

Le ciblage de la protéine Doppel, homologue de la protéine du prion, inhibe sélectivement l'angiogénèse

Jacques Robert

Institut Bergonié, Université de Bordeaux, France

<J.Robert@bordeaux.unicancer.fr>

Mots-clés : Angiogenèse, Protéine du prion, VEGFR2

Al-Hilal TA, Chung SW, Choi JU, et al. Targeting prion-like protein Doppel selectively suppresses tumor angiogenesis. *J Clin Invest* 2016 ; 126 : 1251-66.

La protéine du prion, PrP, dont on connaît bien le rôle dans l'étiologie de diverses pathologies comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou le kuru, a une petite sœur (un doublon) avec laquelle elle présente une grande homologie, la protéine Doppel (du mot allemand signifiant « double »), exprimée uniquement chez l'adulte mâle dans les cellules germinales du testicule. Or cette protéine est ré-exprimée dans la membrane des cellules endothéliales des tumeurs, alors qu'elle ne l'est pas dans les cellules endothéliales normales. Le knock-out du gène qui code la protéine Doppel, *PRND*, n'occasionne aucun défaut de développement chez la souris, à l'exception tout de même d'une stérilité chez les mâles.

Comme PrP, Doppel est une glycoprotéine liée à la membrane plasmique par une « ancre » de glycosyl-phosphatidyl-inositol ; son rôle et ses fonctions sont inconnus. Elle ne possède pas la région N-terminale faite de la répétition en tandem des 5 octapeptides qui caractérise PrP et qui est responsable de ses propriétés pathogènes ; cependant, elle possède une séquence d'acides aminés basiques qui lui confère une forte charge positive à la surface de la membrane et une affinité élevée pour les glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés, héparanes et autres.

Ces caractéristiques pourraient faire de Doppel une cible originale pour lutter contre l'angiogénèse tumorale sans perturber l'angiogénèse normale : c'est ce que les auteurs de cet article ont voulu démontrer.

Dans un premier temps, ils ont soigneusement validé la réactivité des anticorps

disponibles afin d'éviter tout risque de faux négatifs ou de faux positifs. Ils ont ensuite utilisé ces anticorps pour détecter la présence et la localisation cellulaire et subcellulaire de Doppel par immunofluorescence sur des *tissue microarrays* (TMA). Dans 15 échantillons de cancer du poumon non à petites cellules sur 18 échantillons étudiés et dans 25 échantillons de cancer du côlon sur 32, les auteurs ont observé une positivité marquée du tissu tumoral sans aucun marquage du tissu adjacent à la tumeur. Il existe une co-localisation du marquage de Doppel avec le CD31, marqueur classique des cellules endothéliales. Il est possible, après transplantation chez la souris de la lignée SCC7 (carcinome épidermoïde ORL) d'isoler des cellules endothéliales tumorales (TEC) qui expriment 40 fois plus la protéine Doppel que les cellules endothéliales normales (NEC) (*figure 1*). Ces TEC, en culture *in vitro*, continuent à exprimer Doppel lorsqu'elles sont cultivées en présence de milieu conditionné provenant de la lignée SCC7.

Pour étudier la régulation de l'angiogenèse, les auteurs ont mis au point un modèle *in vivo* : ils ont réalisé la co-transfection stable de cellules HUVEC par le cDNA de Doppel et le gène de la luciférase, permettant d'évaluer *ex vivo* la croissance des vaisseaux par bioluminescence, après transplantation chez la souris sous forme de sphéroïdes, selon une technique devenue classique. Ils ont observé le développement d'une vascularisation homogène des transplants, raccordée à celle de l'animal, recouverte par les cellules murales de l'hôte. La croissance des vaisseaux est 8 fois plus importante dans les transplants de cellules endothéliales transfectées par Doppel (HU^{+luc+dpl}) que dans ceux provenant de cellules transfectées simplement par la luciférase (HU^{+luc}) (*figure 2*), indiquant un rôle majeur de Doppel dans le développement vasculaire.

Afin d'étudier le mécanisme par lequel Doppel stimule l'angiogenèse, les auteurs ont *screené*, après stimulation par du sérum foetal de veau ou du VEGFA, le profil de phosphorylation d'une palette de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et de kinases cytoplasmiques ; le profil est similaire dans les deux types de cellules transfectées (HU et HU^{dpl}), à l'exception du niveau de phosphorylation de VEGFR2, nettement plus élevé dans les cellules HU^{dpl}. L'addition d'un anticorps anti-Doppel entraîne une réduction de la phosphorylation de VEGFR2 et de toute une série de kinases d'aval (AKT, ERK1/2, p70^{S6K}, SRC) (*figure 3*) mais pas celle de TIE2 et d'autres RTK, montrant ainsi un blocage sélectif des voies ouvertes par VEGFR2. Aucune modification du taux de phosphorylation des kinases n'est en revanche détectable dans les cellules HU non transfectées.

Les auteurs ont alors montré une interaction physique entre le VEGFR2 et la

protéine Doppel par PLA (*proximity ligation assay*) et co-immunoprécipitation (*figure 4*). Cette interaction est spécifique et n'est observée ni avec le VEGFR1, ni avec le VEGFR3. De plus, VEGFR2 et Doppel sont co-intériorisées lorsque l'on induit l'inhibition du récepteur par l'anticorps anti-Doppel ou par l'anticorps anti-VEGFR2. Cette intériorisation de VEGFR2 induite par l'anti-Doppel est distincte de celle induite par le VEGFA lors de la désensibilisation du récepteur : cette dernière est suivie du recyclage de VEGFR2 vers la membrane, alors que celle induite par l'anti-Doppel ou l'anti-VEGFR2 sont suivies de la destruction lysosomale de VEGFR2 (*figure 5*).

Les auteurs se sont alors attaqués au problème du ciblage thérapeutique de Doppel comme thérapie anti-angiogénique potentielle, en tirant parti de son affinité pour les héparanes sulfates. Ils ont généré des TEC privés de l'expression de Doppel par shRNA pour les comparer aux TEC natifs riches en Doppel, et les ont implantés sous forme de sphéroïdes dans le flanc de souris immunodéficientes. Les interactions des GAG avec Doppel ont été étudiées avec une héparine de faible poids moléculaire (LMWH), dont l'affinité avec Doppel est élevée ($KD = 0,43 \mu M$). La formation des vaisseaux dans les implants Doppel^{-/-} est très inférieure à ce qu'elle est dans les implants exprimant Doppel et l'accumulation de LMWH y est également très inférieure ; ces LMWH se localisent bien au niveau des vaisseaux des implants (*figure 6*). Ces résultats apportent bien la preuve que les LMWH ciblent bien l'endothélium tumoral exprimant Doppel : dès lors, on peut songer à utiliser ce type d'héparine comme véhicule pour diriger un outil thérapeutique vers Doppel.

Le type d'outil thérapeutique proposé par les auteurs est un conjugué d'acide désoxycholique et d'héparine de faible poids moléculaire (*figure 7*), qu'ils ont appelé LHbisD4. Ce composé présente les mêmes interactions que les LMWH sur Doppel et sur la vascularisation des implants de TEC ; cependant, la présence d'acide désoxycholique augmente sa charge négative et promeut l'intériorisation inactivatrice de Doppel et de VEGFR2 et leur adressage vers le lysosome de la même façon que l'anticorps anti-Doppel (*figure 8*). En outre, et c'est sans doute la raison du choix de la conjugaison des LMWH avec de l'acide désoxycholique, le LHbisD4 peut être administré par voie orale...

Il fallait passer des modèles d'implants de sphéroïdes de cellules endothéliales aux modèles tumoraux ; les auteurs ont repris la tumeur SCC7, cette fois-ci utilisée en tant que tumeur à traiter et non plus en tant que génératrice de TEC. Les résultats sont probants : le LHbisD4 se localise exclusivement dans la tumeur et pas dans les organes comme le cerveau, le cœur, le rein ou le foie. Dans la tumeur il est bien

concentré au niveau vasculaire où il se co-localise avec Doppel (*figure 9*). D'autres modèles tumoraux transplantés chez la souris immunodéficiente confirment ces résultats.

Il ne suffit pas d'atteindre la tumeur, encore faut-il inhiber sa croissance : à la dose de 10 mg/kg per os, un effet antitumoral est observé dans le modèle SCC7 (*figure 10*) comme dans le modèle de cancer du sein triple-négatif MDA-MD231, avec un effet très net sur la vascularisation, ce qui confirme bien le mécanisme d'action envisagé pour ce composé.

Les auteurs ont ainsi validé une voie de signalisation, mis au point et développé une approche thérapeutique originale de l'angiogenèse tumorale. La rigueur de l'expérimentation, la cohérence et la progressivité de la démarche expérimentale suivie, jointe à la mise au point de modèles pertinents originaux, font de cet article un véritable modèle à suivre pour les scientifiques. La Corée du Sud où a été réalisée cette étude est devenue un pays de recherche performante et on se prend à rêver de ce que serait la science mondiale si tous les pays consacraient autant d'efforts qu'elle à développer une recherche imaginative et rigoureuse.

Liens d'intérêts : L'auteur déclare ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Illustrations

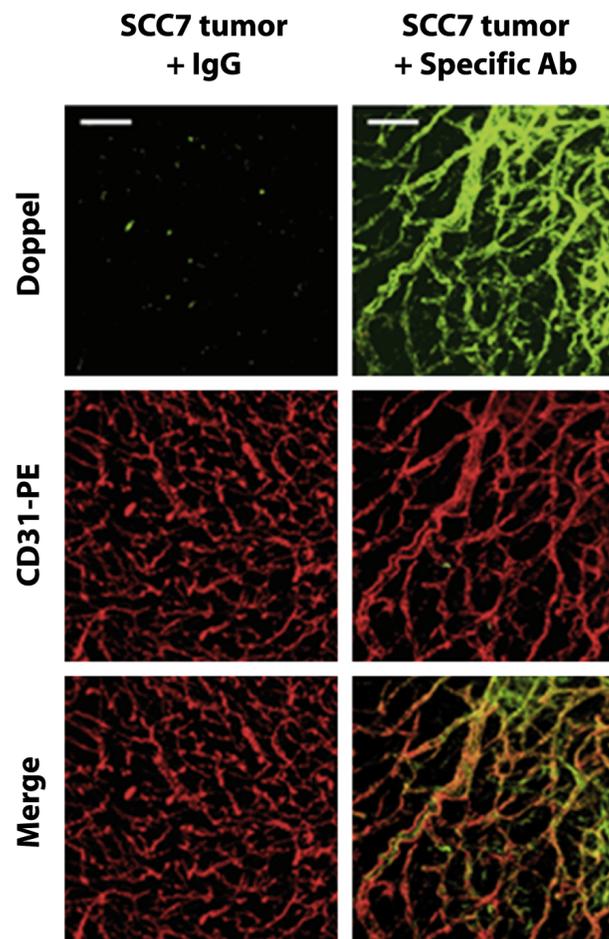


Figure 1. Colocalisation de la protéine Doppel et du marqueur endothélial CD31 dans la tumeur SCC7 implantée dans des souris immunodéficientes. De haut en bas : marquage de Doppel, de CD31 et des deux protéines simultanément par un contrôle négatif (à gauche) et par un anticorps spécifique (à droite).

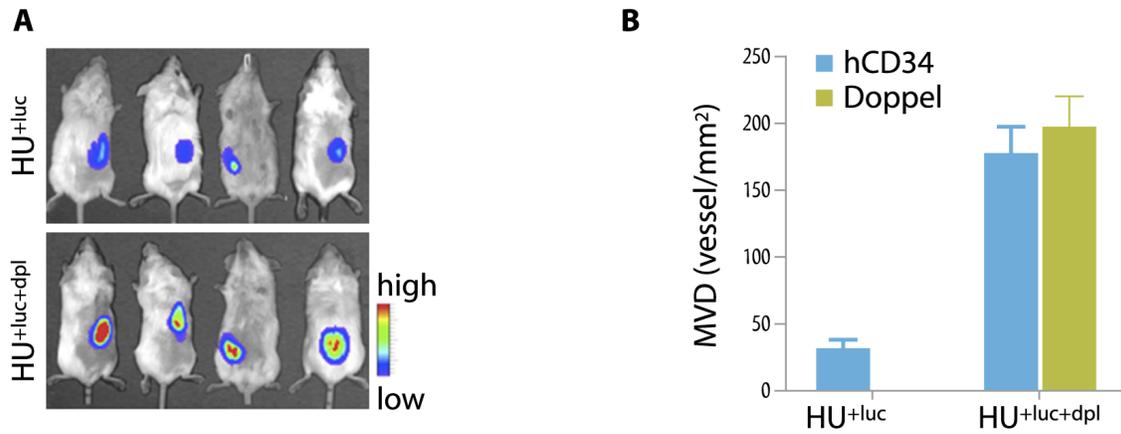


Figure 2. A. Imagerie par bioluminescence *in vivo* d'implants de cellules HUVEC transfectées par les cDNA du seul gène de la luciférase (HU^{+Luc}, en haut) ou par les cDNA du gène de la luciférase et celui du gène *PRND* codant la protéine Doppel (HU^{+Luc+Dpl}, en bas), dans des souris immunodéficientes. B. Quantification du nombre de vaisseaux par mm² (MVD = *microvascular density*) dans des implants de même provenance, à l'aide d'un anticorps dirigé contre le marqueur endothélial CD34 humain. Doppel n'est pas exprimée dans les implants HU^{+Luc}. ****p* < 0,001, n = 4.

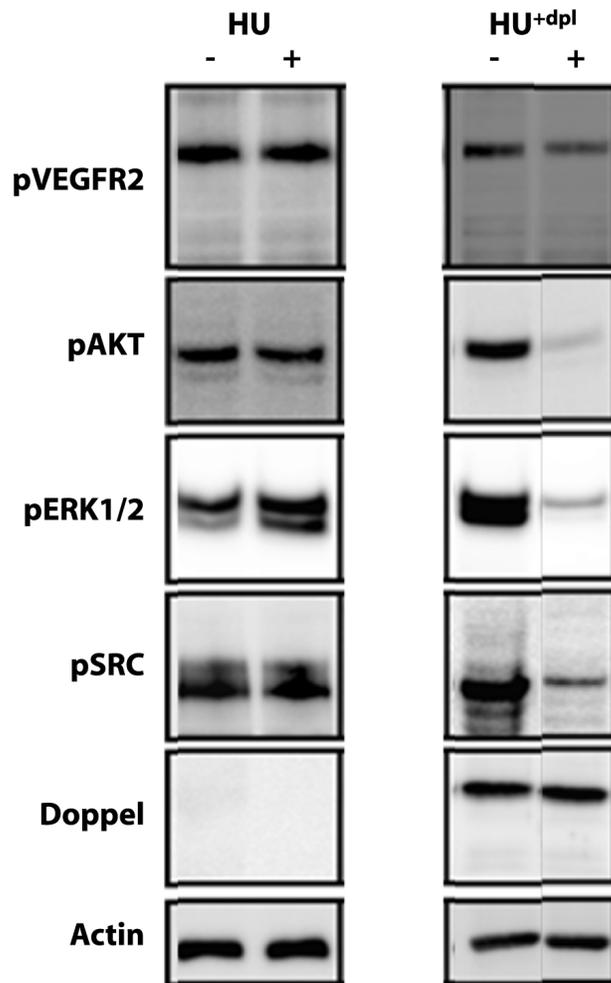


Figure 3. Western blots montrant l'expression *in vitro* de plusieurs kinases phosphorylées, de la protéine Doppel et de l'actine (contrôle) dans des cellules HUVEC natives (HU) ou transfectées par le cDNA du gène codant Doppel (HU^{dpl}). Les bandes de gauche (-) sont obtenues à l'état basal, les bandes de droite (+) sont obtenues après incubation des cellules avec un anticorps anti-Doppel.

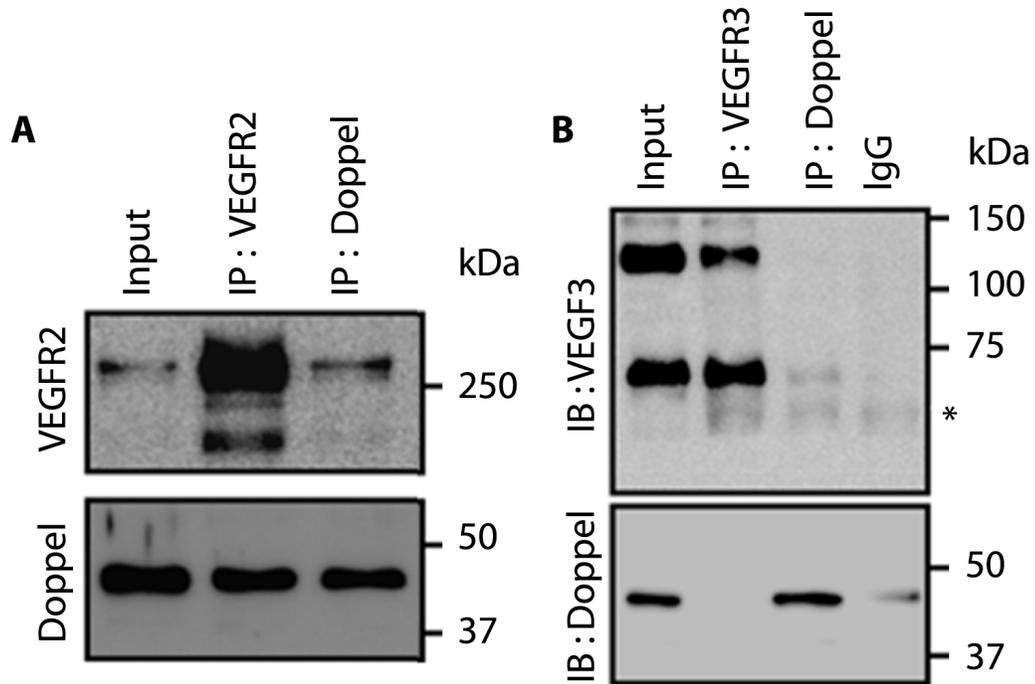


Figure 4. Co-immunoprécipitation de la protéine Doppel avec VEGFR2 (A) mais pas avec VEGFR3 (B), obtenue dans des extraits protéiques de cellules endothéliales tumorales (TEC). A. Le Western blot montre que l'immunoprécipitation de VEGFR2 entraîne Doppel dans le précipité et que celle de Doppel entraîne VEGFR2. B. L'immunoprécipitation de VEGFR3 n'entraîne que VEGFR3 et celle de Doppel n'entraîne que Doppel.

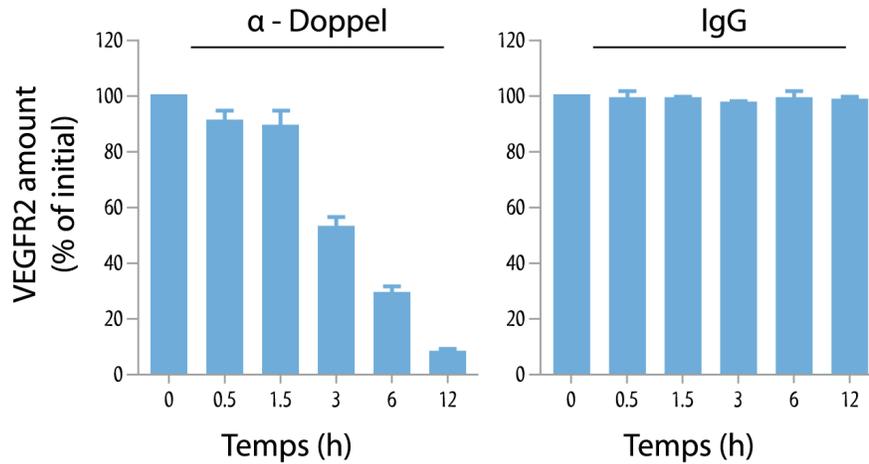


Figure 5. Quantification de Western blots montrant la disparition progressive de VEGFR2 de cellules endothéliales tumorales (TEC) incubées en présence d'un anticorps anti-Doppel (α -Doppel), alors que VEGFR2 reste constant quand les cellules sont incubées avec une immunoglobuline aspécifique (IgG). Ceci montre que Doppel régule l'internalisation de VEGFR2 et le maintient fonctionnel.

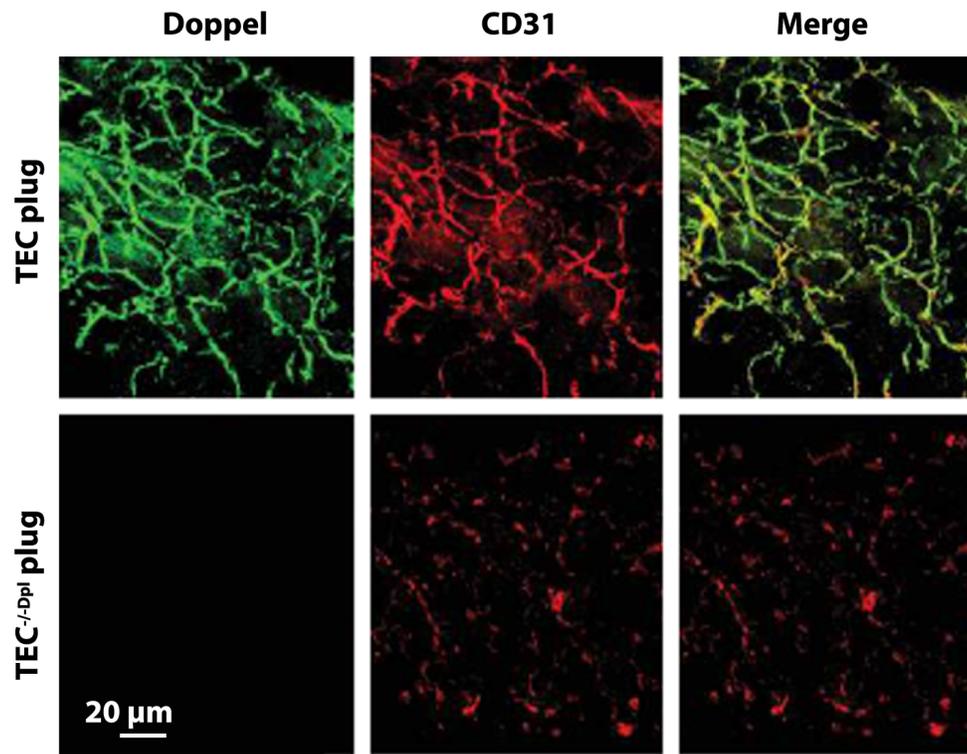


Figure 6. Co-localisation de Doppel avec le marqueur endothélial CD31 *in vivo*, dans des implants de cellules endothéliales tumorales (TEC) natives (en haut) ou dans lesquelles l'expression du gène codant Doppel est inhibée (en bas).

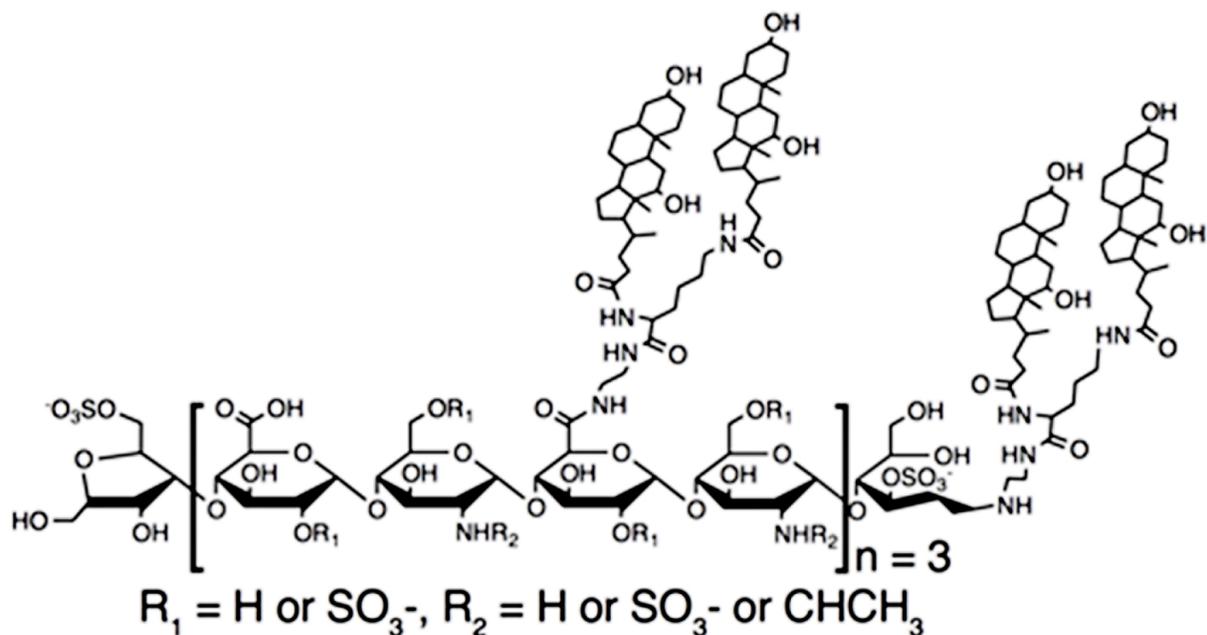


Figure 7. Structure de la molécule polymérique LHbisD4 proposée comme anti-angiogénique, faite d'un enchaînement linéaire de résidus osidiques sulfatés (héparine) sur lequel sont branchés des résidus d'acide désoxycholique.

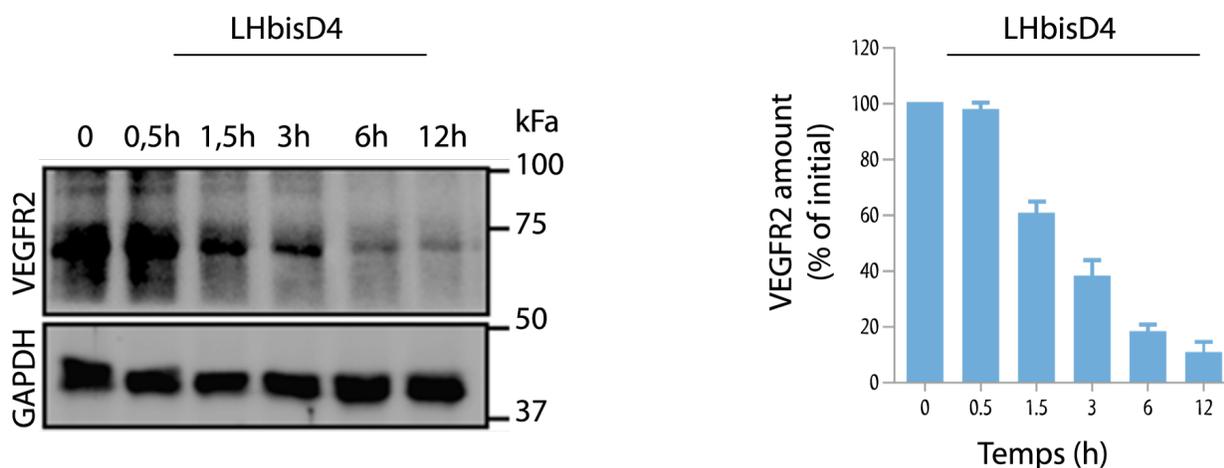


Figure 8. Western blot (à gauche) et sa quantification (à droite) montrant dans des cellules endothéliales tumorales (TEC) en culture, *in vitro*, la disparition progressive de VEGFR2 sous l'effet de la molécule LHbisD4 proposée comme anti-angiogénique. L'effet est comparable à celui de l'anticorps anti-Doppel dans le même modèle (Cf. *figure 5*).

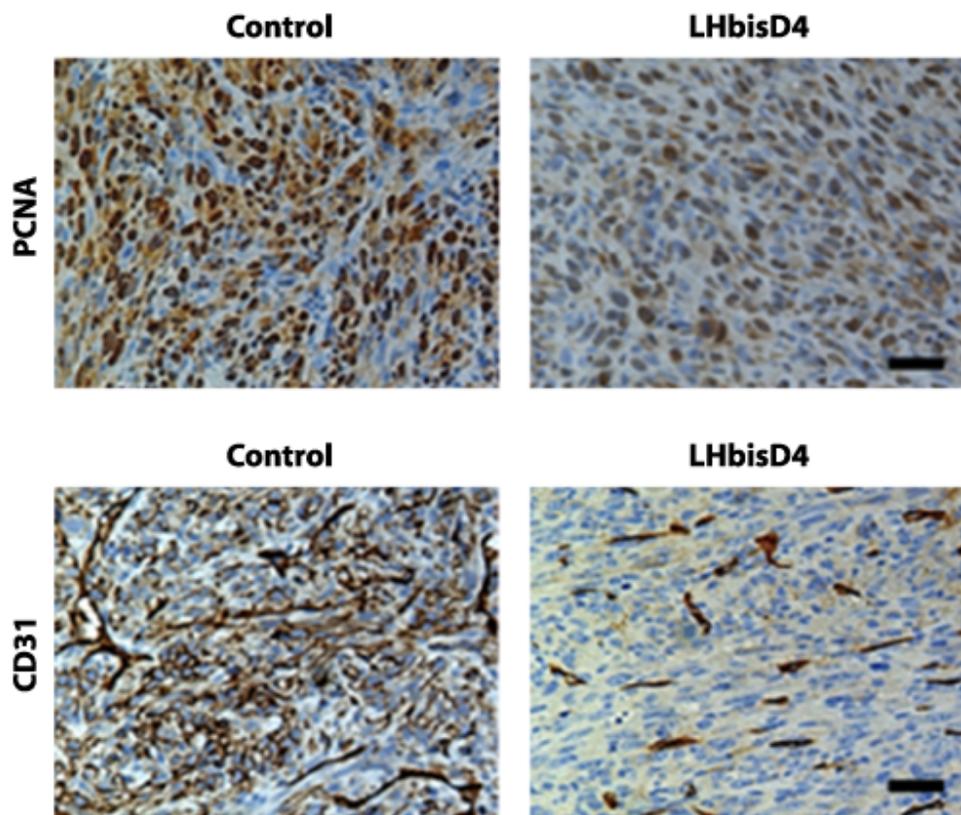


Figure 9. Effet de LHbisD4 sur la prolifération cellulaire (en haut) et sur l'angiogenèse (en bas) dans des tumeurs SCC7 transplantées dans des souris immunodéficientes. Les anticorps utilisés dans ces images d'immunohistochimie sont dirigés contre PCNA (un marqueur général de prolifération) et contre CD31 (un marqueur des cellules endothéliales).

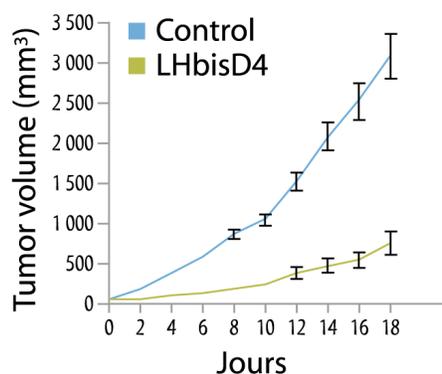


Figure 10. Effet antitumoral *in vivo* de LHbisD4 à la dose de 10 mg/kg sur des tumeurs SCC7 transplantées chez des souris immunodéficientes.