

Immunothérapie antitumorale par les exosomes de cellules dendritiques

Le développement de vaccins anticancéreux efficaces nécessite l'identification d'antigènes tumoraux qui permettront d'induire des réponses immunitaires capables de détruire les cellules cancéreuses [1]. Les réactions immunitaires cellulaires sont prédominantes dans la destruction des tumeurs cancéreuses, ce qui a conduit à rechercher des antigènes reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques [2]. Afin de protéger l'hôte contre l'établissement des tumeurs, il est donc nécessaire d'augmenter la fréquence des précurseurs cytotoxiques spécifiques de tumeurs. Différentes stratégies ont été mises en œuvre à cette fin. L'une des approches les plus prometteuses est d'agir sur les cellules présentatrices d'antigènes originaires de la moelle osseuse, les cellules dendritiques [3, 4]. Ce sont en effet les seules cellules présentatrices d'antigènes capables d'initier des réponses immunitaires, humorales ou cytotoxiques, primaires ou secondaires [3, 4].

L'immunothérapie anticancéreuse spécifique nécessite l'expansion *in vivo* ou *ex vivo* et la sensibilisation des cellules dendritiques par des antigènes tumoraux. Les méthodes de sensibilisation employées à ce jour reposent sur l'utilisation d'antigènes tumoraux sous forme de protéines natives intactes, de peptides antigéniques reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques, d'acides nucléiques et de virus recombinants [3]. Les cellules dendritiques ainsi sensibilisées sont ensuite injectées par voie intraveineuse ou intradermique. Les effets anticancéreux chez la souris sont très puissants, et les premiers résultats cliniques très encourageants [3, 5]. Cependant, une meilleure connaissance de la biogenèse des cellules dendritiques et de leurs capacités de présentation antigénique pourrait

permettre d'améliorer l'efficacité des traitements.

Les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes

Les cellules dendritiques existent sous deux états fonctionnels distincts, correspondant à deux stades de maturation : au stade immature, elles sont disséminées à travers l'organisme, dans des organes non lymphoïdes, plus particulièrement aux sites d'interface de l'organisme avec l'extérieur (peau, muqueuses) [3, 4]. Elles internalisent et appréhendent des antigènes, mais leur capacité de stimulation des lymphocytes T est faible. Différents stimulus inflammatoires, tels que le lipopolysaccharide (LPS, constituant de la paroi bactérienne) ou des cytokines (interleukine-1, IL-1 ou *tumor necrosis factor* α , TNF α) induisent la maturation des cellules dendritiques. Pendant ce processus de maturation, les cellules dendritiques perdent leur capacité d'internaliser les antigènes et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires dans lesquels, arrivées à maturité, elles sont très efficaces pour présenter aux lymphocytes T les peptides dérivés des antigènes ingérés au stade immature. Les interactions cellulaires entre les cellules dendritiques mûres et les lymphocytes T sont très efficaces du fait de l'augmentation d'expression des molécules du CMH de classes I et II et de molécules costimulatrices telles que B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) et CD40. De plus, les cellules dendritiques mûres produisent des cytokines, telles que l'interleukine-12, impliquées dans l'induction de lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) et auxiliaires (CD4⁺) [3].

Nous avons montré qu'outre les contacts directs avec les lymphocytes T et la production de cytokines, les

cellules dendritiques pourraient aussi déclencher des réponses immunitaires par la sécrétion de vésicules présentatrices d'antigènes, appelées exosomes [6]. Les exosomes représentent les vésicules internes des endosomes tardifs multivésiculaires ; ils sont sécrétés après fusion de la membrane externe des endosomes multivésiculaires avec la membrane cytoplasmique et on peut les comparer à des liposomes naturels [7]. Les lymphocytes B humains transformés par le virus d'Epstein-Barr sécrètent des exosomes qui portent des molécules HLA-DR fonctionnelles pour stimuler les lymphocytes T CD4⁺ [7].

Immunothérapie anticancéreuse spécifique par les exosomes

Nous avons montré que les cellules dendritiques murines et humaines sécrètent elles aussi des exosomes qui peuvent être purifiés à partir des surnageants de culture par ultracentrifugation différentielle [6]. Les préparations d'exosomes purifiés contiennent une population homogène de vésicules d'un diamètre de 60-90 nm. Les exosomes produits par les cellules dendritiques portent des marqueurs absents de la surface cellulaire tels que CD63 et CD82 (protéines résidentes des lysosomes). Ils expriment aussi des molécules de classes I et II du CMH ainsi que des molécules costimulatrices CD86 (B7.2).

Les exosomes produits par des cellules dendritiques chargées en peptides tumoraux induisent des lymphocytes T cytotoxiques *in vivo* et éradiquent des tumeurs établies chez la souris. Nous avons étudié les effets anti-tumoraux des exosomes produits par les cellules dendritiques dans deux systèmes tumoraux : (1) P815, un mastocytome de souris immunogène, mais très agressif (syngénique des souris

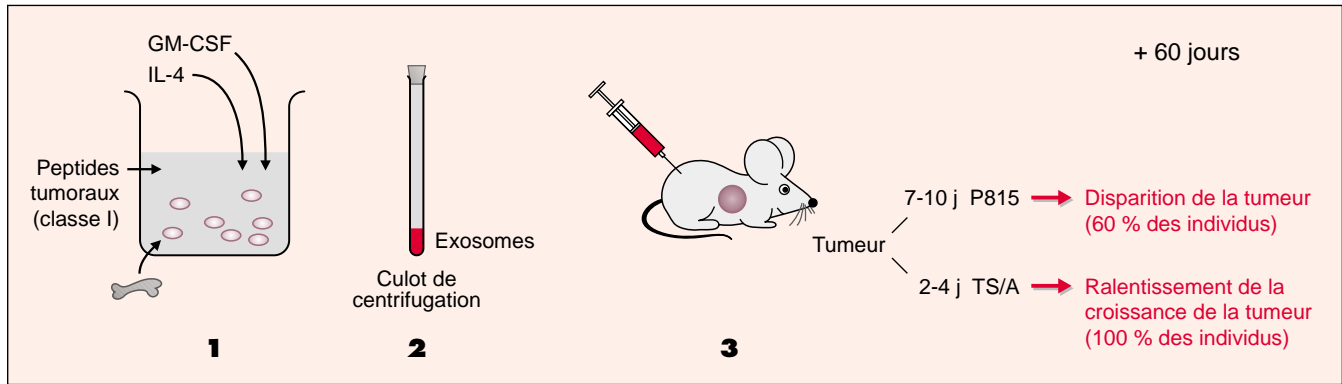


Figure 1. **Protocole développé pour préparer les exosomes de cellules dendritiques.** (1) Sensibilisation de cellules dendritiques (produites à partir de moelle osseuse en 5 à 7 jours d'incubation en présence de GM-CSF et d'IL-4) avec des peptides purifiés à partir des molécules de classe I du CMH des cellules tumorales correspondantes. (2) Purification des exosomes à partir du surnageant de culture des cellules dendritiques par centrifugation différentielle. (3) Injection intradermique des exosomes purifiés (3-5 µg de protéines d'exosomes/souris) à des souris portant des tumeurs établies (7-10 jours pour P815 et 2-4 jours pour TS/A).

DBA/2, H-2d); très peu d'immunothérapies efficaces sur des tumeurs établies depuis 10 jours ont été décrites à ce jour; (2) TS/A un carcinome mammaire spontané (syngénique des souris BALB/c, H-2d); peu immunogène, il exprime peu de molécules de classe I. Le protocole est détaillé sur la figure 1. Les tumeurs P815, qui ont été établies depuis 8-10 jours avec le double de la dose minimale tumorigène par injection sous-cutanée, ont un diamètre de 50 à 90 mm². Après une semaine, la croissance de la tumeur est arrêtée dans les groupes d'animaux traités avec des exosomes produits par des cellules dendritiques chargées en peptides de la tumeur autologue et 60% des souris n'ont plus de tumeur 60 jours après l'injection. Ces animaux ont acquis une mémoire immunologique spécifique, car ils rejettent une dose létale de cellules P815, mais pas de cellules de la leucémie syngénique L12.10. L'effet antitumoral des exosomes dépend aussi de la présence de lymphocytes T, car les exosomes n'ont pas d'effets sur des tumeurs établies dans des souris athymiques *nu/nu*. En outre, les exosomes stimulent directement des réponses CTL spécifiques de la tumeur chez les souris portant P815. Dans le cas de TS/A, un important ralentissement de la croissance de la tumeur a été observé chez 100% des souris. Chez les souris traitées, deux pathologistes différents n'ont pu détecter de métastases pulmonaires au 40^e jour de traitement. En

revanche, des exosomes de cellules dendritiques pulsées avec des peptides élués de cellules de rate syngénique n'ont pas montré d'effet antitumoral. Ainsi, une seule injection d'exosomes produits par des cellules dendritiques chargées avec les peptides dérivés de tumeurs induit une réponse T cytotoxique spécifique chez la souris, efficace pour ralentir la croissance ou faire régresser des tumeurs établies. Ces résultats précliniques sont très encourageants pour l'utilisation des exosomes en immunothérapie anticancéreuse chez l'homme. En tant que vaccin anticancéreux, les exosomes associent les avantages des cellules dendritiques (association des molécules de classes I et II du CMH avec des molécules co-stimulatrices des lymphocytes T) à ceux des vecteurs acellulaires. L'utilisation thérapeutique des exosomes nécessitera cependant leur caractérisation biochimique détaillée et l'analyse des mécanismes moléculaires à la base de leur activité biologique ■

RÉFÉRENCES

1. Robbins PF, Kawakami Y. Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 628-36.
2. Rosenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today* 1997; 18: 175-82.
3. Hart DNJ. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-87.

4. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245- 52.
5. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles T, Czerwinski D, Taidi B, Engelman E, R Levy. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52- 8.
6. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998; 4: 594-600.
7. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding CV, Melief CJM, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996; 183: 1-12.

Armelle Regnault
Graça Raposo
Sebastian Amigorena
CJF 95-01 Inserm et UMR 144, Institut Curie, 12, rue Lhomond, 75005 Paris, France.

Laurence Zitvogel
Cnrs URA 1301 et Laboratoire d'immunologie cellulaire, Département de biologie clinique, Institut Gustave-Roussy, 39, rue Camille-Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France.

TIRÉS À PART
 S. Amigorena.