

MLKL et les reliques de la mort

Gwennan André-Grégoire¹⁻³, Julie Gavard¹⁻³

► Le glioblastome est une tumeur primaire du système nerveux central. Il est l'un des cancers de l'adulte les plus graves, avec une survie médiane de 15 mois. L'échec des thérapies actuelles s'explique notamment par le caractère invasif du glioblastome, ainsi que par sa résistance aux traitements conventionnels (radio et chimiothérapie). Les cellules souches du glioblastome représentent des cibles de choix pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cette sous-population de cellules tumorales a en effet la capacité, non seulement de s'auto-renouveler, même dans des conditions peu favorables, mais également d'échapper à la radio-chimiothérapie. Identifier les points faibles de ces cellules pour favoriser leur suppression constitue un des objectifs de nos recherches [1] (→).

(→) Voir la Nouvelle de C. Maghe et al., m/s n° 5, mai 2020, page 452

Les vésicules extracellulaires, acteurs de l'apparition, de la progression, et de la rechute des glioblastomes

Les vésicules extracellulaires, autrefois considérées comme les constituants d'un système non immunogénique de délestage de déchets cellulaires, sont aujourd'hui reconnues pour leurs rôles dans la communication intercellulaire en physiologie et en physiopathologie [2] (→). Ces structures nanométriques (de 30 à 1 000 nm de diamètre pour les exosomes et les microvésicules) sont libérées à partir d'un bourgeonnement de la membrane plasmique, ou via la fusion de compartiments membranaires intracellulaires

(→) Voir l'Avant-propos de C.M. Boulanger et al., m/s n° 12, décembre 2021, page 1089

(endosomes tardifs ou corps multivésiculaires).

Les vésicules extracellulaires interviennent de plusieurs façons dans la communication entre les cellules souches du glioblastome et les cellules de leur microenvironnement [3] (Figure 1). Ces vésicules, qui sont sécrétées par les cellules souches du glioblastome, contiennent en effet des facteurs pro-oncogéniques et pro-angiogéniques, qui augmentent notamment la perméabilité vasculaire [4-6]. Elles promeuvent également la capacité de migration de cellules présentes dans leur environnement, en particulier la migration des cellules endothéliales vasculaires. Les vésicules extracellulaires provenant des cellules du glioblastome peuvent être internalisées par des cellules immunitaires, comme les cellules de la microglie et les macrophages infiltrants. Ce transfert d'information entre cellules tumorales et cellules myéloïdes oriente le profil cytokinique de ces dernières, en faveur d'un phénotype pro-tumoral. L'extrusion d'agents de chimiothérapie ou le transfert d'oncogènes par les vésicules extracellulaires tumorales contribue également à la malignité du glioblastome [7]. Ces vésicules peuvent être détectées dans le sang périphérique, leur contenu reflétant l'état général de la tumeur, notamment son expansion et sa réponse aux traitements anticancéreux [8, 9]. L'effet autocrine que peuvent avoir les vésicules extracellulaires et les bases moléculaires de leur libération par les cellules souches du glioblastome restent néanmoins mal compris.

¹Équipe Signalisation en oncogénèse, angiogénèse et perméabilité, Centre de recherche en cancérologie et immunologie de Nantes-Angers, Nantes Université, Inserm, CNRS, université d'Angers, Nantes, France.

²Institut de cancérologie de l'Ouest (ICO), Saint-Herblain, France.

³Équipe labellisée Ligue contre le cancer, France.

julie.gavard@inserm.fr

Le rôle de la pseudokinase MLKL ne se limite pas à la nécroptose

La protéine MLKL (*mixed lineage kinase domain-like pseudokinase*) est une pseudokinase qui participe à la mort cellulaire programmée par nécroptose. Elle intervient lorsque les mécanismes d'apoptose sont mis en échec, au cours de l'activation de récepteurs à domaine de mort, comme le récepteur du TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*). À la suite d'une cascade de phosphorylations impliquant la kinase RIPK3 (*receptor-interacting serine/threonine kinase 3*), MLKL s'oligomérisse et s'ancre dans la membrane plasmique. Elle est alors à l'origine de la formation de pores qui entraîneront la lyse de la cellule [10]. D'autres fonctions ont été assignées à MLKL, comme le contrôle de l'expression de molécules d'adhérence des cellules endothéliales [11], la régénération tissulaire après une lésion nerveuse [12], le trafic intracellulaire des compartiments endosomiques et la libération de vésicules extracellulaires, notamment la formation et l'extrusion de vésicules associées à la nécroptose [13].

La double implication de MLKL dans la mort cellulaire et dans le trafic vésiculaire nous ont conduits à explorer le rôle que cette protéine pouvait avoir dans les cellules souches du glioblastome, un cancer pour lequel l'analyse des bases de données du *Cancer genome atlas*¹ montre qu'une augmentation du niveau d'expression de cette protéine est corrélée à un mauvais pronostic.

¹ Gliovis : <http://gliovis.bioinfo.cnio.es>



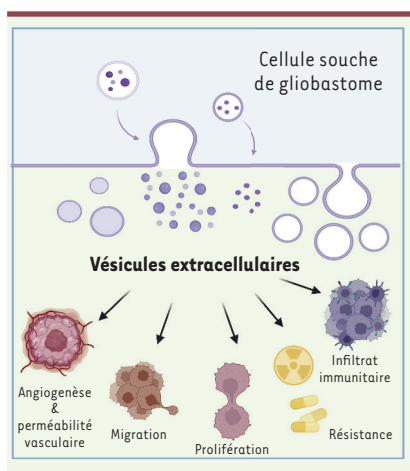


Figure 1. Rôle des vésicules extracellulaires dans l'expansion des tumeurs de glioblastome.

Les cellules souches du glioblastome (cellules donneuses) libèrent des facteurs solubles et des vésicules extracellulaires provenant du bourgeonnement de la membrane plasmique et de la fusion des compartiments endosomiques avec la membrane plasmique. Les vésicules extracellulaires influencent les cellules réceptrices dans le microenvironnement tumoral et contribuent à l'angiogenèse, à la perméabilité vasculaire, ainsi qu'à la migration tumorale, à la prolifération et à la survie des cellules cancéreuses, et à la résistance aux radiochimiothérapies. Elles favorisent également un infiltrat immunitaire pro-tumoral.

L'inhibition de MLKL perturbe les vésicules extracellulaires produites par les cellules souches du glioblastome

Nous avons montré que MLKL contrôle la sécrétion constitutive des vésicules extracellulaires par les cellules souches du glioblastome, en agissant sur leur biogenèse et la quantité de vésicules libérées [14]. Le ciblage de MLKL, par une approche génétique (par ARN interférence), une approche protéique (par adressage de la protéine au protéasome), ou par une approche pharmacologique (par inhibition par le nécosulfonamide²), réoriente le trafic intracellulaire et diminue la production

des vésicules extracellulaires. *In vitro*, l'inhibition de MLKL réduit également l'expansion des cellules souches dérivées de patients atteints de glioblastome, un effet qui est indépendant du rôle de MLKL dans la nécroptose [14]. L'ajout de vésicules extracellulaires issues de cellules souches de glioblastome « naïves » ne compense pas ce phénotype. Les vésicules extracellulaires de cellules rendues moribondes par l'inhibition de MLKL, ne sont en revanche pas toxiques *per se*.

Ces résultats suggèrent donc qu'entraver la libération des vésicules extracellulaires permet d'empêcher l'expansion des cellules souches du glioblastome. À l'appui de cette hypothèse, une analyse protéomique a révélé que l'inhibition de MLKL modifie le contenu des vésicules extracellulaires. Il est alors enrichie en protéines associées au trafic endo-lysosomal [14]. *In vivo*, chez des souris immunodéprimées ayant reçu une greffe intracérébrale de cellules souches de glioblastome humaines, l'inhibition pharmacologique de MLKL ralentit la croissance de la tumeur. Le taux plasmatique de vésicules extracellulaires humaines, donc d'origine tumorale, est également réduit dans ce modèle animal de xéno-greffe orthotopique. La protéine MLKL jouerait donc un rôle fondamental dans le système de communication permettant aux cellules souches cancéreuses de contrôler l'évolution de la tumeur.

L'expansion des cellules souches dépend-elle d'un équilibre entre trafics intra- et extra-vésiculaires ?

Les vésicules extracellulaires peuvent être libérées par tous les types de cellules d'un organisme. Elles sont assimilables à des « nano-taxis », qui renferment et véhiculent du matériel biologique reflétant l'état de la cellule donneuse. Ce mode de communication intercellulaire est piraté par les cellules souches cancéreuses. Elles pilotent alors les autres constituants cellulaires de la tumeur, et pourraient ainsi constituer une vulnérabilité à cibler pour la théra-

pie anti-tumorale. Les résultats de nos travaux de recherche ont révélé l'impact des vésicules extracellulaires produites par les cellules souches du glioblastome dans la malignité de cette tumeur et la faible efficacité des traitements actuels. Ils ont montré le rôle modulateur (en quantité et en qualité) de la pseudokinase MLKL dans la biogenèse de ces vésicules extracellulaires produites par les cellules souches tumorales.

Bien que, dans des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, interférer avec la production des vésicules extracellulaires tumorales affecte l'expansion et la progression tumorales, le mécanisme d'action de MLKL n'est pas élucidé. Où se localise la protéine et quels sont ses partenaires de liaison ? Est-elle ancrée dans la membrane d'un compartiment intracellulaire ? Comment la fonction de MLKL dans la production des vésicules extracellulaires s'articule-t-elle avec le trafic endo-lysosomal ? Étant donné la forte expression de MLKL dans les cellules myéloïdes, la contribution d'un blocage thérapeutique de MLKL (à la fois dans les cellules tumorales et dans le microenvironnement tumoral immunitaire) au contrôle de la progression du glioblastome reste à évaluer. ♦

MLKL and the deathly hallows

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les membres du laboratoire SOAP et les laboratoires collaborateurs pour leur implication dans ce projet. Elles ont bénéficié de soutiens financiers de l'Agence nationale de la recherche, du Cancéropole, de la Fondation ARC, de l'Institut national du cancer, de la Ligue nationale contre le cancer, et de la région Pays de la Loire.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Maghe C, Jacobs KA, Bidère N, et al. Glioblastome multiforme. Les fleurs du MALT1. *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 452-4.
2. Boulanger CM, Raposo G, Théry C. Vésicules extracellulaires : comment passer en quelques décennies d'un statut de débris cellulaires, ou pire, de sacs poubelle, à celui de messagers intercellulaires. *Med Sci (Paris)* 2021 ; 37 : 1089-91.

² Le nécosulfonamide est un inhibiteur de la nécroptose agissant en ciblant sélectivement MLKL.

RÉFÉRENCES

3. André-Grégoire G, Gavard J. Spitting out the demons: Extracellular vesicles in glioblastoma. *Cell Adhes Migr* 2017 ; 11 : 164-72.
4. Treps L, Edmond S, Harford-Wright E, et al. Extracellular vesicle-transported Semaphorin3A promotes vascular permeability in glioblastoma. *Oncogene* 2016 ; 35 : 2615-23.
5. Treps L, Perret R, Edmond S, et al. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 2017 ; 6 : 1359479.
6. André-Grégoire G, Bidère N, Gavard J. Temozolomide affects Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells. *Biochimie* 2018 ; 155 : 11-5.
7. Quezada C, Torres Á, Niechi I, et al. Role of extracellular vesicles in glioma progression. *Mol Aspects Med* 2018 ; 60 : 38-51.
8. Skog J, Würdinger T, Rijn S van, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008 ; 10 : 1470-6.
9. Sabbagh Q, André-Grégoire G, Alves-Nicolau C, et al. The von Willebrand factor stamps plasmatic extracellular vesicles from glioblastoma patients. *Sci Rep* 2021 ; 11 : 22792.
10. Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 2012 ; 148 : 213-27.
11. Dai J, Zhang C, Guo L, et al. A necroptotic-independent function of MLKL in regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Cell Death Dis* 2020 ; 11 : 282.
12. Ying Z, Pan C, Shao T, et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Breaks Down Myelin following Nerve Injury. *Mol Cell* 2018 ; 72 : 457-68.e5.
13. Yoon S, Kovalenko A, Bogdanov K, et al. MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity* 2017 ; 47 : 51-65.e7.
14. André-Grégoire G, Maghe C, Douanne T, et al. Inhibition of the pseudokinase MLKL alters extracellular vesicle release and reduces tumor growth in glioblastoma. *iScience* 2022 ; 25 : 105118.

