

Les exosomes dérivés des cellules dendritiques

par S. Amigorena

Unité INSERM U520, Institut Curie, 12, rue Lhomond, 75005 Paris, France.

Reçu le 18 décembre 2000

RÉSUMÉ

Les cellules dendritiques (CDs) sont les seules cellules présentatrices d'antigènes capables d'activer les lymphocytes T naïfs, étape indispensable à l'initiation des réponses immunitaires. Nous avons montré que les CDs sécrètent des vésicules membranaires de

60-80 nm de diamètre, appelés exosomes. Les exosomes provoquent de puissantes réponses immunitaires anti-tumorales chez la Souris, et le rejet total et durable de tumeurs établies.

SUMMARY Dendritic cell-derived exosomes

Dendritic cells (DC) are potent antigen presenting cells and the only ones capable of inducing primary cytotoxic immune responses both *in vivo* and *in vitro*. DCs secrete a 60-80 nm membrane vesicle population of endocytic origin, called exosomes. The protein composition of exosomes was analyzed using a systematic proteomic approach. Besides MHC and costimulatory molecules, exosomes bear several adhesion proteins, probably involved in their specific targeting. Exosomes also accumulate several cytosolic factors, most likely involved in exosome's biogenesis in

late endosomes. Like DCs, exosomes induce potent anti tumor immune responses *in vivo*. Indeed, a single injection of DC-derived exosomes sensitized with tumor peptides induced the eradication of established mouse tumors. Tumor-specific cytotoxic T lymphocytes were found in the spleen of exosome treated mice, and depletion of CD8⁺ T cells *in vivo* inhibited the anti tumor effect of exosomes. These results strongly support the implementation of human DC-derived exosomes for cancer immunotherapy.

Les tumeurs portent des antigènes spécifiques qui sont reconnus par le système immunitaire et peuvent servir de cibles à une immunothérapie (Boon & Old, 1997). Différentes stratégies d'immunothérapie antitumorale ont été développées ces dernières années. L'une des plus prometteuses s'appuie sur l'utilisation des cellules dendritiques (CD), seules cellules présentatrices d'antigènes capables d'initier des réponses immunitaires en activant les lymphocytes T naïfs au repos (Banchereau & Steinman, 1998). Le schéma général de cette approche est illustré dans la figure 1. Des CD différenciées sont obtenues à partir des monocytes sanguins du patient par incubation en présence de GM-CSF et d'IL4. Ces CD sont qualifiées d'immatures, parce que leurs capacités d'endocytose et de phagocytose sont fortes et leur activité stimulatrice des cellules T faible. Les CD immatures doivent être sensibilisées par les antigènes tumoraux, ce qui est en général accompli à l'aide de peptides synthétiques qui sont dérivés de ceux-ci. Les méthodes de sensibili-

sation alternatives développées récemment comprennent l'utilisation de vecteurs viraux, de cellules tumorales apoptotiques ou d'ARN (Fernandez *et al.*, 1998).

Après sensibilisation des CD par des antigènes tumoraux, il faut encore induire leur maturation en CD stimulatrices des cellules T, avant de les injecter au patient par voie sous-cutanée. La maturation est le plus souvent induite à l'aide d'un cocktail de cytokines, qui comporte du TNF. Plusieurs essais cliniques de phase I fondés sur ces protocoles ont été publiés (Nestlé *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1999, Thurner *et al.*, 1999; Kugler *et al.*, 2000). Ils n'ont pas détecté de toxicité (mis à part l'apparition de vitiligo dans plusieurs cas de mélanome). Des réponses immunologiques et cliniques objectives ont été décrites chez environ 25 à 30 % des patients souffrant de lymphome, de mélanome ou de carcinome rénal.

Dans ces dernières années nous avons développé une stratégie d'immunothérapie alternative, fondée sur l'utilisation des exosomes, une population de vésicules mem-

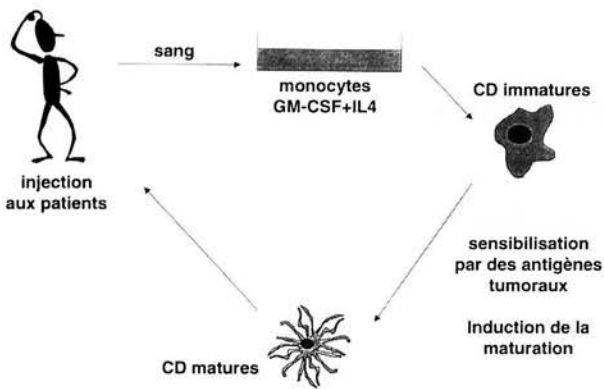


FIG. 1. – Immunothérapie basée sur les cellules dendritiques (CD).

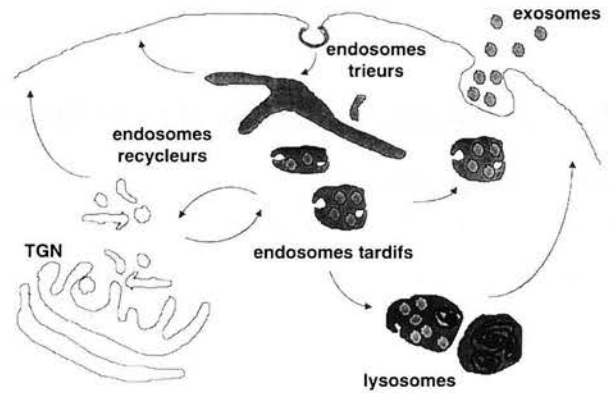


FIG. 2. – Production d'exosomes.

branaires qui peuvent être comparées à des « liposomes naturels ». Nous avons montré que, comme d'autres types cellulaires (Johnstone, 1992 ; Raposo *et al.*, 1996), les CD produisent et sécrètent des exosomes. La biogenèse des exosomes a lieu au sein d'une population particulière d'endosomes (appelés endosomes tardifs ou endosomes multivésiculaires) par l'invagination de la membrane limitante de l'exosome vers l'intérieur du compartiment (Fig. 2). Après avoir bourgeonné, les vésicules s'accumulent dans la lumière de l'endosome, jusqu'à ce que l'ensemble du compartiment fusionne avec la membrane plasmique, sécrétant ainsi les vésicules internes (dès lors désignées comme des exosomes) dans le milieu extracellulaire. Les exosomes peuvent être purifiés à partir du surnageant de culture des CD par ultrafiltration et ultracentrifugation.

Des exosomes produits par des CD sensibilisés à l'aide de peptides tumoraux ont induit des réponses immunes antitumorales assez puissantes pour éradiquer des tumeurs établies chez la Souris (Zitvogel *et al.*, 1998). L'effet des exosomes sur la croissance des tumeurs requiert des cellules T et développe la mémoire immunitaire, puisque les souris dont les tumeurs avaient ainsi régressé restaient résistantes au développement de la même tumeur même plusieurs mois plus tard. Des études comparatives conduites sur les mêmes modèles tumoraux montrent que l'immunothérapie par les exosomes est plus efficace que l'immunothérapie par les CD.

Une analyse protéomique extensive des exosomes de CD murines a permis d'identifier la plupart des constituants exosomaux majeurs et d'établir une carte moléculaire de ce compartiment cellulaire (Thery *et al.*). Mis à part les peptides du MHC et les molécules costimulatrices des cellules T, les exosomes contiennent des protéines cytosoliques variées, apparentées à celles des exosomes, qui comprennent la HSc70, la Gi2 et l'annexine II. Ces protéines sont probablement impliquées dans la biogenèse intracellulaire des exosomes. Différentes protéines membranaires impliquées dans l'adhérence cellulaire, par exemple plusieurs intégrines

et CD9, s'accumulent dans les exosomes. De plus, de manière tout à fait inattendue, une protéine soluble des globules lipidiques du lait, la lactadherine, est également très enrichie dans les exosomes. Ces protéines sont très probablement responsables du ciblage des exosomes sur les cellules effectrices et de leur activité biologique.

Les CD humaines sécrètent elles aussi des exosomes, très semblables dans leur morphologie et leur composition aux exosomes murins. Une procédure de purification d'exosomes dérivés des CD humaines a été mise au point pour l'usage clinique. Un essai de phase I, utilisant des exosomes produits par des CD sensibilisées par des peptides antigéniques tumoraux, commencera cette année en France et aux USA sur des mélanomes et des cancers pulmonaires (Fig. 3).

Un deuxième aspect de la biologie des exosomes concerne les vésicules produites par les cellules tumorales (Wolfers *et al.*, soumis pour publication). Les exosomes dérivés des cellules tumorales partagent beaucoup des marqueurs trouvés sur les exosomes dérivés des CD, de même que leurs caractères morphologiques (taille et forme). Des exosomes purifiés à partir de lignées tumo-

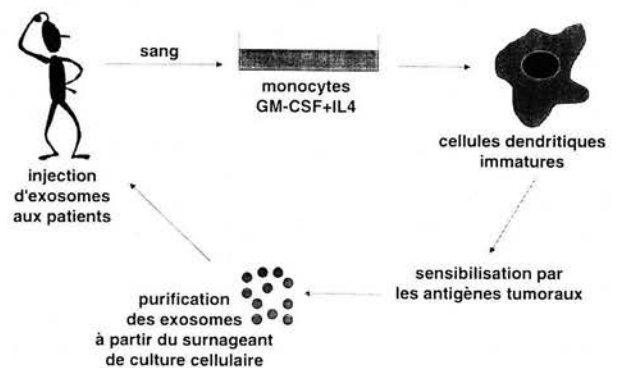


FIG. 3. – Exosomes dérivés des cellules dendritiques et immunothérapie anti-tumorale.

rales murines ont été incubés avec des CD. Ces CD sensibilisées ont vacciné des souris contre la prise de tumeurs identiques ou même allogéniques. De même, ces CD ont fait régresser des tumeurs autologues ou allogéniques déjà établies. Les exosomes assurent donc une protection croisée ou permettent un traitement croisé dans plusieurs modèles murins. Quand des cellules tumorales irradiées ou des lysats de cellules tumorales ont été utilisés, aucun effet antitumoral n'a été observé. Les effets antitumoraux requièrent des cellules T, indiquant que le rejet de la tumeur résulte d'une réponse T spécifique. Par conséquent les exosomes tumoraux contiennent toute « l'information antigénique » dont les CD ont besoin pour initier des réponses antitumorales spécifiques et efficaces.

Finalement nous avons également montré, à l'aide d'un modèle de mélanome humain, que les antigènes tumoraux peuvent être transformés et présentés aux cellules T spécifiques, après que les exosomes du mélanome aient été phagocytés par les CD. Ces exosomes contiennent des antigènes tumoraux comme MelanA/MART1 ou comme la tyrosinase et des protéines de choc thermique telles que hsc70.

Nous réfléchissons à l'heure actuelle à la possibilité d'utiliser les exosomes dérivés des cellules tumorales comme source d'antigènes tumoraux non identifiés pour sensibiliser les CD en immunothérapie cancéreuse.

BIBLIOGRAPHIE

- Banchereau J. & Steinman R.M., Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392, 245-252.
- Boon T. & Old L.J., Cancer Tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.*, 1997, 9, 681-683.
- Fernandez N., Duffour M.T., Perricaudet M., Lotze M.T., Tursz T. & Zitvogel L., Active specific T-cell-based immunotherapy for cancer: nucleic acids, peptides, whole native proteins, recombinant viruses, with dendritic cell adjuvants or whole tumor cell-based vaccines. Principles and future prospects. *Cytokines Cell Mol. Ther.*, 1998, 4, 53-65.
- Johnstone R.M., Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem. Cell Biol.*, 1992, 70, 179-190.
- Kugler A., Stuhler G., Walden P., Zoller G., Zobywalski A., Brossart P., Trefzer U., Ullrich S., Muller C.A., Becker V., Gross A.J., Hemmerlein B., Kanz L., Muller G.A., & Ringert R.H., Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids [see comments]. *Nat. Med.*, 2000, 6, 332-336.
- Murphy G.P., Tjoa B.A., Simmons S.J., Ragde H., Rogers M., Elgamal A., Kenny G.M., Troychak M.J., Salgaller M.L. & Boynton A.L., Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment. *Prostate*, 1999, 39, 54-59.
- Nestle F.O., Aljagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G. & Schadendorf D., Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells [see comments]. *Nature Medicine*, 1998, 4, 328-332.
- Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., Leijendekker R., Harding C.V., Melief C.J.M. & Geuze H.J., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.*, 1996, 183, 1161-1172.
- Thery C., Regnault A., Garin J., Wolfers J., Zitvogel L., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G. & Amigorena S., Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.*, 1999, 147, 599-610.
- Thurner B., Haendle I., Roder C., Dieckmann D., Keikavoussi P., Jonuleit H., Bender A., Maczek C., Schreiner D., von den Driesch P., Brocker E.B., Steinman R.M., Enk A., Kampgen E. & Schuler G., Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *Journal of Experimental Medicine*, 1999, 190, 1669-1678.
- Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G. & Amigorena S., Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, 1998, 4, 594-600.