(46):11802-7.
202. Teng M, Lu W, Donovan KA, Sun J, Krupnick NM, Nowak RP, et al. Development of PDE6D and CK1 $\alpha$  Degraders through Chemical Derivatization of FPFT-2216. *J Med Chem.* 13 janv 2022;65(1):747-56.
203. Kanaoka D, Yamada M, Yokoyama H, Nishino S, Kunimura N, Satoyoshi H, et al. FPFT-2216, a Novel Anti-lymphoma Compound, Induces Simultaneous Degradation of IKZF1/3 and CK1 $\alpha$  to Activate p53 and Inhibit NF $\kappa$ B Signaling. *Cancer Res Commun.* 6 févr 2024;4(2):312-27.
204. Nishiguchi G, Mascibroda LG, Young SM, Caine EA, Abdelhamed S, Kooijman JJ, et al. Selective CK1 $\alpha$  degraders exert antiproliferative activity against a broad range of human cancer cell lines. *Nat Commun.* 16 janv 2024;15(1):482.
205. Park SM, Miyamoto DK, Han GY, Chan M, Curnutt N, Tran NL, et al. Dual IKZF2 and CK1 $\alpha$  degrader targets acute myeloid leukemia cells. *Cancer Cell.* 10 avr 2023;41(4):726-739.e11.
206. Muscal JA, Sun Y, Nuchtern JG, Dauser RC, McGuffey LH, Gibson BW, et al. Plasma and Cerebrospinal Fluid Pharmacokinetics of Thalidomide and Lenalidomide in Nonhuman Primates. *Cancer Chemother Pharmacol.* avr 2012;69(4):943-7.
207. Jacobs KA, André-Grégoire G, Maghe C, Thys A, Li Y, Harford-Wright E, et al. Paracaspase MALT1 regulates glioma cell survival by controlling endo-lysosome homeostasis. *EMBO J.* 2 janv 2020;39(1):e102030.

208. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 19 janv 2010;17(1):98-110.
209. Wang Q, Hu X, Muller F, Kim H, Squatrito M, Mikkelsen T, et al. TMIC-14. TUMOR EVOLUTION OF GLIOMA INTRINSIC GENE EXPRESSION SUBTYPE ASSOCIATES WITH IMMUNOLOGICAL CHANGES IN THE MICROENVIRONMENT. *Neuro-Oncology*. 1 nov 2016;18(suppl\_6):vi202.
210. Moud BN, Ober F, O'Neill TJ, Krappmann D. MALT1 substrate cleavage: what is it good for? *Front Immunol*. 2024;15:1412347.
211. O'Neill TJ, Tofaute MJ, Krappmann D. Function and targeting of MALT1 paracaspase in cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 1 juin 2023;117:102568.
212. Maghe C, Trillet K, André-Grégoire G, Kerhervé M, Merlet L, Jacobs KA, et al. The paracaspase MALT1 controls cholesterol homeostasis in glioblastoma stem-like cells through lysosome proteome shaping. *Cell Rep*. 23 janv 2024;43(1):113631.
213. Asatsuma-Okumura T, Ito T, Handa H. Molecular mechanisms of cereblon-based drugs. *Pharmacol Ther*. oct 2019;202:132-9.
214. Park SM, Miyamoto DK, Han GYQ, Chan M, Curnutt NM, Tran NL, et al. Dual IKZF2 and CK1 $\alpha$  degrader targets acute myeloid leukemia cells. *Cancer Cell*. 10 avr 2023;41(4):726-739.e11.
215. Nishiguchi G, Mascibroda LG, Young SM, Caine EA, Abdelhamed S, Kooijman JJ, et al. Selective CK1 $\alpha$  degraders exert antiproliferative activity against a broad range of human cancer cell lines. *Nat Commun*. 16 janv 2024;15(1):482.
216. Abu-Remaileh M, Wyant GA, Kim C, Laqtom NN, Abbasi M, Chan SH, et al. Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase- and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes. *Science*. 10 nov 2017;358(6364):807-13.
217. Liu X, Guo B, Li Q, Nie J. mTOR in metabolic homeostasis and disease. *Experimental Cell Research*. 15 août 2024;441(2):114173.
218. Shibata Y, Komander D. LUBAC. *Current Biology*. 6 juin 2022;32(11):R506-8.
219. Elton L, Carpentier I, Staal J, Driege Y, Haegman M, Beyaert R. MALT1 cleaves the E3 ubiquitin ligase HOIL-1 in activated T cells, generating a dominant negative inhibitor of LUBAC-induced NF- $\kappa$ B signaling. *FEBS J*. févr 2016;283(3):403-12.
220. Klein T, Fung SY, Renner F, Blank MA, Dufour A, Kang S, et al. The paracaspase MALT1 cleaves HOIL1 reducing linear ubiquitination by LUBAC to dampen lymphocyte NF- $\kappa$ B signalling. *Nat Commun*. 3 nov 2015;6(1):8777.
221. Yang YK, Yang C, Chan W, Wang Z, Deibel KE, Pomerantz JL. Molecular Determinants of Scaffold-induced Linear Ubiquitylation of B Cell Lymphoma/Leukemia 10 (Bcl10) during T Cell Receptor and Oncogenic Caspase Recruitment Domain-containing Protein 11 (CARD11) Signaling. *J Biol Chem*. 9 déc 2016;291(50):25921-36.
222. Douanne T, André-Grégoire G, Thys A, Trillet K, Gavard J, Bidère N. CYLD Regulates Centriolar Satellites Proteostasis by Counteracting the E3 Ligase MIB1. *Cell Rep*. 7 mai 2019;27(6):1657-1665.e4.
223. Zeng Y, Zhao L, Zeng K, Zhan Z, Zhan Z, Li S, et al. TRAF3 loss protects glioblastoma cells from lipid peroxidation and immune elimination via dysregulated lipid metabolism. *J Clin Invest* [Internet]. 11 févr 2025 [cité 30 mars 2025]; Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/178550>

224. Bidère N, Ngo VN, Lee J, Collins C, Zheng L, Wan F, et al. Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. *Nature*. 5 mars 2009;458(7234):92-6.
225. Gehring T, Erdmann T, Rahm M, Graß C, Flatley A, O'Neill TJ, et al. MALT1 Phosphorylation Controls Activation of T Lymphocytes and Survival of ABC-DLBCL Tumor Cells. *Cell Rep*. 22 oct 2019;29(4):873-888.e10.
226. Thys A, Douanne T, Bidère N. Post-translational Modifications of the CARMA1-BCL10-MALT1 Complex in Lymphocytes and Activated B-Cell Like Subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Oncol*. 2018;8:498.
227. Aits S, Jäättelä M. Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci*. 1 mai 2013;126(Pt 9):1905-12.
228. André-Grégoire G, Maghe C, Douanne T, Rosińska S, Spinelli F, Thys A, et al. Inhibition of the pseudokinase MLKL alters extracellular vesicle release and reduces tumor growth in glioblastoma. *iScience*. 21 oct 2022;25(10):105118.
229. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 22 mars 2002;108(6):837-47.

# Table des matières

.....	1
<b>PLAN .....</b>	<b>8</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES IMAGES.....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Le Glioblastome (GB) .....</b>	<b>8</b>
1.1. Classification de l'OMS et Définition .....	8
1.2. Épidémiologie .....	8
1.3. Présentations : Cérébrale et Clinique.....	8
1.4. Facteurs de risque.....	9
1.5. Prise en charge Thérapeutique .....	9
<b>2. Les Cellules de type Souche du Glioblastome (GSC) .....</b>	<b>10</b>
2.1. Découverte et Définition .....	10
2.2. Propriétés.....	11
2.3. Hétérogénéité et Plasticité .....	13
2.3.1. À l'échelle Moléculaire : Différents sous-types de la Classification de Verhaak .....	13
2.3.2. À l'échelle Cellulaire : Plasticité et Classification de Nefitel .....	15
<b>3. La Paracaspase MALT1 .....</b>	<b>16</b>
3.1. Présentation.....	16
3.2. MALT1 : Régulateur Bimodal de la Signalisation Immunitaire .....	17
3.2.1. Voie canonique NF- $\kappa$ B .....	19
3.3. MALT1 en Pathologie.....	21
3.3.1. MALT1 et Lymphomagenèse .....	21
3.3.2. MALT1 et Maladies Auto-Immunes & Inflammatoires .....	22
3.3.3. MALT1 et Tumeurs Solides .....	22
a) Immunité Tumorale.....	22
b) Carcinogénèse.....	23
c) Glioblastome.....	24
3.4. Inhibiteurs de MALT1 .....	24
<b>4. La kinase CK1<math>\alpha</math>.....</b>	<b>27</b>
4.1. Présentation.....	27
4.1.1. Famille des Caséines Kinases.....	27
4.1.2. Caséines Kinases 1 .....	27
4.1.3. CK1 $\alpha$ : Gène et protéine .....	27
4.1.4. CK1 $\alpha$ : Une protéine ubiquitaire .....	28
4.2. CK1 $\alpha$ en Pathologie.....	28
4.2.1. Implication dans Diverses Pathologies Non Cancéreuses.....	28
4.2.2. Implications dans les Cancers .....	30
a) Mutations de CK1 $\alpha$ et Cancers .....	30
b) Surexpression de CK1 $\alpha$ et GB.....	30
4.3. Activateurs de CK1 $\alpha$ .....	31
4.4. Inhibiteurs de CK1 $\alpha$ .....	32
4.5. Glus moléculaires .....	33
<b>OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE : QUESTIONS ET HYPOTHESES .....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>38</b>
<b>1. Culture cellulaire .....</b>	<b>38</b>
<b>2. Traitement des cellules .....</b>	<b>39</b>
<b>3. Transfection d'ARN interférant.....</b>	<b>39</b>
<b>4. Cytométrie en flux .....</b>	<b>40</b>
<b>5. Lysat protéique.....</b>	<b>40</b>

6.	Co-immunoprécipitation (co-IP) .....	40
7.	Western-blot (WB) .....	41
8.	Marquage cellulaire par immunofluorescence (IF) .....	43
9.	Viabilité cellulaire .....	44
10.	Test de Formation de Tumorosphères (TFA) .....	44
11.	Analyses statistiques .....	44
<b>RESULTATS .....</b>		<b>45</b>
1.	Les Cellules de type Souche de Glioblastome (GSC) présentent une activité basale de MALT1 45	
2.	MALT1 opère au sein d'un complexe multiprotéique contenant la kinase CK1 $\alpha$ .....	46
3.	L'ARN interférence ciblant CK1 $\alpha$ réduit l'expansion des GSC .....	47
4.	Efficacité limitée des glus moléculaires dérivées du lénalidomide dans les GSC .....	48
5.	Optimisation de l'utilisation des nouvelles générations des glus moléculaires .....	49
6.	Les nouvelles générations de glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$ bloquant l'expansion des GSC 49	
7.	CK1 $\alpha$ module l'abondance lysosomale .....	50
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>59</b>
8.	Quelques pistes pour les mécanismes d'action de CK1 $\alpha$ .....	59
8.1.	Existe-t-il un lien entre les deux complexes multiprotéiques CBM et LUBAC dans les GSC ? .....	59
8.2.	La protéine TRAF6 joue-t-elle un rôle de régulateur négatif sur l'activité protéolytique de MALT1 dans les GSC ?	62
9.	Quel est le rôle de l'activité kinase de CK1 $\alpha$ ? .....	62
10.	Quels sont les impacts fonctionnels de CK1 $\alpha$ dans l'expansion des GSC ? .....	63
11.	Quel est l'impact sur les GSC de l'ajout du ciblage de CK1 $\alpha$ au protocole thérapeutique standard ? .....	63
11.1.	<i>In vitro</i> , existe-t-il une synergie entre les glus moléculaires, le TMZ et la radiothérapie ? .....	63
11.2.	<i>In vivo</i> , existe-t-il une synergie entre les glus moléculaires et le TMZ ? .....	64
12.	Le phénotype observé lors de l'inhibition de CK1 $\alpha$ dans les GSC ne peut-il pas s'expliquer par la perturbation simultanée de plusieurs voies de signalisation ? .....	64
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>68</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>		<b>83</b>
<b>LE GUYON MARGAUX .....</b>		<b>1</b>

## Ciblage de CK1 $\alpha$ : un Régulateur clé de l'Homéostasie des Cellules de type Souche de Glioblastome

### RÉSUMÉ

Le Glioblastome (GB) est la tumeur primaire maligne du cerveau la plus fréquente et agressive chez l'adulte. Malgré l'existence d'un protocole thérapeutique standard, les rechutes sont systématiques et fatales. Ceci s'explique, notamment, par l'existence d'une sous-population de cellules souches cancéreuses : les Cellules de type Souche de GB (GSC).

Des travaux récents ont montré le rôle central de la paracaspase MALT1 dans la viabilité et l'expansion des GSC. Cependant, les cascades de signalisation régulant son activité restent mal connues. Dans le système immunitaire normal ou pathologique, l'activation de MALT1 se déroule au sein du complexe multiprotéique CBM, qui requiert la kinase CK1 $\alpha$ .

Ainsi, mon travail a pour but de déterminer si CK1 $\alpha$  est un régulateur de l'homéostasie des GSC, et d'apporter la preuve de concept que son ciblage, par les glus moléculaires, est une stratégie prometteuse à l'heure où le point de départ d'une meilleure prise en charge des patients atteints de GB pourrait reposer sur l'éradication spécifique de cette sous-population cellulaire.

Mes résultats commencent par la caractérisation du complexe CBM dans les GSC, et établissent que CK1 $\alpha$  interagit avec MALT1, qui présente une activité protéolytique basale. De plus, la réduction de l'expression de CK1 $\alpha$  bloque l'activité protéolytique de MALT1 et réduit l'expansion des GSC. Cet effet est associé à une dérégulation du flux lysosomal et à la mort des GSC. Ainsi, CK1 $\alpha$  fonctionnerait tel un rempart contre une augmentation de la quantité de lysosomes, nocive pour les GSC, contrôlant in fine la survie de ces cellules. C'est dans ce contexte, et pour se rapprocher de la clinique, que plusieurs générations de glus moléculaires ciblant CK1 $\alpha$  ont été testées et optimisées. Les dernières générations de ces petites molécules montrent une efficacité remarquable, reproduisant largement les effets observés avec l'inhibition de CK1 $\alpha$  par ARN interférent, et renforçant ainsi leur potentiel pour une application clinique.

**Mots-clés :** Glioblastome, Cellule Souche Cancéreuse, paracaspase MALT1, CBM, CK1 $\alpha$ , glu moléculaire

## Targeting CK1 $\alpha$ : a key Regulator of Homeostasis in Glioblastoma Stem-like Cells

### ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive primary malignant brain tumor in adults. Despite the existence of a standard therapeutic protocol, relapses are systematic and fatal. This is due, in particular, to the existence of a subpopulation of cancer stem cells: GB Stem-like Cells (GSC).

Recent work has demonstrated the central role of the MALT1 paracaspase in the viability and expansion of GSCs. However, the signaling cascades regulating its activity remain poorly understood. In the normal or pathological immune system, MALT1 activation takes place within the CBM multi-protein complex, that requires the CK1 $\alpha$  kinase. Thus, the aim of my work is to determine whether CK1 $\alpha$  is a regulator of GSC homeostasis, and to provide proof of concept that its targeting, via molecular glues, is a promising strategy at a time when the starting point for better management of GB patients could rest on the specific eradication of this cellular subpopulation.

My results begin by characterizing the CBM complex in GSCs, and establish that CK1 $\alpha$  interacts with MALT1, which exhibits basal proteolytic activity. Furthermore, reduced CK1 $\alpha$  expression blocks MALT1 proteolytic activity and reduces GSC expansion. This effect is associated with deregulation of lysosomal flux and GSC death. Thus, CK1 $\alpha$  would function as a bulwark against an increase in lysosome quantity, harmful to GSC, ultimately controlling the survival of these cells. It is in this context, and to get closer to the clinic, that several generations of molecular glues targeting CK1 $\alpha$  have been tested and optimized. The latest generations of these small molecules show remarkable efficacy, largely reproducing the effects observed with CK1 $\alpha$  inhibition by interfering RNA, and thus reinforcing their potential for clinical application.

**Keywords:** Glioblastoma, Cancer Stem Cell, MALT1 paracaspase, CBM, CK1 $\alpha$ , molecular glue