

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole doctorale : Gc2iD

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement

par Angélique BOBRIE

le lundi 9 juillet 2012

**Sujet : Rôle des protéines Rab27 dans la sécrétion des exosomes :
implication dans l'étude des réponses immunitaires tumorales**

Jury :

Pr. Eric Tartour, Président

Dr. Clotilde Théry, Directrice de thèse

Dr. Nathalie Chaput, Rapporteur

Pr. Claude Leclerc, Rapporteur

Dr. François Darchen, Examineur

Dr. Michel Vidal, Examineur

Résumé

Une tumeur est une structure complexe dans laquelle de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires sont impliqués et forment le « microenvironnement tumoral ». Les cellules immunitaires sont fortement présentes au sein des tumeurs et participent au développement tumoral. La communication entre les cellules tumorales et les cellules voisines peut se faire par des contacts directs ou par des contacts indirects via des facteurs solubles ou des vésicules membranaires. Les exosomes sont des vésicules extracellulaires formées dans des compartiments intracellulaires de la voie d'endocytose. Les fonctions des exosomes purifiés ont été étudiées par de nombreux groupes, confirmant leur potentiel à être des médiateurs de la communication entre cellules, mais le rôle des exosomes sécrétés *in vivo* n'est pas connu. Le but de ces travaux de thèse était d'étudier les fonctions des exosomes produits *in vivo* par les tumeurs, dans la croissance tumorale et dans la réponse immunitaire tumorale.

Dans un premier temps, nous avons inhibé la sécrétion des exosomes par des tumeurs murines en interférant avec l'expression de Rab27a, petite GTPase nécessaire à la sécrétion des exosomes dans le modèle humain HeLa. L'analyse des vésicules produites nous a permis de montrer l'existence de plusieurs populations de vésicules dans les culots d'exosomes, dont la sécrétion dépend ou non de Rab27a. Dans un second temps, nous avons montré que les carcinomes mammaires 4T1 n'exprimant pas Rab27a ont une progression ralentie *in vivo*. L'expression de Rab27a est nécessaire à un fort recrutement de neutrophiles dans ces tumeurs. Les exosomes, conjointement avec les cytokines produites par les cellules 4T1, induisent *in vitro* une accumulation de neutrophiles à partir de cellules de la moelle osseuse. Notre hypothèse est que les cytokines permettraient d'une part la mobilisation de cellules myéloïdes ou neutrophiles de la moelle osseuse et que les exosomes induiraient d'autre part la survie et/ou la différenciation et/ou l'activation de neutrophiles ayant une activité pro-tumorale. Rab27a n'est en revanche pas impliqué dans le développement du carcinome mammaire TS/A. Ces tumeurs n'induisent pas le même type de réponse immunitaire, et possèdent probablement d'autres mécanismes pour permettre leur croissance.

L'étude de l'expression de RAB27A dans des biopsies de cancer du sein montre que cette protéine est surexprimée dans les tumeurs par rapport au tissu sain, et cette surexpression est encore plus importante dans les tumeurs de grade élevé. Ceci soutiendrait l'hypothèse d'un rôle de RAB27A dans le développement des cancers du sein humains. RAB27A pourrait alors être envisagée comme un nouveau marqueur de diagnostic et/ou une nouvelle cible thérapeutique.

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS.....	4
I. INTRODUCTION.....	5
A- DEVELOPPEMENT TUMORAL ET REPOSES IMMUNITAIRES.....	5
1/ La tumeur et le microenvironnement tumoral.....	6
2/ Les capacités acquises par les tumeurs	7
a) Potentiel répliatif illimité.....	8
b) Résistance à la mort cellulaire programmée.....	9
c) Insensibilité à l'inhibition de croissance	10
d) Autosuffisance envers les signaux de prolifération	10
e) Induction de l'angiogenèse.....	11
f) Invasion tissulaire et dissémination métastatique	12
3/ La réponse immunitaire tumorale	14
a) Rappels sur le système immunitaire.....	14
b) De la théorie de l'immunosurveillance à l'immunoédition des cancers.....	16
c) Les trois phases de l'immunoédition	20
(1) L'élimination.....	20
(2) L'équilibre.....	21
(3) Echappement.....	23
d) L'immunoédition chez l'Homme.....	25
(1) Etude des patients immunodéficients	25
(2) Des indices d'une réponse immunitaire tumorale.....	26
e) Rôles pro-tumoraux du système immunitaire.....	28
(1) Les lymphocytes T régulateurs	28
(2) Les macrophages	30
(3) Les neutrophiles	34
(4) Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs).....	38
B- LES EXOSOMES.....	43
1/ Découverte des exosomes.....	44
2/ Les exosomes : définition.....	46
3/ La biogenèse des exosomes	47
a) Présentation de la voie de production et de sécrétion des exosomes...47	
b) Formation des vésicules intraluminales et adressage aux exosomes...49	
(1) Les protéines ESCRT	49
(2) Les tétraspanines.....	49
(3) Les phénomènes d'oligomérisation des protéines	50
(4) La céramide.....	50
(5) Adressage des ARN aux exosomes.....	51
c) Fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique.....	51
d) Régulation de la sécrétion des exosomes	53

4/ La composition des exosomes.....	54
a) Composition protéique des exosomes	54
b) Composition lipidique des exosomes	55
c) Des acides nucléiques dans les exosomes.....	56
5/ Fonctions des exosomes secrétés par les cellules tumorales.....	57
a) Mécanismes d'interaction des exosomes avec les cellules voisines.....	58
b) Les fonctions des exosomes tumoraux dans l'immunité tumorale	61
(1) Rôles anti-tumoraux des exosomes par activation du système immunitaire.....	61
(2) Rôles pro-tumoraux des exosomes par modulation du système immunitaire.....	63
(3) Rôles pro-tumoraux des exosomes indépendants du système immunitaire.....	66
6/ Les exosomes en clinique.....	69
a) Les exosomes comme outils de diagnostic.....	69
b) Les exosomes en immunothérapie	69
C- LES PROTEINES RAB27	72
1/ La famille des protéines Rab.....	73
a) Le cycle d'activation des protéines Rab.....	73
b) Les protéines Rab et l'identité des membranes	74
c) Les fonctions des protéines Rab dans le trafic vésiculaire intracellulaire	75
2/ Les protéines Rab27.....	76
a) Expression des protéines Rab27 dans les différents types cellulaires	76
b) Rôles des protéines Rab27 dans la sécrétion de compartiments vésiculaires	78
(1) Rab27a	79
(2) Rab27b	80
c) Rab27 et sécrétion de compartiments vésiculaires : mécanismes moléculaires	81
(1) Rab27 et mobilité des vésicules	81
(2) Rab27 et l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique.....	82
d) Rab27 et la sécrétion des exosomes	85
D- OBJECTIFS DE LA THESE	87
II. RESULTATS	88
A- EXISTENCE DE SOUS-POPULATIONS D'« EXOSOMES » (article 1)	88
a) Introduction.....	88
b) Résultats et discussion.....	89
B- LES EXOSOMES DANS LA REPOSE IMMUNITAIRE TUMORALE : modèles de carcinomes mammaires murins (article 2)	93
a) Introduction.....	93
b) Résultats et discussion.....	94

C- LES EXOSOMES DANS LA REPOSE IMMUNITAIRE TUMORALE :	
<u>résultats annexes</u>	100
<u>1/ Modèle de fibrosarcome murin exprimant un antigène sur les</u>	
<u>exosomes : MCA OVA-C1C2</u>	100
a) Introduction.....	100
b) Matériels et méthodes.....	101
c) Résultats	103
d) Discussion.....	106
<u>2/ Modèle de cancer du sein humain : MDA-MB-231</u>	108
a) Introduction.....	108
b) Matériels et méthodes.....	109
c) Résultats	110
d) Discussion.....	113
III. DISCUSSION	116
A- RESUME DES RESULTATS	116
B- LES POPULATIONS DE VESICULES ET SOUS-POPULATIONS	
<u>D'EXOSOMES</u>	118
<u>1/ Les limites du travail</u>	118
<u>2/ Comparaison avec les données de la littérature</u>	120
a) Hétérogénéité des vésicules dans les culots d'exosomes.....	120
b) Les marqueurs d'exosome : quelle spécificité ?	122
<u>3/ Perspectives</u>	123
C- LE ROLE DES PROTEINES RAB27 DANS LES VOIES DE SECRETION ...	125
<u>1/ Les limites du travail</u>	125
<u>2/ Comparaison avec les données de la littérature</u>	126
a) Les protéines Rab et la sécrétion des exosomes.....	126
b) Rab27a et la sécrétion des exosomes	128
c) Rab27a et la sécrétion de facteurs solubles	128
<u>3/ Perspectives</u>	130
D- LES EXOSOMES ET LA REPOSE IMMUNITAIRE TUMORALE	132
<u>1/ Les limites du travail</u>	132
<u>2/ Comparaison avec les données de la littérature</u>	136
a) Les exosomes dans la croissance tumorale : modèle 4T1	136
b) Les exosomes dans la croissance tumorale : modèle	
MCA-OVA-C1C2.....	137
c) Les exosomes dans la croissance tumorale : modèle TS/A	139
d) Neutrophiles ou cellules myéloïdes suppressives ?	140
<u>3/ Perspectives</u>	143
E- Questions ouvertes	145
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	148

ABBREVIATIONS

AAT : antigène associé aux tumeurs
CFSE : carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMH I ou II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
CSF : colony-stimulating factor
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DC : dendritic cell
DMBA : 7,12-dimethylbenzanthracène
EGF : epithelial growth factor
FoxP3 : forkhead box P3
G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor
GAP : GTPase-activating protein
GDF : GDI displacement factor
GDI : GDP dissociation inhibitor
GEF : Guanine exchange factor
GGT : Geranylgeranyl transferase
GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Gr1 : récepteur de granulocyte 1
ILV : intraluminal vesicle
LFA-1 : leucocyte function associated antigen-1
LPS : lipopolysaccharides
LT : lymphocyte T
MAGE : melanoma-associated antigen
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MDSC : myeloid-derived suppressor cell
MPO : myelopéroxydase
MVB : multivesicular body
NE : neutrophil elastase
NK : natural killer cell
NKT : natural killer T cell
NO : nitric oxide
pDC : plasmacytoid dendritic cell
PS : phosphatidylsérine
REP : Rab escort protein
ROS : reactive oxygen species
SCF : stem cell factor
SNARE : soluble NSF attachment protein
SOD : superoxide dismutase
STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3
TIM-1 : T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein 1
TIMP-1 / TIMP -2 : tissue inhibitor of metalloprotease 1 / 2
TLR : toll-like receptor
TNF : tumor necrosis factor
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg : lymphocytes T régulateurs
VEGF : vascular endothelial growth factor

I. INTRODUCTION

Au cours de cette thèse, nous avons étudié le rôle des exosomes sécrétés par les tumeurs *in vivo* dans le développement tumoral, et plus particulièrement dans la réponse immunitaire tumorale.

Je me suis donc intéressée tout au long ce travail de thèse aux stratégies mises en places par les tumeurs pour permettre leur développement. Je vais ainsi présenter dans une première partie de l'introduction comment se développent les tumeurs et quelles capacités elles acquièrent afin de permettre leur croissance. Je discuterai aussi dans cette même partie de la réponse immunitaire qui se met en place au sein de la tumeur, étant donné que je l'ai plus particulièrement étudiée au cours de mon projet.

De nombreux acteurs moléculaires et cellulaires participent à la croissance tumorale et à la modulation de la réponse immunitaire au sein des tumeurs. La principale question de ce projet était de savoir si les exosomes produits par les tumeurs *in vivo* étaient eux aussi impliqués dans ces phénomènes. Dans une seconde partie de l'introduction, je présenterai ce que sont les exosomes, quelles sont leurs caractéristiques et quelles sont les fonctions qui ont déjà été attribuées aux exosomes sécrétés par les tumeurs notamment vis à vis de la réponse immunitaire.

Afin de répondre à la question sur les rôles joués par les exosomes tumoraux dans le développement des tumeurs, nous avons choisi d'inhiber leur sécrétion dans des lignées tumorales murines et de suivre *in vivo* le développement de ces tumeurs ne sécrétant pas (ou peu) d'exosomes. L'inhibition de la sécrétion des exosomes par les cellules tumorales a été réalisée en abolissant l'expression de la petite GTPase Rab27a. Ainsi, dans la troisième et dernière partie de cette introduction, nous présenterons rapidement la famille des protéines Rab et leur rôle dans le trafic des compartiments intracellulaires. Nous discuterons ensuite plus en détails de la sous-famille des protéines Rab27 qui sont impliquées dans la sécrétion des exosomes.

A- DEVELOPPEMENT TUMORAL ET REPONSES IMMUNITAIRES

Dans cette première partie, nous allons brièvement décrire comment se développe une tumeur, depuis les mutations génétiques au niveau d'une cellule, jusqu'à la formation

d'un ensemble complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires et facteurs moléculaires. Nous décrirons ensuite les capacités que les tumeurs acquièrent au cours de leur développement et qui leur permettent de croître de façon non contrôlée dans l'organisme. Enfin, nous discuterons plus en détails des interactions entre les cellules du système immunitaire et la tumeur.

1/ La tumeur et le microenvironnement tumoral

Le cancer est une maladie qui constitue un problème de santé publique avec une incidence en constante augmentation. Les possibles causes sont multiples et il existe une grande variété de cancers pouvant se développer au sein d'un même organe, et pouvant toucher les différents organes d'un même organisme. Les cellules cancéreuses se caractérisent par leur potentiel à croître de façon illimitée en résistant à la mort cellulaire, à envahir le tissu dans lequel elles se trouvent, mais aussi les tissus distants, ce qui aboutira finalement au décès de l'hôte.

Les premières études sur la biologie des tumeurs visant à comprendre le développement tumoral ont d'abord mis en évidence une cause génétique au cancer, avec la découverte des proto-oncogènes (Roussel et al., 1979; Spector et al., 1978; Stehelin et al., 1976). Deux principales catégories de gènes dont l'expression est altérée dans les tumeurs ont ainsi été décrites : les proto-oncogènes (qui favorisent la prolifération) et les gènes suppresseurs de tumeurs (gènes impliqués dans le blocage du cycle cellulaire et dans l'induction de l'apoptose). Les oncogènes sont touchés par une mutation « gain de fonction », alors que des mutations « perte de fonction » sont présentes au niveau des gènes suppresseurs de tumeur. Les mutations sont maintenues dans le génome des cellules filles issues de la réplication de la cellule mutée. L'existence de ces modifications génétiques a été démontrée dans les tumeurs humaines et murines, et les études chez la souris confirment la capacité de ces mutations à induire le développement d'un cancer. Au cours des 35 années de recherche qui ont suivi la découverte des proto-oncogènes, il a été montré que l'expression de nombreux autres gènes peut être altérée dans les cellules cancéreuses, dotant ces dernières d'une variété de nouvelles propriétés. Au sein de la tumeur, chaque mutation génétique apportant une fonction nécessaire à la croissance et au contournement des barrages existant au sein de l'organisme dans le but d'empêcher ce type de développement anarchique sera

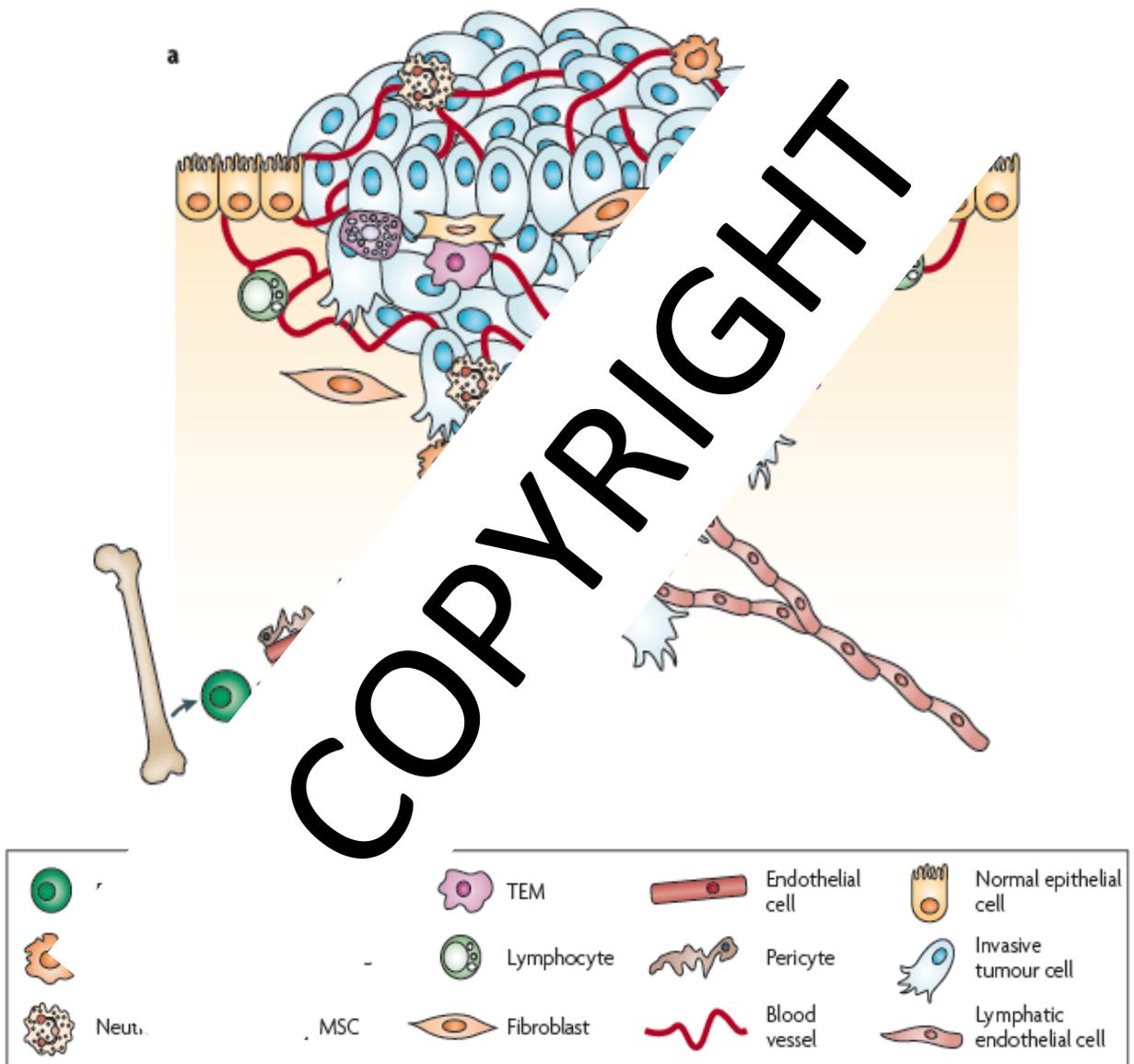


Figure 1.1 : La composante cellulaire du microenvironnement tumoral.

Au sein de la tumeur sont présents des vaisseaux sanguins composés de cellules endothéliales et de péricytes, des vaisseaux lymphatiques, des fibroblastes, diverses cellules issues de la moelle osseuse (BMDCs = Bone marrow-derived cells) dont des lymphocytes, neutrophiles, macrophages, mastocytes, monocytes (TEMs = Tie2-expressing monocytes), cellules myéloïdes suppressives (MDSCs = myeloid-derived suppressor cells), cellules souches mésenchymateuses (MSCs = mesenchymal stem cells).

Joyce, J.A. and Pollard, J.W. *Nature Reviews*, 2009

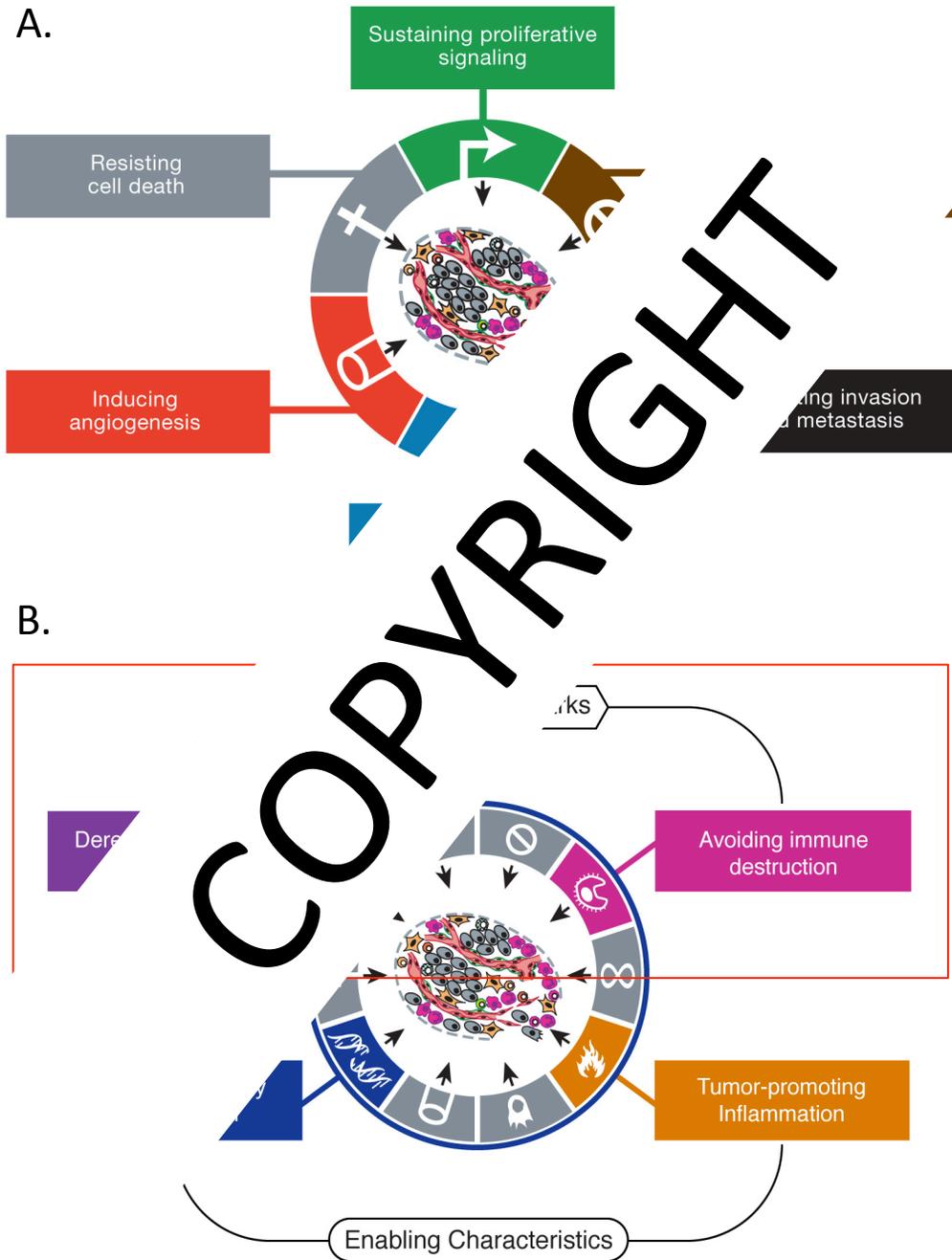
conservée et transmise au cours des cycles réplicatifs. Les cellules tumorales accumulent ainsi les mutations dans leur génome afin de continuer à proliférer et à survivre dans l'organisme.

Ainsi, pendant de nombreuses années, le cancer était considéré comme une maladie due uniquement à la présence de ces mutations génétiques et à leurs conséquences. Mais après une trentaine d'années de recherche, nous savons désormais que la tumeur est un environnement complexe, et que les différents composants du microenvironnement tumoral, autre que les cellules cancéreuses, participent aussi activement à son développement (Hanahan and Weinberg, 2011; Tlsty and Coussens, 2006) (**figure 1.1**). Si dans un premier temps la formation de la tumeur est initiée par des mutations génétiques qui aboutissent au dérèglement de plusieurs voies de signalisation, dans un second temps, les acteurs moléculaires et cellulaires déjà présents sur le site ou recrutés par la suite prennent aussi part au processus de tumorigenèse. On distingue : (1) les acteurs cellulaires que sont les fibroblastes, les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules de l'immunité innée et adaptative et les cellules myéloïdes non différenciées en provenance de la moelle osseuse, (2) les acteurs moléculaires dont la matrice extracellulaire et l'ensemble des protéines solubles (enzymes, cytokines, chimiokines, facteurs de croissance). Les cellules qui composent le microenvironnement tumoral sont influencées par les interactions (directes ou à distance) avec les cellules cancéreuses : leurs fonctions sont ainsi modifiées et leurs effets vis à vis des cellules tumorales aussi. Le plus souvent ce détournement d'activité se fera en faveur de la progression tumorale.

Les tumeurs présentent des capacités bien particulières, acquises par les cellules tumorales ou par les cellules du microenvironnement, nécessaires à la survie et à la croissance progressive de cette structure. Nous allons décrire ces capacités, importantes pour la compréhension du déroulement du développement tumoral sur lequel portent mes travaux de recherche.

2/ Les capacités acquises par les tumeurs

En 2000, Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) décrivent six capacités acquises par la grande majorité des cancers humains et indispensables à leur développement (**figure1.2 A**) : (1) potentiel réplicatif illimité, (2)



Hanahan and Weinberg, 2011

Cell
PRESS

Figure 1.2 : Les différentes capacités acquises par les tumeurs, et les deux caractéristiques favorisant le développement de ces capacités.

A. Les six caractéristiques classiques acquises par les cellules tumorales décrites dès 2000. B. Les capacités dites émergentes et les propriétés participant à l'acquisition des différentes capacités tumorales.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A., Cell, 2012

échappement à la mort cellulaire programmée, (3) insensibilité à l'inhibition de croissance, (4) autosuffisance envers les signaux de prolifération, (5) induction de l'angiogenèse, (6) invasion tissulaire et dissémination métastatique. Au cours des années qui ont suivi, les mêmes auteurs ont affiné leur modèle en ajoutant d'autres caractéristiques, elles aussi observées dans de nombreux cancers et essentielles à leur progression, qu'ils ont nommées « caractéristiques émergentes » (**figure 1.2 B, encadré**): (1) modifications du métabolisme énergétique, (2) échappement au système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011). Nous reviendrons par la suite et plus en détail sur l'échappement au système immunitaire, la réponse immunitaire tumorale étant un élément crucial pour mon projet de thèse. Mais tout d'abord, nous allons présenter les six principales capacités des tumeurs, afin de rappeler les principaux phénomènes cellulaires et moléculaires essentiels à la croissance tumorale.

a) Potentiel répliatif illimité

Toutes les cellules somatiques ont une capacité de réplication limitée (Hayflick, 1997), et ce de façon intrinsèque, indépendamment de la présence ou non de signaux mitogènes dans le milieu ou de l'état de différenciation de la cellule. Ceci est dû à la réplication incomplète des télomères aux extrémités de chaque chromosome par l'ADN-polymérase : 50 à 100 paires de bases d'ADN télomérique sont perdues à chaque cycle de division. Les télomères maintiennent l'intégrité chromosomique en les empêchant de fusionner entre eux par leurs extrémités. Leur rétrécissement à chaque cycle entraîne des aberrations chromosomiques qui conduisent à la mort de la cellule. Les télomères jouent donc un rôle clé dans le potentiel répliatif de chaque cellule et dans l'intégrité de l'information génétique transmise aux cellules des générations suivantes. Cependant, il existe dans les cellules souches un mécanisme capable de maintenir la taille des télomères, conférant ainsi une capacité répliatif illimitée à ces cellules. La télomérase est l'enzyme essentielle de ce processus : elle ajoute des séquences d'acides nucléiques au niveau des télomères au moment de la réplication, et évite ainsi le raccourcissement. Cette enzyme est exprimée dans les cellules souches mais ne l'est pas dans les cellules somatiques. Pourtant, elle est exprimée dans environ 90% des cellules tumorales (Shay and Bacchetti, 1997), leur conférant un pouvoir de réplication illimité. Ces cellules sont pour cette raison qualifiées de cellules « immortelles ».

b) Résistance à la mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée est l'induction par la cellule de sa propre mort lorsque les conditions extracellulaires ou intracellulaires ne sont plus favorables à la survie de la cellule. Des « senseurs » perçoivent les signaux de mort ou de survie, et en fonction de la proportion de chacun d'eux, ils vont induire ou non l'activation d'« effecteurs » qui déclencheront le processus de mort cellulaire par apoptose. Il existe une voie extrinsèque et une voie intrinsèque d'induction de l'apoptose. Les voies extrinsèques les plus fréquentes sont les voies Fas/Fas-L et TNF-RI/TNF α . L'activation d'un de ces récepteurs de mort induira l'activation de caspases initiatrices qui à leur tour activeront des caspases effectrices. Les caspases (cystéine aspartate protéases) sont des protéases à cystéines qui clivent des protéines au niveau de séquences cibles contenant un aspartate. Lorsqu'elles sont activées, elles induisent une cascade protéolytique dans le cytoplasme qui conduit à l'activation d'enzymes effectrices dont le rôle est de dégrader les constituants cellulaires. Il y a finalement dissolution de la cellule sous forme de corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules environnantes et par des cellules immunitaires spécialisées. La voie intrinsèque peut être induite par la détection de dommages au niveau de l'ADN (la protéine p53 joue alors un rôle clé, et pour cette raison, le gène *p53* est un gène suppresseur de tumeur) ou par l'hyperactivation d'un oncogène. Cette voie va directement induire la perte de la polarité mitochondriale et la libération du cytochrome c qui va participer à la formation de l'apoptosome. L'apoptosome est un complexe protéique qui induit l'activation des caspases puis de la cascade protéolytique décrite précédemment. Les protéines contrôlant la libération du cytochrome c sont les protéines de la famille Bcl-2 composée de membres pro-apoptotiques (Bax et Bak) et de membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et A1). Dans une cellule saine, il y a un équilibre entre les membres pro et anti-apoptotiques. Quand les signaux pro-apoptotiques sont plus nombreux, les protéines Bax et Bak se trouvent en surnombre et forment des pores dans la membrane mitochondriale externe par où s'échappe le cytochrome c.

C'est en 1972 qu'il a été proposé pour la première fois que l'apoptose serait une barrière au développement des cancers (Kerr et al., 1972). Les tumeurs présentent des niveaux élevés de signalisation via des protéines oncogènes, mais aussi de nombreux dommages au niveau de l'ADN dus à l'intense prolifération et à l'environnement inflammatoire. Elles présentent donc des signaux qui devraient induire leur apoptose.

Mais les cellules cancéreuses ont acquis de nombreux mécanismes leur permettant de résister à cette mort programmée dont quelques uns sont cités ci-après : (1) Une perte d'expression de p53 est retrouvée dans près de 50% des tumeurs, et permet aux cellules d'être insensibles envers les signaux pro-apoptotiques intrinsèques. (2) On constate dans diverses cellules cancéreuses une augmentation de l'expression des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques et/ou une diminution de celles jouant un rôle pro-apoptotique. (3) Dans certains cancers, les cellules surexpriment un récepteur Fas tronqué (absence de la partie cytosolique responsable de la signalisation intracellulaire) capable de capturer les molécules de Fas L mais ne pouvant pas déclencher de signalisation intracellulaire.

c) Insensibilité à l'inhibition de croissance

Le nombre de cellules au sein d'un organe est contrôlé par un mécanisme appelé « inhibition de contact », dû aux interactions établies entre les cellules et à la pression exercée par la masse cellulaire composant l'organe. Les signaux envoyés par les cellules environnantes activent des voies de signalisation qui ont pour finalité d'inhiber la prolifération cellulaire. Pour cette raison, les gènes codant les protéines impliquées dans ces voies sont des gènes « suppresseurs de tumeurs ». Les plus connues sont la protéine RB (protéine associée aux rétinoblastomes) et la protéine p53. Toutes deux inhibent la prolifération cellulaire, et peuvent dans certaines conditions induire l'entrée en apoptose des cellules. Une cellule qui porte une mutation inactivant l'une ou l'autre de ces protéines (ou d'autres protéines impliquées dans les mêmes voies de signalisation) aura donc un avantage sélectif. Cette cellule pourra en effet proliférer malgré l'inhibition de contact, et comme nous le verrons dans le paragraphe suivant elles seront aussi insensibles à l'induction de l'apoptose.

d) Autosuffisance envers les signaux de prolifération

Au sein d'un tissu, la majorité des cellules sont dans un état quiescent, c'est à dire en phase G0 du cycle de division cellulaire et ne se divisent donc pas. Pour qu'une cellule puisse entrer de nouveau dans le cycle, il faut que les conditions internes et externes le lui permettent. Les signaux externes sont des facteurs de croissance qui sont sécrétés par les cellules environnantes. Ils transmettent un signal mitogène à la cellule en se liant à des récepteurs transmembranaires spécifiques exprimés à la surface des cellules

cibles. Ces récepteurs sont en général des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) qui, une fois activés, induisent une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la transcription de gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. Parmi les voies de signalisation en aval de ces récepteurs se trouvent notamment la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase), la voie de la PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), et la voie de la PLC γ (phospholipase C- γ). Ainsi, la concentration en facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire est un paramètre crucial de contrôle de la prolifération cellulaire, qui est régulé de façon très précise afin de maintenir l'homéostasie de chaque organe. Deux variables régulent la quantité de facteurs de croissance présents dans le milieu extracellulaire : le taux de sécrétion et la biodisponibilité (séquestration dans la matrice extracellulaire, nécessité d'une activation par diverses enzymes).

Les cellules tumorales peuvent contourner leur dépendance vis-à-vis de ces signaux mitogènes de différentes façons (Witsch et al., 2010) : (1) Elles augmentent la sécrétion de leurs propres facteurs de croissance, soit en les produisant elles mêmes, soit en induisant leur production par les cellules environnantes. (2) Elles augmentent leur capacité de réponse, c'est à dire leur sensibilité, aux signaux de survie : de nombreuses tumeurs surexpriment des récepteurs des facteurs de croissance à leur surface. Ainsi, de plus faibles concentrations du facteur de croissance pourront induire la prolifération cellulaire. (3) Enfin, certaines cellules tumorales deviennent indépendantes vis-à-vis des signaux mitogènes en exprimant des protéines mutantes constitutivement activées participant aux voies de signalisation concernées. Les gènes codant ces protéines appartiennent à la catégorie des proto-oncogènes.

e) Induction de l'angiogenèse

Toutes les cellules de l'organisme doivent se trouver à proximité d'un vaisseau sanguin afin de pouvoir s'approvisionner en nutriments et oxygène, ainsi que décharger les déchets métaboliques. Ceci est mis en place au cours du développement embryonnaire pendant l'organogenèse. Par la suite, le réseau vasculaire reste stable et n'est modifié que dans quelques rares cas et toujours de façon transitoire : au cours de la cicatrisation d'une blessure et au cours des cycles de reproduction féminins. Les tumeurs solides, lorsqu'elles grossissent forment une masse au centre de laquelle les

cellules sont trop éloignées des vaisseaux pour être approvisionnées en nutriments. Ainsi, le développement d'un réseau vasculaire intra-tumoral est nécessaire à leur développement. Au cours de la progression tumorale, une phase dénommée « switch angiogénique » ou conversion angiogénique a été décrite : les cellules tumorales acquièrent la possibilité d'induire l'angiogenèse, c'est à dire la formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire préexistant (Hanahan and Folkman, 1996). Dans un tissu sain, la quiescence du réseau vasculaire est permise par une balance entre : (1) des signaux pro-angiogéniques, dont les principaux sont les VEGF (vascular endothelial growth factor) A, B, C, D, E, et les FGF (acidic fibroblast growth factor) acide et basique (aFGF et bFGF). De nombreux autres facteurs pro-angiogéniques existent comme les angiopoïétines, les éphrines, l'EGF (epithelial growth factor) ou encore le PDGF (platelet-derived growth factor). (2) des signaux anti-angiogéniques comme la TSP-1 (thrombospondin-1), l'endostatine, l'angiostatine, la calréticuline et les interférons (Tonini et al., 2003). Afin d'induire leur réseau vasculaire, il a été montré dans de nombreux types de cancer que l'expression de VEGF et de FGF était augmentée dans les cellules tumorales, notamment en raison de l'hypoxie et par les voies de signalisation des oncogènes. Les stimuli environnementaux induisant la production de facteurs pro-angiogéniques sont constamment maintenus au sein de la masse tumorale en constante augmentation. Mais les cellules tumorales elles-mêmes ne sont pas les seules à répondre à ces stimuli et à participer à la conversion angiogénique. En effet, des cellules issues de la moelle osseuse (neutrophiles, macrophages, précurseurs myéloïdes, mastocytes) et migrant au site tumoral participent activement à la néo-vascularisation des tumeurs : certaines produisent du VEGF ou augmentent sa biodisponibilité par la sécrétion de la métalloprotéase MMP9 (qui le libère de la matrice extracellulaire) (Qian and Pollard, 2010), d'autres peuvent directement venir s'intercaler dans les vaisseaux sanguins renforçant ainsi leur structure.

f) Invasion tissulaire et dissémination métastatique

Les cellules cancéreuses se définissent par leur capacité à envahir les tissus adjacents et à former des métastases qui iront coloniser des tissus distants. La dissémination métastatique débute par la migration des cellules dans le tissu, jusqu'à atteindre un vaisseau sanguin ou lymphatique. Les cellules gagnent ensuite la lumière de

ce vaisseau (intravasation) et sont ainsi transportées via la circulation sanguine ou lymphatique dans tout l'organisme. Les cellules peuvent ensuite sortir du vaisseau (extravasation) et s'implanter dans un nouvel organe où elles formeront tout d'abord des micro-métastases, des métastases puis des tumeurs macroscopiques. Dans ce nouveau territoire, les cellules tumorales trouveront plus d'espace et de nutriments.

Les deux principaux mécanismes permettant l'acquisition de cette nouvelle aptitude par les cellules tumorales sont d'une part l'expression et la sécrétion d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire et d'autre part un changement d'expression des molécules d'adhérence, avec perte de celles impliquées dans l'ancrage au sein du tissu et de la tumeur (Berx and van Roy, 2009; Cavallaro and Christofori, 2004) (ex : E-cadhérine) et acquisition de celles impliquées dans les phénomènes de migration cellulaire (Cavallaro and Christofori, 2004) (ex : N-cadhérine). Il a été montré que tout ceci pouvait être orchestré par un programme de régulation de l'expression génique appelé « la transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM) au cours duquel les cellules acquièrent la capacité d'envahir les tissus, de se disséminer dans l'organisme et aussi de résister à l'apoptose (Klymkowsky and Savagner, 2009; Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Ce programme est normalement déclenché au cours du développement embryonnaire par différents facteurs de transcription dont l'expression a aussi été détectée dans différents types de cancer. L'activation de la TEM induit notamment la perte des jonctions adhérentes et la répression de l'expression de l'E-cadhérine, la sécrétion de métalloprotéases, et l'augmentation la motilité cellulaire. Ces changements correspondent à ceux observés pour les cellules tumorales qui acquièrent des capacités métastatiques. Les signaux induisant la TEM dans les cellules tumorales, ne sont pas encore bien définis, mais il semble que des interactions avec les cellules stromales au sein du microenvironnement tumoral pourraient déclencher ce programme.

On ne sait pas encore si toutes les cellules tumorales invasives passent par une transition épithélio-mésenchymateuse ou s'il existe d'autres voies permettant de déclencher la migration. Il a par ailleurs été montré que certaines cellules du microenvironnement tumoral pouvaient être impliquées dans l'acquisition du caractère migratoire des cellules cancéreuses (Joyce and Pollard, 2009; Qian and Pollard, 2010): les cellules myéloïdes de l'immunité innée peuvent sécréter des enzymes de dégradation

de la matrice extracellulaire ou encore faciliter, en les accompagnant physiquement, la migration et l'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux.

3/ La réponse immunitaire tumorale

Nous allons débiter cette partie avec un bref rappel sur le système immunitaire. Ensuite, nous décrirons comment le rôle du système immunitaire dans la croissance tumorale a été découvert et mis en évidence malgré quelques controverses. Nous décrirons plus en détail le processus d'immunoédition des cancers, puis nous présenterons quelques données portant sur l'existence de ce phénomène chez l'Homme. Cependant, si la mise en évidence de l'immunoédition mettait en avant un rôle plutôt anti-tumoral du système immunitaire, nous verrons dans une dernière partie que certaines cellules immunitaires, au contraire, jouent un rôle pro-tumoral, et ce par de multiples voies.

a) Rappels sur le système immunitaire

Le système immunitaire est composé de différents organes, cellules et molécules qui permettent à l'organisme de lutter contre les pathogènes qui pourraient agresser notre organisme. Ce système est activé lorsqu'il détecte des signaux de dangers et/ou des corps étrangers.

Les organes du système immunitaire sont appelés organes lymphoïdes. Le thymus et la moelle osseuse sont les organes lymphoïdes primaires où se différencient les cellules du système immunitaire. Les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) sont les organes lymphoïdes secondaires où les cellules immunitaires interagissent afin de mettre en place la réponse immunitaire.

Les acteurs cellulaires et moléculaires du système immunitaire se divisent en deux groupes : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

- Le système immunitaire inné est la première ligne de défense. Il existe dès la naissance et il se caractérise par la rapidité de sa réponse, une réaction non spécifique vis à vis d'un antigène donné, une faible diversité d'action, et l'absence de mémoire immunitaire. Le système du complément, les monocytes et macrophages, les polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles, les mastocytes, les cellules « natural killer »

(NK) et « natural killer T » (NKT) sont les acteurs de cette composante innée du système immunitaire.

- Le système immunitaire adaptatif est déclenché plus tardivement au cours de la réponse immunitaire, il va permettre la mise en place d'une réponse spécifique de l'antigène et d'une mémoire cellulaire. La mémoire immunitaire permet la mise en place d'une réaction plus rapide et plus efficace lors d'une nouvelle rencontre avec le même antigène. Les lymphocytes T et les lymphocytes B sont les cellules impliquées dans cette réponse immunitaire adaptative. Ce système est aussi appelé « acquis » car, contrairement au système inné, il évolue lors de sa rencontre avec les pathogènes : il y a sélection et amplification des lymphocytes portant un récepteur spécifique des antigènes détectés, puis maintien de cellules mémoires spécifiques après la résolution de l'infection. Cette spécificité de réponse vis à vis d'un antigène donné est permise par l'existence d'une très grande diversité des récepteurs T (TCR) et B (BCR) due à des recombinaisons somatiques au niveau des séquences de gènes codant certains domaines, appelés « domaines variables », de ces récepteurs.

- Le lien entre la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative est assuré les cellules dendritiques (DCs). Les DCs jouent le rôle de cellules sentinelles au sein de l'organisme, sondant constamment l'environnement afin de détecter des signaux anormaux ou des corps étrangers. Lorsqu'elles détectent un signal de danger les DCs vont aller déclencher la réponse adaptative, alors que la réponse innée démarre immédiatement. Les DCs activées suivent un processus de maturation au cours duquel elles perdent leur capacité à sonder l'environnement et augmentent leur capacité à présenter les antigènes et à activer les lymphocytes T et lymphocytes B. Elles deviennent des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles (APCs) : après capture des pathogènes ou de molécules microbiennes, elles dégradent les protéines et génèrent des peptides antigéniques qu'elles présentent aux LT via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II. Au cours de leur maturation, elles migrent vers les ganglions lymphatiques drainants où elles présenteront l'antigène et activeront les cellules du système immunitaire adaptatif. De plus, en fonction du type de pathogène ou de signaux de danger que les DCs ont rencontré, elles expriment différents marqueurs et produisent différentes cytokines qui leur permettent d'orienter de façon adaptée le type de réponse immunitaire adaptative qui va se mettre en place.

Mouse immunodeficiency	Immune status	Tumour susceptibility relative to wild-type mice
Rag1 ^{-/-} or Rag2 ^{-/-}	Lacks T cells, B cells and NKT cells	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous intestinal neoplasms
Rag2 ^{-/-} Stat1 ^{-/-}	Lacks T cells, B cells and NKT cells; insensitive to IFN α , IFN β and IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous intestinal neoplasms
SCID BALB/c	Lacks T cells, B cells and NKT cells	↑ MCA-induced sarcomas
Tcrb ^{-/-}	Lacks $\alpha\beta$ T cells	↑ MCA-induced sarcomas
Tcrd ^{-/-}	Lacks $\gamma\delta$ T cells	↑ MCA-induced sarcomas ↑ DMBA- plus TPA-induced papillomas
Tcrb ^{-/-} Tcrd ^{-/-}	Lacks $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells	↑ DMBA- plus TPA-induced papillomas
J α 281 TCR gene-segment deficiency	Lacks NKT-cell subset	↑ MCA-induced sarcomas
Lmp2 ^{-/-}	Lacks LMP2 subunit	↑ MCA-induced sarcomas
Asialo-GM1-specific antibody treatment	Lacks NK cells, monocytes and macrophages	↑ MCA-induced sarcomas
NK1.1-specific antibody treatment	Lacks NK cells and NKT cells	↑ MCA-induced sarcomas
Thy1-specific antibody treatment	Lacks T cells	↑ MCA-induced sarcomas
Immunization with self antigen	Increased regulatory T-cells	↑ MCA-induced sarcomas
Stat1 ^{-/-}	Insensitive to IFN α , IFN β and IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous lymphomas in Stat1 ^{-/-} Tp53 ^{-/-} mice
Ifngr1 ^{-/-}	Insensitive to IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous lymphomas in Ifngr1 ^{-/-} Tp53 ^{-/-} mice
Ifnar1 ^{-/-}	Insensitive to IFN α and IFN β	↑ MCA-induced sarcomas
Ifng ^{-/-}	Lacks IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous disseminated lymphomas; ↑ Spontaneous lung adenocarcinomas
Gmcsf ^{-/-} Ifng ^{-/-}	Lacks IFN γ and GM-CSF	↑ Spontaneous lymphomas ↑ Non-lymphoid solid cancers
Pfjp ^{-/-} Ifng ^{-/-}	Lacks IFN γ and perforin	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous disseminated lymphomas
Pfjp ^{-/-} b2m ^{-/-}	Lacks IFN γ and perforin	↑ Spontaneous disseminated lymphomas
Pfjp ^{-/-}	Lacks perforin	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous lymphomas ↑ Spontaneous lymphomas and sarcomas in Pfjp ^{-/-} Tp53 ^{-/-} mice
Trail ^{-/-}	Lacks TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous lymphomas ↑ Spontaneous lymphomas and sarcomas in Trail ^{-/-} Tp53 ^{-/-} mice
TRAIL ^{-/-}	Lacks TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous lymphomas and sarcomas
TRAIL ^{-/-} + exogenous TRAIL	Blockade of TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas
TRAIL ^{-/-} + exogenous TRAIL + exogenous IL-12	Blockade of TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas
TRAIL ^{-/-} + exogenous TRAIL + exogenous IL-12 + exogenous NKT-cell activation	Blockade of TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas
TRAIL ^{-/-} + exogenous TRAIL + exogenous IL-12 + exogenous NKT-cell activation + exogenous TNF	Blockade of TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas
TRAIL ^{-/-} + exogenous TRAIL + exogenous IL-12 + exogenous NKT-cell activation + exogenous TNF + SOCS1 expressed only by T cells and B cells	Blockade of TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas
TRAIL ^{-/-} + exogenous TRAIL + exogenous IL-12 + exogenous NKT-cell activation + exogenous TNF + SOCS1 expressed only by T cells and B cells + IFN γ -specific antibody treatment	Blockade of TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas
Conditionally expressed Socs1 ^{-/-} plus IFN γ -specific antibody treatment	Socs1 expressed only by T cells and B cells; IFN γ depletion	↓ Spontaneous colitis-associated colorectal adenocarcinomas

COPYRIGHT

b2m, β_2 -microglobulin; DMBA, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene; α -GalCer, α -galactosylceramide; GM1, a ganglioside; Gmcsf, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; Ifnar1, type I IFN receptor 1; Ifn, interferon; Ifngr1, IFN γ receptor 1; IL, interleukin; J α 281, joining gene segment J α 281 of TCR α ; Lmp2, low-molecular-mass protein 2; MCA, 3-methylcholanthrene; NK, natural killer; NK1.1, NK-cell-associated antigen 1.1; NKG2D, NK group 2, member D; NKT, natural killer T; Pfjp, perforin; Rag, recombination-activating gene; SCID, severe combined immunodeficient; Socs1, suppressor of cytokine signalling 1; Saz1, signal transducer and activator of transcription 1; Tcr, T-cell receptor; Trif, tumour-necrosis factor 13-acetate; Tp53, tumour-suppressor protein p53; Trail, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Tableau 1.1 : Les souris immunodéficientes présentent une susceptibilité augmentée au développement de tumeurs spontanées ou induites par un carcinogène. Dunn, G., Koebel, M and Schreiber, R. Nature Rev Imm 2006

b) De la théorie de l'immunosurveillance à l'immunoédition des cancers

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle joué par le système immunitaire envers les tumeurs. Il n'a pas toujours été admis que le système immunitaire puisse jouer un rôle dans le développement des cancers, et au cours du XX^e siècle l'opinion des scientifiques était tantôt favorable, tantôt opposée à la théorie de l'immunosurveillance (Dunn et al., 2002; Parish, 2003; Vesely et al., 2011). Paul Ehrlich fut le premier en 1909 à évoquer la possible existence d'une réponse immunitaire contre les cellules tumorales (Ehrlich, 1909). Une cinquantaine d'année plus tard, F. Macfarlane Burnet (Burnet, 1957, 1970) et Lewis Thomas (Thomas, 1959) reprirent cette hypothèse. F.M. Burnet supposait qu'il existait une tolérance immunitaire acquise vis-à-vis du « soi », et il pensait ainsi que le système immunitaire pouvait reconnaître et détruire les cellules tumorales qui exprimaient des antigènes modifiés. Il nomma alors ce phénomène « immunosurveillance » des cancers. L. Thomas, lui, pensait que les organismes à longue durée de vie devaient certainement posséder des systèmes afin de lutter contre le développement des maladies cancéreuses, et il imaginait que ces systèmes pouvaient être semblables à ceux mis en jeu lors d'un rejet d'une greffe de tissu homotypique. La possibilité d'immuniser des animaux contre des tumeurs syngéniques puis la mise en évidence de l'existence d'antigènes tumoraux (Old and Boyse, 1964) argumentaient en faveur de la théorie de l'immunosurveillance.

Cependant, cette théorie sera rapidement abandonnée jusque dans les années 1990 : les premières études utilisant des animaux avec un système immunitaire déficient ne permettront pas de montrer une quelconque action du système immunitaire envers la tumeur (excepté dans le cas des tumeurs induites par des virus). Les premières études ont été faites dans des souris Nude, ne possédant pas de thymus, et ainsi pas de lymphocytes T. Chez ces souris, après administration du carcinogène 3-methylcholanthrène (MCA) aucune différence d'incidence des cancers, ni de modification de la période de latence avant l'apparition des tumeurs ne furent observées (Stutman, 1974, 1979). Or par la suite il a été montré que les populations de lymphocytes $T\gamma\delta$ et de lymphocytes NK, dont l'existence n'était pas connue au moment des études réalisées par O. Stutman, sont présentes dans les souris Nude utilisées dans ces études. De plus, si ces souris possèdent en effet moins de lymphocytes $T\alpha\beta$, elles en possèdent tout de même encore quelques uns.

Dans les années 1990, la disponibilité d'anticorps monoclonaux déplétants et de nouvelles souris immunodéficientes, chez lesquelles des gènes essentiels à la réponse immunitaire ont été invalidés, ont permis de relancer la théorie de l'immunosurveillance. Le **tableau 1.1** représente les différentes souris immunodéficientes utilisées (souris transgéniques ou traitement pas un anticorps déplétant) et leur susceptibilité au développement de tumeurs spontanées ou induites. Les premières études ont consisté à inhiber l'action de l'IFN γ à l'aide d'anticorps neutralisants ou par expression d'un dominant négatif du récepteur à l'IFN γ dans un modèle de fibrosarcome (Meth A) (Dighe et al., 1994). Dans ces conditions, les tumeurs poussent plus efficacement et leur immunogénicité est diminuée. Ceci est cohérent avec le rôle de l'IFN γ connu pour augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales (en augmentant la présentation antigénique par le CMH I) et ainsi favoriser leur destruction par les lymphocytes T. Par la suite des souris génétiquement déficientes pour les gènes codant le récepteur de l'IFN γ ou codant la protéine STAT 1 (impliquée dans la voie de signalisation des récepteurs aux IFN) ont été créées. L'induction de tumeurs par injection de MCA chez ces souris montre une sensibilité 10 fois plus grande de ces souris par rapport aux souris sauvages, avec une période de latence raccourcie (Kaplan et al., 1998). L'incidence de tumeurs spontanées après croisement avec des souris invalidées pour le gène suppresseur de tumeur *p53* (*p53*^{-/-}) est aussi augmentée. Les auteurs montrèrent que les résultats obtenus étaient dus, au moins en partie, à l'absence de réponse des cellules tumorales (et non d'autres cellules de l'hôte) à l'IFN γ . Ces résultats sur l'IFN γ ont été confirmés par d'autres groupes, qui ont de plus recherché le rôle de la perforine, molécule impliquée dans l'activité cytotoxique de certaines cellules immunitaires (LT, NK et NKT). Grâce à l'étude de souris invalidées pour le gène codant la perforine (*Pfp*^{-/-}), les auteurs ont montré l'importance de la cette molécule dans le développement de différents modèles de tumeurs transplantées (fibrosarcome MC57G, lymphomes EL-4 et MBL-2, adénocarcinome DA3, cancer de la prostate RM-1), de tumeurs induites par le carcinogène MCA ou par le virus oncogène MoMSV (Moloney murine sarcoma virus)(Street et al., 2001; van den Broek et al., 1996), mais aussi de tumeurs spontanées (lymphomes principalement et adénocarcinomes pulmonaires) (Street et al., 2002). Enfin, des souris immunodéficientes en LT, LB et NKT, ont pu être obtenues par mutation des gènes *Rag1* ou *Rag2*. Dans ces souris, l'incidence des sarcomes induits par le carcinogène MCA est augmentée et la période de latence est

raccourcie(Shankaran et al., 2001). Ces souris développent aussi plus de tumeurs épithéliales spontanées. Enfin, comme cela avait été observé dans les études précédentes, les tumeurs formées dans ce contexte immunodéficient, après transplantation dans des souris immunocompétentes, sont plus souvent rejetées (40% de rejet dans cette étude) que des tumeurs provenant de souris sauvages transplantées dans ces mêmes hôtes (aucun rejet). Les tumeurs provenant de souris ayant un système immunitaire adaptatif non fonctionnel sont donc plus immunogènes que les tumeurs de souris sauvages. Ainsi, le système immunitaire, inné comme adaptatif, est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales, mais de cette façon, il exerce une pression de sélection telle que les cellules qui survivent possèdent de nouvelles propriétés leur permettant d'échapper à la reconnaissance ou à la destruction par les cellules immunitaires.

Les résultats obtenus par le groupe de Schreiber, R. ont pourtant été remis en cause par Blankenstein, T. et Qin, Z. en 2004 (Qin and Blankenstein, 2004). En effet, les études réalisées par Schreiber, R. *et al* comparaient des souris *Rag2*^{-/-} croisées dans l'animalerie du laboratoire avec des souris sauvages B6 achetées à une compagnie. Ainsi, les animaux servant de contrôles et les animaux immunodéficients étaient élevés dans des conditions environnementales différentes : alimentation, présence ou non de certaines pathogènes, stress, transport. Le groupe de Blankenstein, T. pensait que les animaux comparés avaient un niveau basal d'activation du système immunitaire, et plus particulièrement un niveau de production d'IFN γ , qui n'étaient différents. Les chercheurs de ce groupe, en utilisant des souris sauvages de la même portée que les souris *Rag2*^{-/-} ne reproduisent pas la différence d'induction de carcinogénèse induite par le MCA observée par Shankaran *et al*. Selon eux, l'IFN γ participerait à l'encapsulation du carcinogène MCA injecté en sous-cutané ce qui limiterait ainsi ses effets et causerait la différence de carcinogénèse observée entre les différentes souris (Qin et al., 2002).

Cependant, le groupe de Schreiber, R. répondit que les injections de MCA n'avaient pas été réalisées dans les mêmes conditions : injections intramusculaires et utilisation de doses trop fortes pouvant masquer les éventuelles différences). En 2005, Dunn, G. *et al* (du groupe de R. Schreiber) publie des résultats montrant le rôle des interférons de type I, et de leur action sur les cellules du compartiment hématopoïétique, dans le développement tumoral (Dunn et al., 2005). Dans cette étude, les souris transgéniques utilisées (souris *Rag2*^{-/-}, souris *Ifnar1*^{-/-}) sont comparées aux

souris contrôles correspondantes. Si les auteurs ne remontent pas les résultats des expériences d'induction de la carcinogenèse par injection de MCA dans les souris *Rag2*^{-/-}, ils confirment tout de même que les tumeurs qui se développent dans ces souris sont plus immunogènes et sont rejetées lorsqu'elles sont transplantées dans des souris sauvages. Ils confirment donc leurs résultats concernant le phénomène d'édition des tumeurs par le système immunitaire. Enfin, une étude publiée cette année par le groupe de Tyler, J. montre l'existence de l'immunoédition des tumeurs par le système immunitaire adaptatif dans un modèle génétique d'induction des tumeurs (DuPage et al., 2012). Pour cela, des souris transgéniques exprimant de façon conditionnelle l'oncogène *K-ras*^{G12D} et la délétion du gène suppresseur de tumeur *p53* ont été générées sur un fond sauvage ou *Rag2*^{-/-}. Ces mutations sont induites par un lentivirus codant la recombinaise Cre. De plus, l'immunogénicité de ces tumeurs peut être modifiée par introduction dans ce vecteur viral de séquences codant des antigènes. Les auteurs montrent ainsi que plus de tumeurs sont induites sur fond *Rag2*^{-/-} que sur fond sauvage, qu'elles expriment ou non l'antigène. En revanche, le temps de latence entre l'induction des mutations par le lentivirus et le développement de la tumeur n'est augmenté sur fond *Rag2*^{-/-} que dans le cas des tumeurs exprimant des antigènes. Après induction de ces tumeurs immunogènes, des LT spécifiques des antigènes tumoraux sont retrouvés dans les ganglions drainants et la rate des souris, que celles-ci développent ou rejettent la tumeur. Par des expériences de déplétion des LT CD4⁺ et CD8⁺ avec des anticorps spécifiques, les auteurs confirment l'implication de ces lymphocytes dans le contrôle de la croissance de ces tumeurs. Enfin, les auteurs montrent que les tumeurs qui se développent chez les souris sauvages sont immunoéditées alors que celles qui poussent dans les souris *Rag2*^{-/-} ne le sont pas. Cette immunoédition est due à la perte de l'expression de l'antigène ou à la diminution de l'expression des molécules du CMH I qui le présentent.

Ainsi, suite à l'ensemble de ces travaux, il est admis que le système immunitaire est capable de reconnaître les cellules tumorales et de jouer un rôle dans le contrôle de la croissance de certaines tumeurs. En revanche, il est aussi reconnu que la pression exercée par le système immunitaire conduit les cellules tumorales à acquérir des moyens de lui échapper. Ainsi, dès 2001, le groupe de Schreiber, R. propose de remplacer le terme « immunosurveillance » par le terme « immunoédition » qui reflète mieux les aspects positifs comme négatifs de l'implication du système immunitaire dans

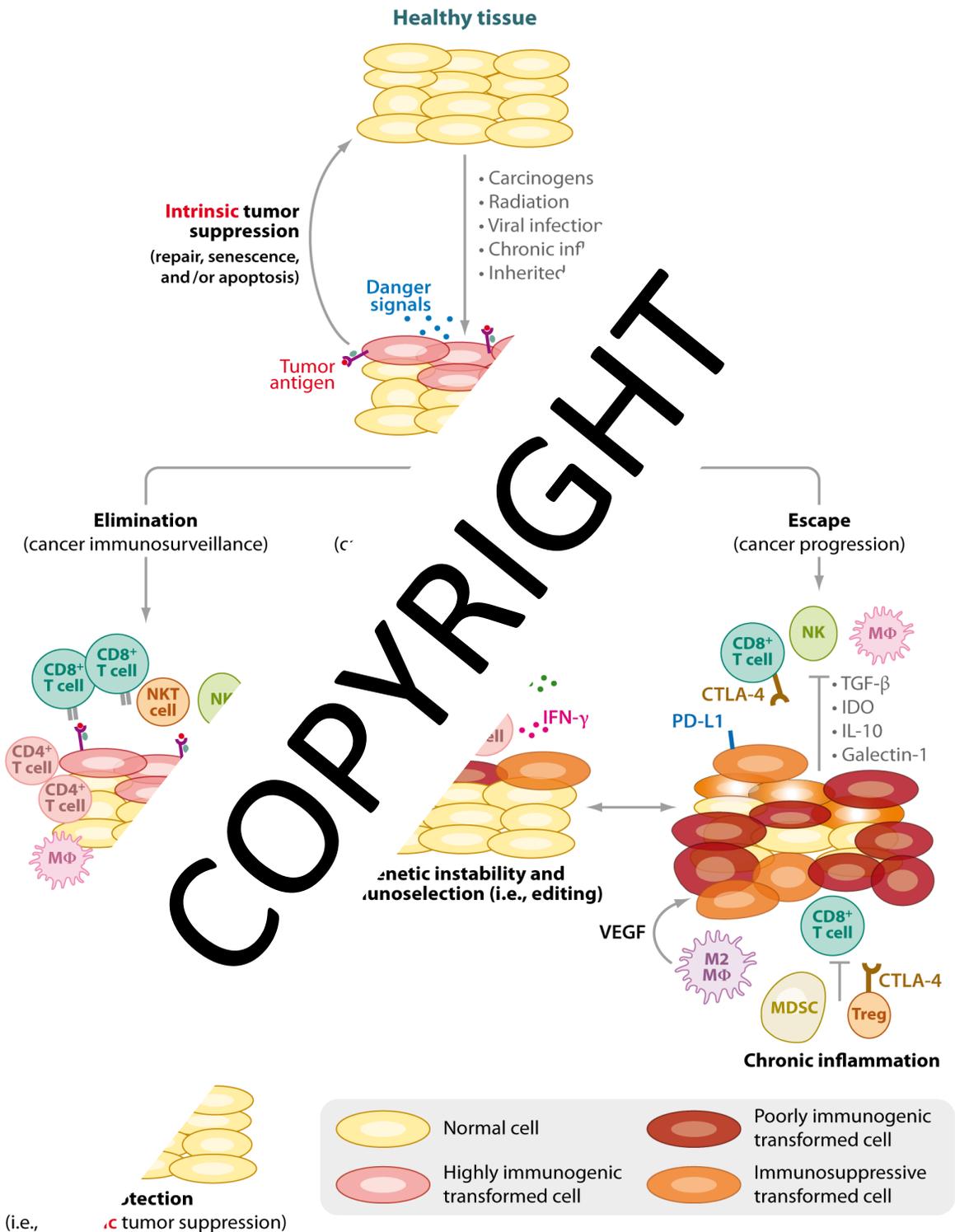


Figure 1.3 : Les trois phases de l'immunoédition.

Après l'apparition de cellules transformées en raison de causes externes et/ou internes à la cellule, le processus d'immunoédition se met en place en commençant par l'étape d'élimination, suivie ou non de l'équilibre et pour finir de l'échappement conduisant à la formation d'une tumeur macroscopique. De nombreux types de cellules immunitaires sont impliqués au cours des deux premières étapes et exercent une pression de sélection favorable à l'acquisition de nouvelles propriétés par les cellules tumorales qui échappent ainsi au contrôle par le système immunitaire.

Vesely, M.D., Kershax, M.H., Schreiber, R.D. and Smyth, M.J. *Ann. Rev. Immunol* 2011

la croissance tumorale (Shankaran et al., 2001). Le processus d'immunoédition des cancers a plus particulièrement été décrit à partir de 2002 comme comprenant trois phases (Dunn et al., 2002) (**figure 1.3**): (1) Elimination : cette phase correspond à l'immunosurveillance telle qu'elle avait été envisagée au moment de sa première définition. Les cellules du système immunitaire adaptatif et inné détectent, reconnaissent et éliminent les cellules tumorales. Dans le cas où l'élimination est totale, le processus d'immunoédition s'arrête. (2) Equilibre : cette phase correspond à un équilibre dynamique entre la prolifération des cellules tumorales et leur destruction par le système immunitaire. Ce dernier contient ainsi la croissance de la tumeur sans pour autant éliminer toutes les cellules cancéreuses. La tumeur ne se développe donc pas, mais persiste et pourra progresser s'il y a une défaillance du système immunitaire, ou si les cellules tumorales acquièrent la capacité d'échapper à la réponse immunitaire. Cet état d'équilibre peut durer des années, on suppose même que les tumeurs peuvent ne jamais se développer, et alors cette étape correspondrait à la fin du processus d'immunoédition. (3) Echappement : au cours de la phase d'équilibre, le système immunitaire exerce sur les cellules tumorales une pression de sélection. Or l'instabilité génétique qui préexiste dans ces cellules et qui est exacerbée par l'environnement inflammatoire favorise l'acquisition de mécanismes de résistance vis-à-vis des actions du système immunitaire. Ces cellules modifiées vont alors proliférer et transmettre cet avantage aux générations suivantes permettant à la tumeur de prendre l'avantage sur la destruction par le système immunitaire.

c) Les trois phases de l'immunoédition

(1) L'élimination

Les populations immunitaires participant à cette première phase, appelée phase d'élimination ou d'immunosurveillance, ont été mises en évidence avec des modèles de souris génétiquement déficients en un composant du système immunitaire ou à l'aide d'anticorps déplétants. En l'absence de certaines populations, une augmentation de l'incidence et de la vitesse d'apparition des tumeurs a été montrée. Ces résultats ont été décrits avec des modèles de tumeurs induites par un carcinogène ou induites génétiquement, ou encore avec des modèles de tumeurs spontanées. Nous avons présenté certaines de ces études dans le paragraphe précédent, mais de nombreux

autres modèles murins ont été générés et étudiés afin d'arriver à la conclusion suivante : à la fois des cellules du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif participent à la phase d'élimination : les lymphocytes $T\alpha\beta$ (souris $Tcr\beta^{-/-}$) (Girardi et al., 2001; Smyth et al., 2000b), les lymphocytes $T\gamma\delta$ (souris $Tcr\delta^{-/-}$) (Girardi et al., 2003; Girardi et al., 2001), les cellules NK (souris perforine $^{-/-}$, ou IL-12 $^{-/-}$ ou déplétion des cellules NK1.1+) (Smyth et al., 2001; Smyth et al., 1998; Smyth et al., 2000a), les cellules NKT (souris $J\alpha 281^{-/-}$) (Smyth et al., 2000a; Swann et al., 2009).

(2) L'équilibre

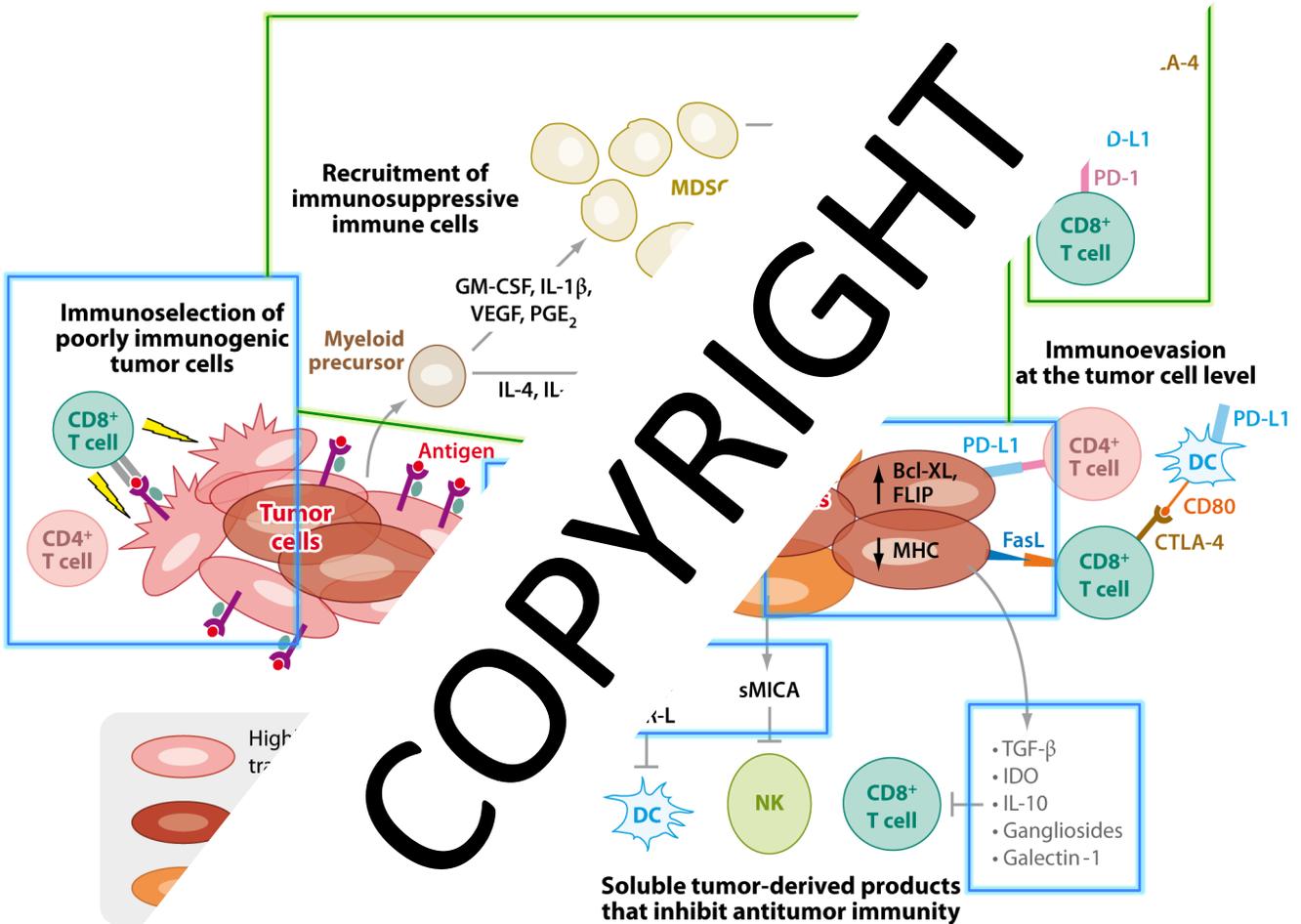
La phase d'équilibre est le résultat d'un équilibre dynamique entre le système immunitaire qui détruit les cellules tumorales et les cellules tumorales elles-mêmes qui prolifèrent et forment une population de plus en plus hétérogène sous la pression immunologique. L'hypothèse de l'existence de cette phase avait été faite dans le but d'expliquer les longs temps de latence entre le moment de l'induction d'une tumeur et le moment où elle se développe. Elle permettait notamment d'expliquer le temps qui s'écoule entre la disparition de la maladie, du point de vue clinique, chez un patient après traitement et la récurrence de cette même maladie, localement ou au niveau d'un foyer métastatique. Cette phase était appelée dormance de tumeurs : les tumeurs restent présentes chez les patients, sous une forme de tumeurs dormantes, puis se développent ou non des années plus tard.

Des expériences d'induction de tumeurs chez la souris avec de faibles doses du carcinogène MCA ont permis de mettre en évidence cette phase d'équilibre (Koebel et al., 2007). A cette dose, très peu de souris développent une tumeur palpable sur une durée de 200 à 230 jours. A ce moment-là, les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ sont déplétés dans un groupe de souris, et les autres restent non traitées. Alors que ces dernières ne développent toujours que très peu de carcinomes (< 10% des souris) après 300 jours, 50% des souris rendues immunodéficientes développent une tumeur progressive au niveau du site d'injection du carcinogène. L'inhibition de molécules effectrices comme l'IFN γ ou l'IL-12 produit le même type de résultat, en revanche, la déplétion des cellules NK fut sans effet. Cette étude permit ainsi de mettre en évidence la phase d'équilibre entre le système immunitaire et la tumeur, et contrairement à la phase d'élimination, seul le système immunitaire adaptatif semble être acteur dans cette étape.

Les tumeurs en dormance qui se développent après déplétion du système immunitaire sont très immunogènes puisque 40% d'entre elles sont rejetées après transplantation dans un hôte sain. Ces tumeurs en équilibre n'ont donc pas encore été « éditées » par le système immunitaire et n'ont pas encore acquis de capacité pour résister à son action. En revanche, les tumeurs qui sortent de l'équilibre chez les hôtes immunocompétents sont très peu immunogènes, elles ont ainsi évolué sous la pression du système immunitaire pour pouvoir lui échapper. D'autres modèles de dormance tumorale existent et ont confirmé le rôle du système immunitaire adaptatif dans cette phase. Dans le modèle de leucémie à cellules B (BCL pour B cell leukemia/lymphoma 1), la dormance peut être induite en immunisant les souris avec des immunoglobulines-BCL (Ig-BCL, dirigé contre le BCR) (Farrar et al., 1999). Sans cette immunisation, les souris meurent des suites de la leucémie en 30 jours. En revanche, après immunisation, il peut s'écouler plus de 100 jours sans aucun signe de progression tumorale, alors que les cellules malignes sont toujours présentes dans la circulation sanguine. Certaines souris pourront éventuellement développer une leucémie, indiquant un échappement des cellules tumorales. Dans ce modèle, la déplétion des LT CD8+ et le blocage de la signalisation par l'IFN γ réduisent le temps de la dormance et augmentent le nombre de souris développant la maladie maligne. Un modèle plus récent de dormance a été créé dans le cas de cancers de la peau causés par des radiations ultraviolets B (UVB) (Loeser et al., 2007). Lorsque cette irradiation est effectuée sur des souris génétiquement modifiées et n'exprimant ainsi pas le gène Cbl-b (qui a pour fonction d'inhiber les LT CD8+), on observe une diminution de la fréquence d'apparition des tumeurs. 400 jours après l'irradiation, de nombreuses souris n'ont toujours pas développé de tumeurs de la peau. La déplétion des LT CD8+ dans un groupe de ces souris induit en quelques jours le développement de carcinomes à croissance progressive chez 50% d'entre elles. En revanche, aucune des souris du groupe recevant un anticorps contrôle non déplétant ne développe de tumeurs.

Ainsi différents modèles ont pu mettre en évidence cette phase d'équilibre chez la souris, qui semble correspondre à ce qui est observé chez l'Homme dans le cas de patients transplantés, chez lesquels un foyer tumoral à priori non progressif chez le donneur et présent dans l'organe transplanté se développe après la greffe. Ces foyers métastatiques sont considérés comme dormants chez le donneur puisqu'ils ne sont pas détectables au moment de la greffe, et en revanche, ils se développent très rapidement

Mécanismes extrinsèques aux cellules tumorales



Mécanismes intrinsèques aux cellules tumorales

Figure 1.4 : Les mécanismes de l'échappement tumoral.

Les cellules tumorales acquièrent des capacités intrinsèques leur permettant d'échapper à la lyse par les LT. Ces mécanismes, encadrés en bleu font intervenir des molécules membranaires ou des molécules solubles : diminution de la présentation antigénique, augmentation de l'expression de facteurs anti-apoptotiques, expression de molécules induisant l'apoptose des LT activés, sécrétion de facteurs solubles permettant d'inhiber la réponse immunitaire.

Les tumeurs peuvent aussi inhiber la réponse immunitaire en recrutant ou en induisant la différenciation de cellules immunosuppressives. Dans ce cas, on parle de mécanisme extrinsèque, encadrés en vert sur le schéma : induction de cellules myéloïdes suppressives (MDSs), induction de macrophages de type M2 (M2M Φ) et induction lymphocytes T régulateurs (Treg).

Vesely, M.D., Kershax, M.H., Schreiber, R.D. and Smyth, M.J. *Ann. Rev. Immunol* 2011

chez le patient receveur qui reçoit un traitement immunosuppresseur suite à l'intervention. Toutefois, des foyers dormants peuvent évoluer vers une phase de croissance progressive aussi chez les personnes immunocompétentes, notamment lors de récurrences. Ces tumeurs qui sont souvent plus agressives, ont acquis des mécanismes leur permettant d'échapper au système immunitaire.

(3) Echappement

Les cellules tumorales, comme nous venons de l'expliquer sont soumises à une pression de sélection exercée par le système immunitaire pendant la phase d'équilibre. Les cellules continuent à proliférer de façon anarchique et à acquérir des mutations génétiques ou des modifications épigénétiques. Ainsi si l'une de ces cellules acquiert un avantage sélectif, elle va s'expandre plus que les autres clones et devenir majoritaire. Les cellules tumorales peuvent ainsi développer plusieurs stratégies, de façon intrinsèque, pour contrecarrer l'action anti-tumorale du système immunitaire (**figure 1.4, encadrés bleus**). Ces stratégies consistent notamment à empêcher leur reconnaissance et leur destruction par les cellules immunitaires (Dunn et al., 2002; Smyth et al., 2006; Zitvogel et al., 2006). Des stratégies dites extrinsèques sont aussi développées par les cellules tumorales : elles peuvent moduler les cellules de leur environnement et notamment les cellules immunitaires à leur avantage. Nous allons ici discuter les stratégies intrinsèques d'échappement des tumeurs, nous discuterons des stratégies extrinsèques dans un paragraphe suivant (« Rôles pro-tumoraux du système immunitaire »).

- La reconnaissance des tumeurs par les cellules immunitaires peut être empêchée de différentes façons. Une façon pour les cellules tumorales d'éviter leur détection par les cellules T est de diminuer la présentation antigénique. Ainsi, dans de nombreux types de cancers épithéliaux et de mélanomes, on observe une diminution ou une perte de l'expression des molécules du CMH I (Khong et al., 2004). Les processus impliqués dans la voie de la présentation antigénique sont aussi touchés : diminution de l'expression de TAP1 (transporter associated with antigen processing), LMP2 (low-molecular-mass protein 2), LMP7, β 2-microglobuline et tapasine qui participent toutes au transport et à la prise en charge des peptides au niveau de réticulum endoplasmique (Atkins et al., 2004). Les interférons de type I et II induisent une augmentation de la présentation antigénique défavorable à la tumeur. Ainsi, des mutations dans les molécules impliquées dans les

voies de signalisation des interférons sont souvent observées, rendant les cellules tumorales insensibles à ces signaux (Dunn et al., 2006).

- Les cellules NK peuvent détecter la diminution d'expression du CMH I et ainsi lyser les cellules tumorales concernées. Mais ces dernières développent des mécanismes pour empêcher leur reconnaissance par les cellules NK (Waldhauer and Steinle, 2008; Zitvogel et al., 2006). La sécrétion de ligands solubles du récepteur NKG2D, mise en évidence dans plusieurs types de cancers chez l'Homme, pourrait participer à l'inhibition de l'activité des cellules NK (Holdenrieder et al., 2006). En effet, ces ligands solubles peuvent induire l'endocytose et donc une diminution de la quantité de récepteurs activateurs NKG2D à la surface des cellules NK et les LT. La sécrétion de TGF β entraîne aussi la diminution de NKG2D sur les cellules NK ainsi que du récepteur activateur NKp30.

- Les cellules tumorales peuvent aussi devenir résistantes à la cytotoxicité par les lymphocytes T et NK. Par exemple l'expression de PI9, un inhibiteur des protéases à sérine bloque l'action de la perforine et du granzyme B (Medema et al., 2001). L'apoptose cellulaire via les récepteurs de mort (Fas, TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand) ne peut plus être induite dans certaines cellules tumorales qui diminuent l'expression de ces récepteurs ou encore expriment une forme mutante défective de ceux-ci (Shin et al., 2001; Takahashi et al., 2006). D'autre part, on peut aussi observer des modulations de l'expression de molécules impliquées dans la voie de signalisation intracellulaire de l'apoptose : perte de la caspase 8 et surexpression de molécules anti-apoptotiques (FLIP, BCL-XL). De plus, les cellules tumorales peuvent acquérir la capacité de déclencher l'apoptose des LT par expression de FasL.

- L'activation des LT est empêchée de différentes façons au sein de la tumeur. Tout d'abord, la présentation de l'antigène et la maturation des cellules dendritiques sont inhibées par de nombreux facteurs de l'environnement tumoral, ne permettant pas l'activation des LT. Il a aussi montré que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) du microenvironnement tumoral modulaient l'activation des LT CD8⁺ en les orientant vers un phénotype de LT CD8 suppresseurs (Wei et al., 2005). De la même façon que pour les cellules NK, la sécrétion sous forme soluble des ligands du récepteur NKG2D, ou la perte de leur expression, diminue l'activation des LT (Groh et al., 2002). Enfin, les LT CD4⁺ CD25⁺ régulateurs (Terabe and Berzofsky, 2004) (producteurs de TGF- β et IL-10) et les cellules myéloïdes immatures suppressives (Gabrilovich and Nagaraj, 2009)

présents au sein de la tumeur induisent l'anergie des LT. Les divers facteurs libérés par les cellules tumorales et les cellules myéloïdes infiltrantes causent une suppression de l'activation des lymphocytes T. Parmi ces facteurs ont été décrit : la galectine-1, l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), l'arginase-1, l'acide nitrique (NO), le TGF- β , l'IL-10. Nous rediscuterons par la suite du rôle des cellules myéloïdes et des facteurs qu'elles secrètent dans le développement de la tumeur, à la fois par l'inhibition de l'activation des lymphocytes T, mais aussi par des modulations du microenvironnement propices à la croissance tumorale.

d) L'immunoédition chez l'Homme

(1) Etude des patients immunodéficients

La démonstration du rôle du système immunitaire dans le développement tumoral chez la souris a amené les chercheurs à regarder si un tel rôle du système immunitaire pouvait aussi être mis en évidence chez l'Homme. La question suivante s'est alors posée : les patients immunodéficients développent-ils plus de cancers que les personnes avec un système immunitaire fonctionnel ? Les patients concernés par ces études sont : (1) des personnes souffrant d'une immunodéficiência en raison d'une maladie génétique (immunodéficiência primaire), (2) des patients infectés par le virus de l'immunodéficiência humaine (HIV) et développant le syndrome d'immunodéficiência acquise (SIDA), (3) des patients suivant des traitements immunosuppresseurs après une greffe d'organe.

Une augmentation de l'incidence des cancers a en effet pu être mise en évidence chez les patients transplantés (Penn, 1996, 1999; Starzl et al., 1970), chez les patients souffrant d'une immunodéficiência primaire (Gatti and Good, 1971) ou causée par le VIH (Boshoff and Weiss, 2002). Cependant ces cancers sont principalement d'origine virale, provoqués par des virus exprimant une protéine oncogénique. Ainsi, une plus forte incidence des lymphomes (causés par le virus d'Epstein-Barr), des sarcomes de Kaposi (causés par le virus de l'herpès humain), et des cancers urogénitaux (causés par les papillomavirus) est observée. Ceci est principalement attribué à la fonction antivirale du système immunitaire.

Ces résultats ne remettent pourtant pas en cause l'existence de l'immunosurveillance chez l'Homme, d'autant que les virus impliqués dans les maladies

malignes précédemment citées sont des virus endémiques infectant la quasi-totalité de la population. Il n'est donc pas surprenant que les patients développent beaucoup plus rapidement des cancers dus à ces virus que les autres types de cancers, l'élément oncogène étant déjà présent dans l'organisme. De plus, l'augmentation de la fréquence de certains cancers pour lesquels aucune origine virale n'est connue a aussi été montrée: c'est le cas des cancers pulmonaires chez les patients atteints du SIDA (Chaturvedi et al., 2007; Kirk et al., 2007), des cancers de la peau (autres que mélanomes) (Moloney et al., 2006) et des mélanomes malins (Penn, 1996) chez les patients transplantés. Dans cette dernière étude concernant les mélanomes malins, trois groupes de patients développant ces cancers ont été définis: (1) récurrence d'un précédent mélanome chez le receveur, (2) développement d'un mélanome à partir de métastases présentes dans l'organe d'un donneur ayant eu un mélanome et (3) l'apparition de mélanomes *de novo*. Cette étude montre d'une part que l'incidence des mélanomes *de novo* augmente chez les patients immunodéprimés, et d'autre part, elle met en évidence qu'une métastase dont la croissance est contrôlée chez un patient immunocompétent (le donneur) va rapidement se développer en un cancer chez le patient receveur sous traitement immunosuppresseur. Ces résultats soutiennent l'existence de la phase d'élimination et de la phase d'équilibre chez l'Homme. Enfin, il a été montré dans une autre étude que les patients transplantés développent des cancers plus agressifs et ont un moins bon pronostic de survie dans le cas des mélanomes, des cancers du sein, du rein, du colon, de la prostate, de la vessie, du poumon (Miao et al., 2009). Ceci s'explique probablement par la réponse immunitaire adaptative qui participe au ralentissement de la progression tumorale chez les patients immunocompétents.

(2) Des indices d'une réponse immunitaire tumorale

L'existence d'antigènes associés aux tumeurs (AAT) et reconnus par le système immunitaire a été mise en évidence chez les patients. Ces antigènes sont très souvent issus de protéines exprimées dans les tissus sains qui subissent des modifications dans les cellules tumorales, comme par exemple : (1) l'apparition d'un nouvel épitope suite à une mutation génétique, ou à une différence de modification post-traductionnelle, (2) la surexpression par les cellules cancéreuses d'une protéine peu exprimée sur les tissus

sains, (3) l'expression de protéines présentes dans des sites immunologiquement privilégiés.

Les premiers anticorps reconnaissant les AAT ont été découverts dans les années 1970 (Carey et al., 1976; Ueda et al., 1979) et depuis, ces anticorps anti-AAT ont été fréquemment mis en évidence dans le sérum des patients (Reuschenbach et al., 2009). Ils peuvent reconnaître des protéines membranaires comme le récepteur à l'EGF muté Her2/Neu, ou bien des protéines intracellulaires comme des mutants de la protéine p53.

Une réponse immunitaire cellulaire existe aussi dans les tumeurs puisque l'infiltration de lymphocytes T CD4+ et CD8+ est mise en évidence dans de nombreux types de cancer (Ferradini et al., 1992; Mackensen et al., 1993). Des études faites chez des patients présentant des mélanomes en régression spontanée ont montré que le répertoire de LT infiltrant les tumeurs n'est pas le même que celui présent dans le sang périphérique (Ferradini et al., 1992). Ceci est expliqué par l'activation et l'expansion clonale, au sein de la tumeur, des lymphocytes T reconnaissant spécifiquement les antigènes tumoraux (Zorn and Hercend, 1999a, b). Ces clones qui sont présents dans les zones en régression de la tumeur, présentent *in vitro* une activité cytotoxique spécifique envers les cellules tumorales du patient dont ils proviennent (Mackensen et al., 1993). Une réponse T spécifique des antigènes tumoraux peut donc se développer chez les patients atteints d'un cancer et avoir un effet bénéfique. Certains cancers sont même connus pour être particulièrement immunogéniques : ceux dont les cellules expriment les antigènes oncotesticulaires (« cancer testis antigens »), normalement exprimés dans les gamètes mâles. Certains mélanomes, mais aussi certains cancers du poumon, de la vessie, du sein et de la prostate sont concernés. Chez ces patients, on peut mettre en évidence une réponse immunitaire anti-tumorale faisant intervenir des lymphocytes T CD4+, CD8+ et les lymphocytes B (Gnjatic et al., 2003; Jager et al., 2000). Dans de nombreux cas, cette réponse est dirigée contre l'antigène NY-ESO-1.

Ainsi, l'infiltration de la masse tumorale par des lymphocytes T CD4+ ou CD8+, des cellules NK ou encore des cellules NKT est un marqueur de bon pronostic dans de nombreux cancers, comme dans le cas des mélanomes (Clark et al., 1989; Clemente et al., 1996; van Houdt et al., 2008), des cancers ovariens (Sato et al., 2005; Zhang et al., 2003), du poumon et du colon (Galon et al., 2006; Naito et al., 1998; Pages et al., 2005). Pourtant, cette réponse immunitaire anti-tumorale n'est souvent pas suffisante pour induire la régression du cancer. Elle va même induire, de par la pression qu'elle exerce

sur les cellules tumorales en prolifération, la sélection de cellules possédant des mécanismes les rendant moins sensibles à l'action du système immunitaire, ou qui sauront la moduler à leur avantage. Nous avons précédemment abordé les mécanismes intrinsèques aux cellules cancéreuses et nous allons désormais décrire les mécanismes extrinsèques. Ceux-ci font intervenir d'autres acteurs du système immunitaires, qui, influencés par l'environnement tumoral, développent des fonctions favorisant la croissance tumorale.

e) Rôles pro-tumoraux du système immunitaire

Nous allons voir dans ce paragraphe que les cellules tumorales modifient les cellules du système immunitaire, principalement celles de l'immunité innée, afin qu'elles participent au développement tumoral. L'action pro-tumorale peut être : (1) l'inhibition de la réponse immunitaire adaptative (2) l'aide au développement de certaines des six capacités tumorales décrites par Hanahan *et al* et discutées au début de ce chapitre, et notamment parmi elles : la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la dissémination métastatique. Nous allons discuter des quatre principales populations exerçant ces fonctions pro-tumorales : les lymphocytes T régulateurs (Treg), les macrophages, les neutrophiles et les cellules suppressives d'origine myéloïdes (MDSCs pour myeloïd-derived suppressor cells) (**figure 1.4, encadrés verts p.23**).

(1) Les lymphocytes T régulateurs

Bien que leur existence ait été décrite au début des années 1970 par Gershon *et al*, la caractérisation des lymphocytes T régulateurs (Treg) n'a été faite qu'en 1995 par Shimon Sakaguchi *et al* (Sakaguchi et al., 1995). Les Treg sont des lymphocytes T CD4+ caractérisés par l'expression de CD25 et du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3). On distingue les Treg naturels (nTreg) qui apparaissent au cours de la sélection thymique et les Treg induits (iTreg) qui se développent en périphérie à partir de LT CD4+ naïfs dans certaines conditions environnementales. Les nTreg participent au maintien de la tolérance au soi par inhibition des LT CD4+, des LT CD8+ mais aussi de la réponse humorale évitant ainsi le développement de réactions auto-immunes. Les iTreg semblent eux participer à la régulation des réponses immunitaires qui se mettent en place contre des pathogènes et dans les tumeurs. Les mécanismes d'inhibition de la

COPYRIGHT

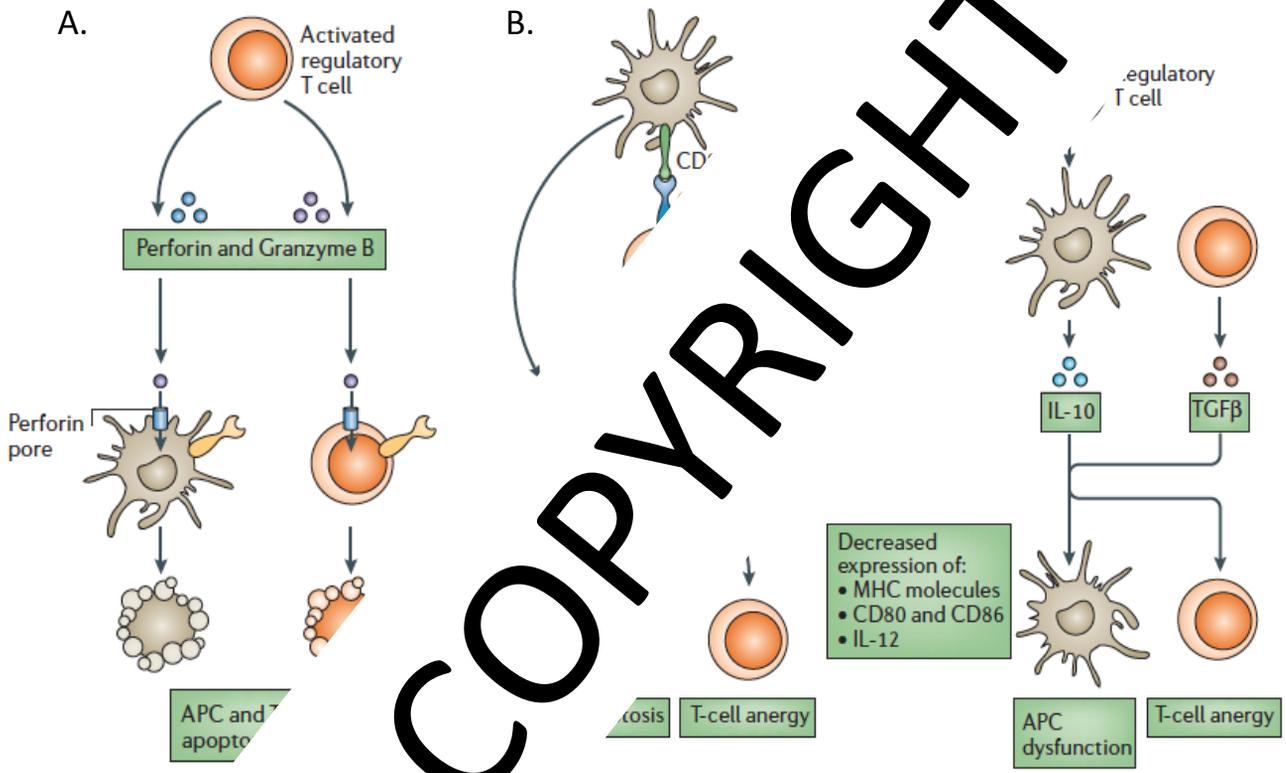


Figure 1.5 : Les mécanismes immunosuppresseurs des lymphocytes T régulateurs (Treg).

Les Treg peuvent inhiber la réponse immunitaires de différentes façons.

A. La sécrétion de perforine/granzyme par les Treg induit la lyse des DCs et des lymphocytes T.

B. L'interaction entre les Treg, exprimant la molécule CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) et les cellules dendritiques exprimant les molécules de costimulation CD80 et CD86) induit la production d'IDO par la DCs. Cette enzyme déplete le milieu en tryptophane, ce qui entraîne l'apoptose ou l'anergie des LT effecteurs.

C. Les Treg produisent du TGFβ et de l'IL-10 qui inhibent la capacité des DCs présenter l'antigène et à exprimer les molécules de costimulation nécessaires à l'activation des LT. Ces cytokines agissent aussi directement sur les LT pour induire leur anergie.

Zou, W. *Nat Rev Imm* 2006

réponse immunitaire par les Treg peuvent nécessiter une interaction physique avec la cellule ou peuvent faire intervenir des facteurs solubles (**figure 1.5**) (Zou, 2006).

Les molécules impliquées dans les effets immunosuppresseurs via une interaction physique sont: (1) LAG3, qui interagit avec le CMH II des cellules présentatrices de l'antigène (APCs), inhibant la présentation antigénique et l'expression de molécules de costimulation. (2) CTLA-4 qui se lie à CD80 et CD86 (molécules de costimulation) sur les APCs induisant ainsi l'activation de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). L'IDO induit la déplétion du milieu environnant en tryptophane (qui est le substrat de cette enzyme) et produit des métabolites immunosuppresseurs. (3) Une forme du TGF β associée à la membrane plasmique des Treg participe à l'inhibition de l'activité des LT et NK par interaction physique avec ces cellules. (4) La galectine-1 est une molécule exprimée sur les Treg qui induit l'arrêt de la prolifération des LT activés et peut induire leur apoptose. Il n'est cependant pas clair si la galectine agit après sécrétion ou via un contact physique entre le Treg et le LT activé.

Les voies d'action via des facteurs solubles font intervenir: (1) la sécrétion de perforine et de granzyme qui induisent *in vitro* la lyse des LT CD8⁺ et des cellules NK, mais aussi des LB, monocytes et DCs (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004), il n'est cependant pas connu si cette voie est fonctionnelle dans les tumeurs, (2) la sécrétion de TGF β et d'IL-10, (3) la production de la prostaglandine PGE₂ (4) l'épuisement du milieu en IL-2: les Treg surexpriment le récepteur de haute affinité à l'IL-2 mais ils n'en produisent pas, ils entrent donc en compétition avec les LT activés qui ont besoin de cette interleukine pour proliférer et exercer leurs fonctions.

Les tumeurs peuvent induire la formation de iTreg localement par la production de TGF β , d'IL-10, de galectine-1, et d'IDO. Ces facteurs, qui se trouvent être les mêmes que ceux produits par les Treg, peuvent être sécrétés par de nombreuses cellules présentes dans le microenvironnement tumoral, à commencer par les cellules tumorales elles-mêmes. L'inhibition locale de la maturation des APCs participe aussi à l'induction de Treg. La mise en évidence du rôle des Treg dans la croissance tumorale a été faite par déplétion de ces cellules avec des anticorps anti-CD25 chez la souris. Dans une de ces études, il est montré que la déplétion des Treg quatre jours après l'injection des cellules tumorales entraîne la régression de six différents modèles tumoraux sur les huit testés (Onizuka et al., 1999). Ce rejet est dû selon les cas aux LT CD8⁺ seuls ou aux LT CD8⁺ et CD4⁺. Un autre groupe s'est intéressé à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-

tumorale en l'absence de Treg dans un modèle de leucémie transplantée (Shimizu et al., 1999). L'injection des cellules leucémiques dans des souris Nude (sans lymphocytes T) induit la mort des souris en 40 jours suite à la croissance progressive des tumeurs. Si des splénocytes provenant de souris Balb/c et déplétés en cellules CD4⁺ CD25⁺ sont injectés dans les souris Nude le même jour que les cellules tumorales, alors la tumeur est rapidement rejetée. Si les cellules tumorales sont de nouveau injectées à ces mêmes souris plus tardivement, un rejet encore plus rapide a lieu, indiquant qu'une réponse immunitaire s'était bien développée lors de la première inoculation. Comme dans l'étude précédente, la déplétion des Treg avec des anticorps anti-CD25 entraîne le rejet de la lignée leucémique et un fort ralentissement de la croissance d'un modèle de mélanome. Le rôle des Treg dans la croissance tumorale a depuis été confirmé dans de nombreux modèles de tumeurs murines et chez l'Homme. En 2001, Woo, E. *et al* décrivent pour la première fois une forte infiltration de Treg CD4⁺ CD25^{high} dans les tumeurs de patients atteints d'un cancer de l'ovaire ou d'un cancer du poumon non à petites cellules (Woo et al., 2001). Dans le cas des patientes avec un cancer de l'ovaire, l'augmentation de la proportion des Treg était aussi visible dans la circulation sanguine. Ceci a par la suite été observé dans de nombreux autres types de cancers (sein, colon, pancréas, cancer gastrique, carcinome hépatocellulaire, mélanome, lymphome, leucémie)(Zou, 2006). De plus dans le cas de patientes atteintes d'un cancer ovarien, les Treg isolés à partir des tumeurs, des ascites ou du sang sont capables d'inhiber l'activation des LT et notamment des LT spécifiques des antigènes tumoraux (Curiel et al., 2004). Les lymphocytes T régulateurs sont donc des acteurs immunologiques qui jouent un rôle pro-tumoral majeur principalement en inhibant la réponse T spécifique anti-tumorale.

(2) Les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires qui se différencient dans les tissus à partir des monocytes. Ils sont localisés dans divers organes : macrophages alvéolaires dans les poumons, ostéoclastes dans les os, microglie dans le cerveau, histiocytes dans les tissus interstitiels, cellules de Kupffer dans le foie et macrophages intestinaux dans les intestins. Ce sont des cellules phagocytaires, capables d'ingérer un pathogène, de le dégrader complètement et de présenter les antigènes qui en dérivent

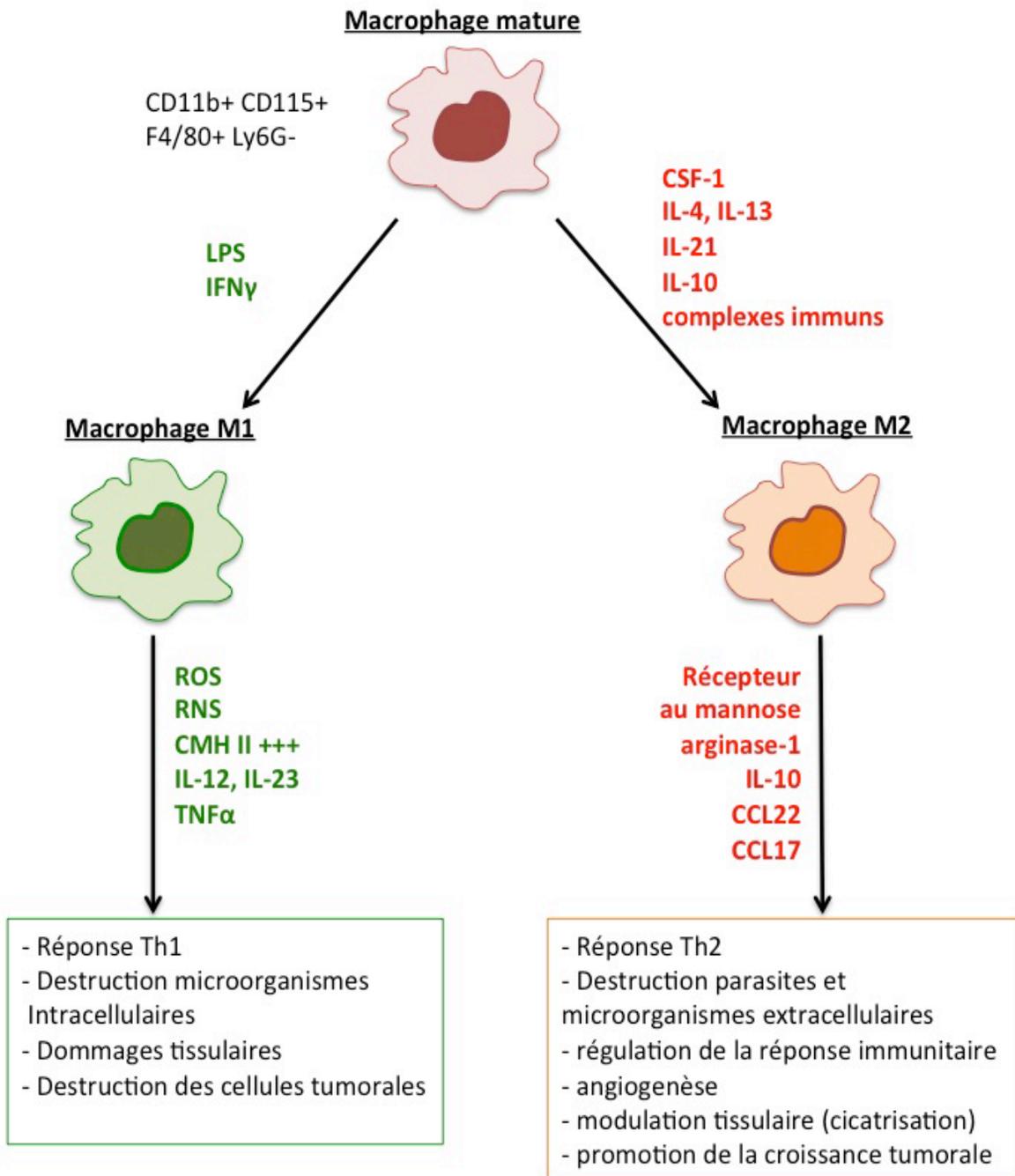


Figure 1.6 : Les deux principaux états d'activation des macrophages : M1 ou M2.

Les macrophages sont classiquement activés par la présence de déterminants microbiens (LPS par exemple) et par l'IFN γ . Ces macrophages sont de type M1, ils orientent la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 et produisent des ROS (reactive oxygen species) et RNS (Reactive nitrogen species) dans le but de détruire les microorganismes. La réaction allergique ou la présence d'un parasite ou pathogène extracellulaire vont à l'inverse induire une activation alternative des macrophages, principalement via la production d'IL-4 et IL-13. Ces macrophages M2 favorisent la mise en place d'une réponse immunitaire Th2 et le remodelage tissulaire (cicatrisation). Ce sont ces macrophages qui sont majoritairement présents dans les tumeurs au sein desquelles ils favorisent la croissance tumorale. LPS : lipopolysaccharide ; ROS : reactive oxygen species ; RNS : reactive Nitrogen species ; CSF-A : Colony stimulating factor 1

Adapté de : Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A. 2008, *Immunological Reviews*

via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II aux LT CD4+, afin d'induire une réponse immunitaire spécifique. En fonction des signaux qu'ils reçoivent dans l'environnement où ils se trouvent, les macrophages peuvent enclencher différents programmes d'activation. Il existe ainsi plusieurs phénotypes de macrophages activés, classiquement répartis en deux principales catégories (**figure 1.6**) : les macrophages de type M1 correspondant à une activation « classique » et les macrophages de type M2 correspondant à une activation « alternative » (Allavena et al., 2008; Gordon, 2003).

Classiquement, les macrophages sont activés soit par des déterminants microbiens (PAMPs pour pathogen associated molecular pattern) reconnus par les récepteurs toll-like (TLRs), soit par l'IFN γ sécrété par les LT dans les réponses de type T helper 1 (Th1). Les macrophages de type M1 augmentent leur niveau d'expression du CMH II et secrètent l'interleukine-12 et le TNF α (facteur de nécrose des tumeurs ou tumor necrosis factor), ce qui favorise la réponse immunitaire Th1 et l'élimination des pathogènes intracellulaires. Les macrophages M1 synthétisent aussi des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) et de l'oxyde nitrique (NO pour nitric oxide), leur permettant de dégrader les pathogènes qu'ils ont phagocytés.

Dans le cadre d'une réponse allergique, d'une réaction contre un parasite ou contre un pathogène extracellulaire, il y a production des interleukines IL-4 et IL-13 qui induisent une activation dite alternative ou de type M2 des macrophages. Le CSF-1, L'IL-21, l'IL-10 et les complexes immuns sont des signaux qui peuvent eux aussi induire une activation alternative des macrophages. Ces macrophages de type M2 expriment le récepteur au mannose qui permet l'internalisation des pathogènes, synthétisent l'arginase-1, et secrètent des chimiokines comme CCL22 et CCL17, molécules d'attraction des granulocytes. Ils favorisent une réponse immunitaire T de type Th2 et vont induire des modifications tissulaires afin de permettre la cicatrisation en cas de blessure (angiogenèse notamment).

Les macrophages représentent souvent la population majoritaire parmi les cellules de l'immunité innée infiltrant les tumeurs. Ils sont ainsi présents dans de nombreux types de cancers et en fonction de leur état d'activation, ils peuvent avoir un effet anti-tumoral (M1) ou pro-tumoral (M2) (Qian and Pollard, 2010). Ces cellules sont très plastiques et il est probable qu'au cours du développement de la tumeur, les variations de l'environnement dues à la progression tumorale (inflammation, sécrétions de médiateurs solubles, hypoxie, pH) modifient le phénotype et les fonctions des

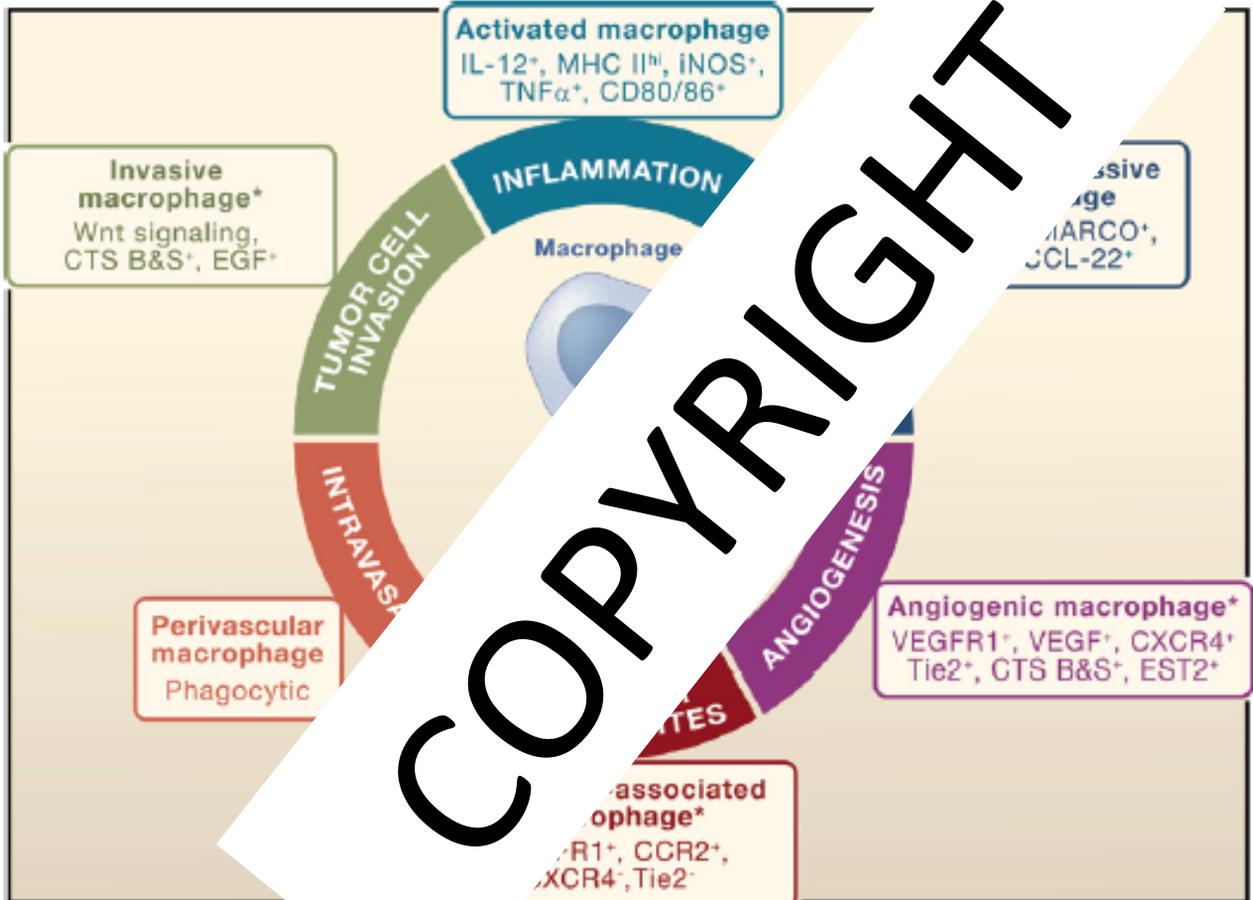


Figure 1.7 : Les différents phénotypes de macrophages M2 et leurs rôles dans le développement tumoral.

Les macrophages de type M2 peuvent exercer six fonctions pro-tumorales différentes qui correspondent chacune à une sous-population unique de macrophages M2. On peut cependant remarquer que la population dénommée « périvasculaire » est probablement la même que celle dénommée « invasive » : ces cellules présentent les mêmes caractéristiques mais se distinguent par leur localisation dans le microenvironnement tumoral.

Qian, B-Z., Pollard, J.W. Cell Review 2010

macrophages infiltrés. De nombreux sous-types de macrophages M2 ont d'ailleurs été décrits au sein des tumeurs (**figure 1.7**) : macrophages activés par l'inflammation, macrophages immunosuppresseurs, macrophages angiogéniques, macrophages associés aux métastases, macrophages périvasculaires et macrophages invasifs. La majorité des études montrent que les macrophages sont le plus souvent des acteurs favorisant la croissance tumorale et le développement des métastases plutôt que des cellules jouant un rôle anti-tumoral. En effet, dans de nombreux types de cancers, l'infiltration par les macrophages est un facteur de mauvais pronostic : cancers du poumons (Chen et al., 2005), cancers hépatocellulaires (Zhu et al., 2008), cancers du sein (Zabuawala et al., 2010). Il existe cependant des exceptions comme les cancers du poumons non à petites cellules où l'infiltration des macrophages corrèle avec un meilleur taux de survie (Kim et al., 2008). D'autre part, l'expression par les cellules tumorales de cytokines impliquées dans le recrutement, la différenciation et/ou l'activation des macrophages corrèle avec un mauvais pronostic de survie : c'est le cas de CSF-1 et de CCL2 dans le cancer du sein (Lin et al., 2001; Saji et al., 2001) et du colon (Bailey et al., 2007; Mroczko et al., 2007).

Ce rôle pro-tumoral des macrophages est confirmé par les études chez la souris. Le laboratoire de Jeffrey Pollard a utilisé un modèle de souris transgéniques ayant une susceptibilité augmentée à développer des tumeurs mammaires : les souris PyMT exprimant l'antigène moyen T du polyomavirus spécifiquement dans l'épithélium mammaire (Lin et al., 2001). Ce modèle permet l'étude du développement de la tumeur mammaire, depuis l'adénome non malin jusqu'à l'adénocarcinome métastatique. Afin d'étudier le rôle des macrophages dans la progression de ces tumeurs, le gène codant CSF-1 a été invalidé dans ces souris ($Csf1^{op}/Csf1^{op}$). Les souris $Csf1^{op}/Csf1^{op}$ développent autant de tumeurs que les souris $+/Csf1^{op}$ (capables de produire du CSF-1) et la vitesse de croissance n'est pas modifiée. Cependant, le passage de ces tumeurs du stade d'adénome au stade d'adénocarcinome malin est plus rapide chez les souris exprimant CSF-1 : à neuf semaines d'âge, 50% des $+/Csf1^{op}$ présentent des tumeurs malignes contre seulement 13% des souris $Csf1^{op}/Csf1^{op}$. La présence de CSF-1 induit ainsi le développement de tumeurs plus agressives et aussi plus métastatiques. Ceci est corrélé à un plus fort recrutement des macrophages au sein de la tumeur, juste avant la transition vers le stade de carcinome malin. Les macrophages semblent donc participer à cette progression. De nombreux autres travaux ont confirmé ce rôle des macrophages, en les déplaçant à l'aide de chlodronate encapsulé dans des liposomes. Cette déplétion

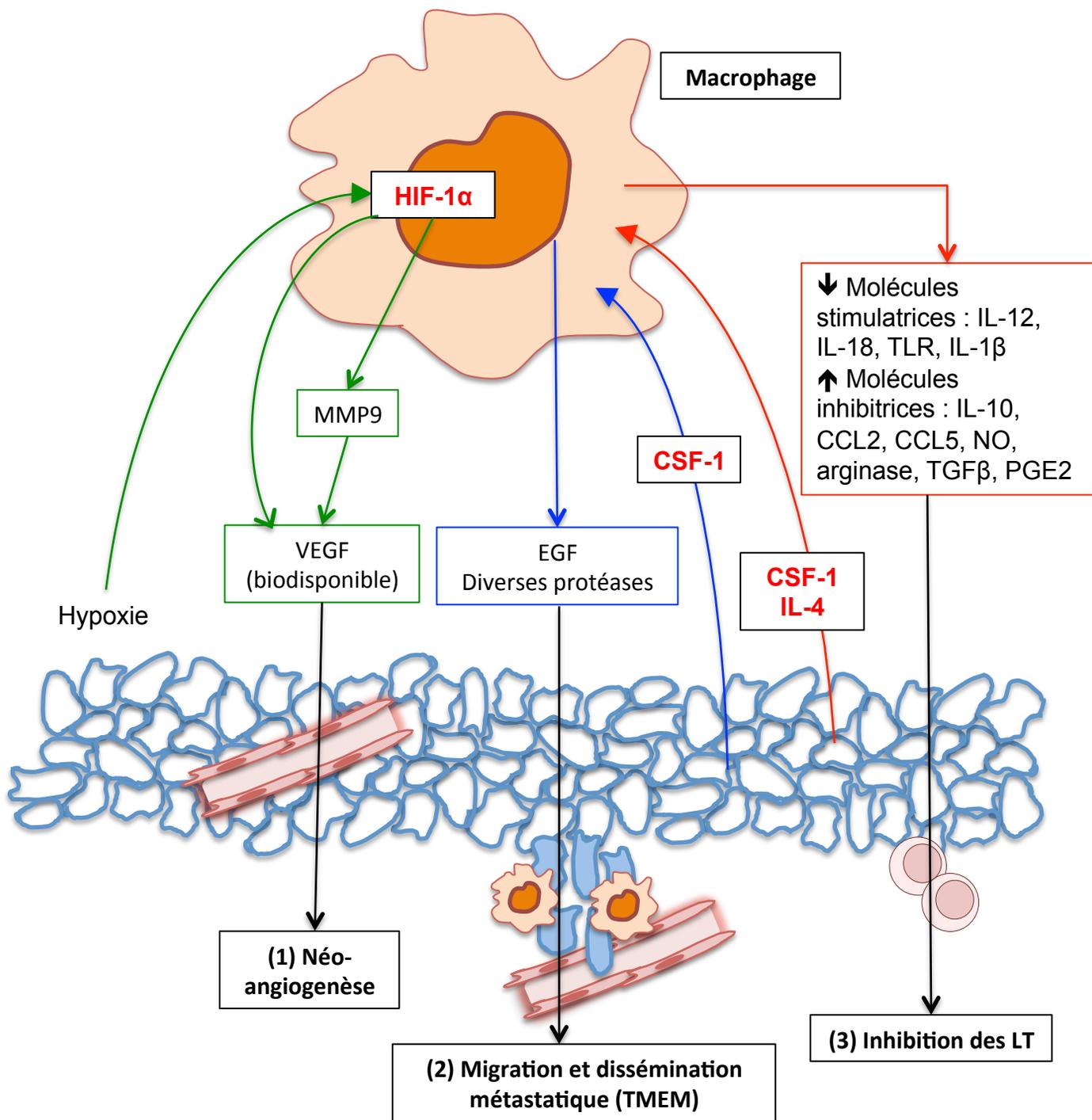


Figure 1.8 : Principaux rôles pro-tumoraux des macrophages.

Les trois principaux mécanismes par lesquels les macrophages favorisent la croissance tumorale sont : (1) La promotion de l'angiogénèse : l'hypoxie intratumorale favorise la production de VEGF par les macrophages. Ils peuvent aussi produire la métalloprotéase MMP9 qui permet d'augmenter la quantité de VEGF biodisponible. (2) L'induction de la capacité migratoire des cellules tumorales : sous l'effet du CSF-1 libéré par la tumeur, les macrophages produisent de l'EGF. Ils libèrent aussi des protéases de dégradation de la matrice extracellulaire. Enfin, les macrophages aident physiquement la migration des cellules tumorales en participant à la formation de TMEM (microenvironnement tumoral des métastases). (3) La présence de CSF-1 et d'IL-4 libérés par les tumeurs entraîne la diminution de l'expression de molécules immunostimulatrices et l'augmentation de l'expression de molécules inhibitrices, conduisant à une inhibition de l'activation des LT.

induit une diminution de la croissance tumorale dans différents modèles de tumeurs transplantées, comme les mélanomes (Gazzaniga et al., 2007), les cancers de la prostate (Halin et al., 2009).

L'action pro-tumorale des macrophages est généralement due à (1) l'induction de l'angiogenèse, (2) la promotion de l'invasion tissulaire et leur participation à la progression métastatique, (3) la création d'un environnement immunosuppresseur (**Figure 1.8**).

- Dans le modèle précédemment décrit des souris PyMT Csf1^{op}/Csf1^{op} ou +/Csf1^{op}, il a été mis en évidence que les macrophages participent à la néoangiogenèse au sein de la tumeur (Lin et al., 2006). Dans un premier temps, il a été observé que le réseau vasculaire ne se développait pas ou très peu dans les tumeurs des souris Csf1^{op}/Csf1^{op}, tumeurs dans lesquelles peu de macrophages sont recrutés. D'autre part, si l'expression de CSF-1 est induite dans les souris +/Csf1^{op} au moment du développement de la glande mammaire (donc de façon plus précoce et indépendante de la progression tumorale), un réseau vasculaire dense apparaît dès les premiers stades de la tumeur. Cette augmentation de la vascularisation est corrélée à une augmentation de l'infiltration des macrophages. L'ensemble de ces résultats indiquent un rôle des macrophages dans l'angiogenèse tumorale, rôle confirmé par des expériences de déplétions avec le clodronate encapsulé dans les liposomes (Gazzaniga et al., 2007; Zeisberger et al., 2006). La production de VEGF par les macrophages, aussi bien chez la souris (Lin et al., 2006) que chez l'Homme (Leek et al., 2002), semble être le principal facteur responsable de ce rôle pro-angiogénique. Cette production est augmentée via le facteur de transcription HIF-1 α dans les zones hypoxiques de la tumeur où sont recrutés certains macrophages. Enfin, la sécrétion de la métalloprotéase MMP9 par les macrophages dans le milieu extracellulaire permet la libération du VEGF emprisonné dans la matrice extracellulaire.

- La production de CSF-1 par les cellules tumorales induit la production du facteur de croissance EGF par les macrophages, qui en retour augmente les propriétés migratoires des cellules tumorales (DeNardo et al., 2009; Wyckoff et al., 2004). Cette migration se fait conjointement avec les macrophages, et avec des cellules endothéliales, formant une structure dénommée le microenvironnement tumoral des métastases (TMEM). Dans le cancer du sein humain, en corrélation avec ce qui est décrit chez la souris, CSF-1 est exprimé par les cellules tumorales et l'EGF l'est par les macrophages. De plus,

l'expression du récepteur à l'EGF par les cellules tumorales est un marqueur de mauvais pronostic. Enfin, une étude réalisée sur 60 patientes souffrant d'un cancer du sein (métastatique pour 30 d'entre elles et non métastatique pour les 30 autres) a montré une plus forte densité des TMEM dans les tumeurs des patientes développant des métastases (Robinson et al., 2009). La densité des TMEM au sein de la tumeur primaire pourrait ainsi être considérée comme un nouveau critère pronostique. Enfin, les macrophages sont des cellules produisant des protéases (cathepsines, métalloprotéases, protéases à sérine) qui participent à la dégradation de la matrice extracellulaire. Dans plusieurs modèles de cancer, ces protéases participent à l'invasion des tissus par les cellules tumorales et au développement de métastases.

- D'autre part, les macrophages sont capables d'inhiber la réponse immunitaire adaptative T : on observe une diminution de l'expression des molécules stimulatrices (IL-12, IL-18, TLR, IL-1 β) et une augmentation pour les molécules immunosuppressives (arginase, IL-10, CCL2, CCL5) (Biswas et al., 2006). Des concentrations élevées de CSF-1 ou d'IL-4 dans les tumeurs favorisent cette modulation des macrophages vers un phénotype suppresseur. L'arginase est une des molécules suppressives secrétées par les macrophages. Cette enzyme convertit la L'arginine en L-ornithine, et lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire en forte quantité, elle entraîne la déplétion du milieu en arginine ce qui a pour conséquence d'inhiber la prolifération des LT. Cette inhibition est due à une diminution de l'expression de la chaîne CD3 ζ associée au TCR (Rodriguez et al., 2002), et de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire (cycline D3 et la kinase cycline dépendant 4, Cdk4) (Rodriguez et al., 2007). L'acide nitrique NO, produit par la NO synthase (NOS), peut aussi être libéré en grande quantité par les macrophages et inhiber la réponse T en interférant dans la fonction des facteurs de transcription JAK3 et STAT5 (Bingisser et al., 1998), en induisant l'apoptose des LT et en inhibant l'expression du CMH II par les cellules présentatrices de l'antigène (Harari and Liao, 2004).

(3) Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules qui jouent un rôle primordial dans la défense de l'organisme contre les infections par des micro-organismes et qui participent aussi à la cicatrisation des blessures. Ils se différencient à partir de précurseurs présents dans

la moelle osseuse puis circulent dans le sang. S'ils détectent les signes d'une inflammation, ils sortent des vaisseaux sanguins par extravasation et se rendent dans les tissus concernés. Sur place, les signaux inflammatoires et microbiens les activent, et ils vont pouvoir phagocyter les corps étrangers et les détruire grâce à tout un arsenal de molécules destructrices. Après phagocytose, les particules microbiennes se trouvent dans les phagosomes puis dans les phagolysosomes où sont présentes la NAPDPH oxydase, la superoxyde dismutase (SOD) et la myéloperoxydase (MPO). Ces enzymes produisent des dérivés toxiques de l'oxygène : l'ion superoxide (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux (HOCl) respectivement. Ces ROS participent à la dégradation des membranes et des composants du microorganisme phagocyté. Les autres molécules de destruction sont contenues dans des granules (Amulic et al., 2011) qui peuvent par la suite fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire. Trois types de granules sont présentes dans les neutrophiles : (1) les granules primaires ou azurophiles contenant la myéloperoxydase, des sérines protéases comme l'élastase neutrophile (NE), et des molécules antimicrobiennes comme le lysozyme et les défensines (2) les granules secondaires ou spécifiques qui renferment la lactoferrine et d'autres composés antimicrobiens dont le lysozyme (3) les granules tertiaires qui contiennent des métalloprotéases, enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (MMP : matrix metalloprotease) comme MMP9 (ou gélatinase), MMP8 (ou collagénase neutrophile) et MMP25 (leukolysine). Des vésicules de sécrétion, qui contrairement aux précédentes ne se forment pas à partir du golgi mais par endocytose au niveau de la membrane plasmique, sont aussi considérées comme des granules dans les neutrophiles. Elles contiennent principalement des protéines de la membrane plasmique et serviraient de réservoir pour les molécules impliquées dans la migration des neutrophiles.

Les neutrophiles ont été peu étudiés dans le développement tumoral. Ils sont pourtant recrutés au sein des tumeurs et ils semblent y exercer des effets non négligeables. Le foyer tumoral est un lieu d'inflammation, ainsi différentes chimiokines présentes dans ce microenvironnement vont y attirer les neutrophiles. Ces signaux attractants sont produits par les cellules stromales mais certains, comme l'interleukine 9 peuvent aussi l'être par les cellules tumorales elles-mêmes (Bellocq et al., 1998; Sparmann and Bar-Sagi, 2004). L'influence de cette infiltration des neutrophiles sur la survie des patients atteints d'un cancer a été étudiée, et il a été mis en évidence que leur

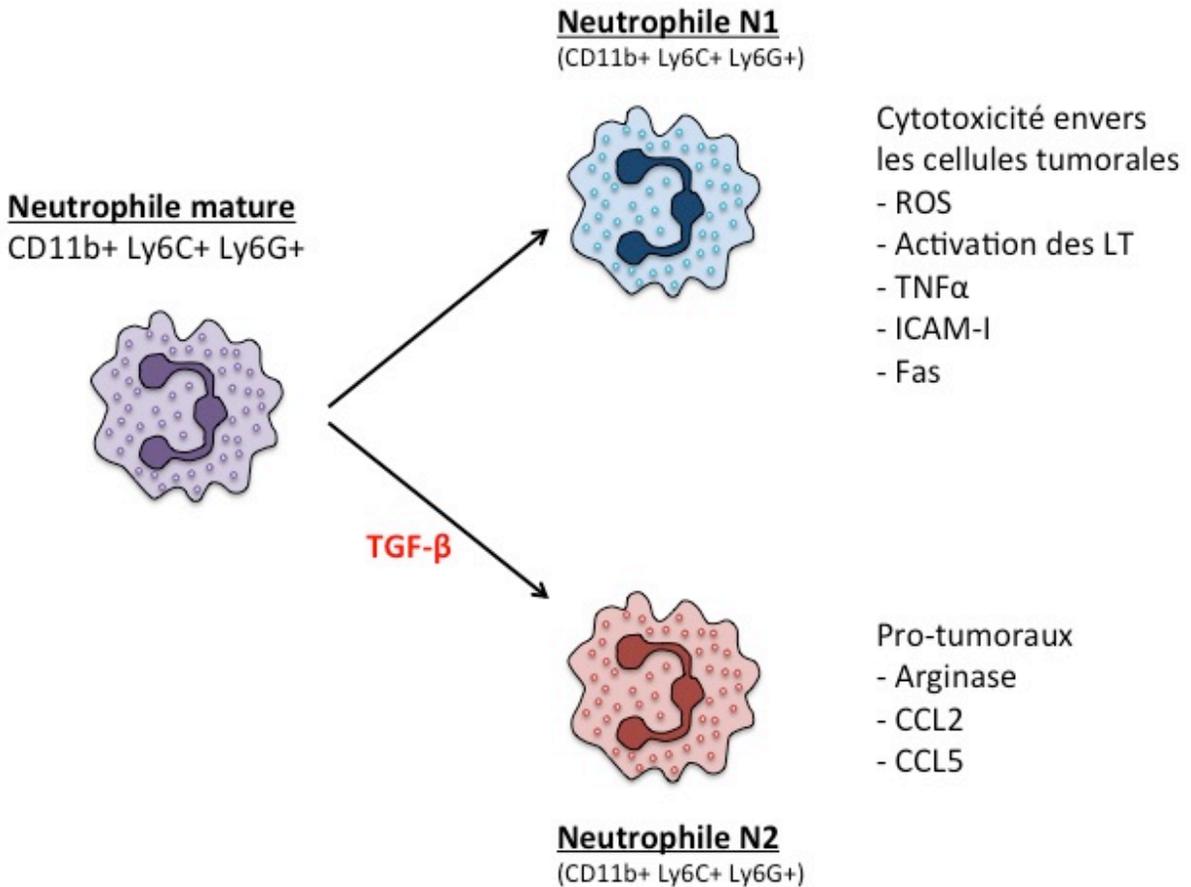


Figure 1.9 : Deux états d'activation des neutrophiles : N1 anti-tumoral et N2 pro-tumoral.

Un neutrophile mature peut être activé de deux façons en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve. La présence de TGFβ dans l'environnement tumoral va favoriser une activation de type N2, favorisant le développement tumoral. Si la voie de signalisation du TGFβ est inhibée, les neutrophiles présentent alors un état d'activation N1 avec des fonctions anti-tumorales.

Adapté de : Fridlender, Z.G. et al, Cell 2009

présence était associée à un mauvais pronostic dans les carcinomes bronchoalvéolaires (Bellocq et al., 1998) et les cancers du rein (Jensen et al., 2009). Les neutrophiles infiltrant les tumeurs joueraient donc un rôle pro-tumoral. Les premières expériences visant à étudier le rôle des neutrophiles dans la croissance tumorale par déplétion de cette population chez la souris ont été effectuées avec des anticorps anti-récepteur de granulocyte 1 (Gr1). La croissance des tumeurs qui se développent dans les souris après déplétion des cellules Gr1+ est ralentie, indiquant là aussi une fonction pro-tumorale des neutrophiles (Pekarek et al., 1995; Sparmann and Bar-Sagi, 2004). Cependant, les anticorps anti-Gr1 reconnaissent deux marqueurs : Ly6G et Ly6C. Si Ly6G est en effet considéré comme un marqueur spécifique des neutrophiles (Daley et al., 2008), Ly6C est exprimé sur d'autres types cellulaires (monocytes, cellules dendritiques inflammatoires notamment), et ces résultats sont donc à prendre avec précaution. Une récente étude dans laquelle les neutrophiles ont été déplétés par injection d'anticorps anti-Ly6G directement dans la tumeur a confirmé un rôle pro-tumoral des neutrophiles (Fridlender et al., 2009) : les tumeurs poussent significativement plus lentement lorsque les neutrophiles sont absents. Mais de façon intéressante, lorsque cette déplétion est effectuée après avoir traité les souris avec SM16, un inhibiteur du récepteur au TGF β de type I, l'effet inverse est observé : les tumeurs poussent plus rapidement. Les neutrophiles infiltrant les tumeurs des souris traitées avec le SM16 sont capables de lyser les cellules tumorales via la production de ROS, et présentent un profil d'ARN messagers immunostimulateur (expression élevée du TNF- α et faible expression de l'arginase). L'inverse est observé pour les neutrophiles présents dans les tumeurs de souris non traitées au SM16. Les auteurs ont ainsi montré que les neutrophiles pouvaient avoir, comme cela a été décrit pour les macrophages, deux états d'activation appelés « N1 » et « N2 » en fonction des signaux qu'ils reçoivent (**figure 1.9**).

Les effets pro-tumoraux exercés par les neutrophiles peuvent être dus à l'induction (1) d'un environnement pro-inflammatoire, (2) de mutations génétiques, (3) de l'angiogenèse, (4) des capacités métastatiques des cellules tumorales, (5) de la prolifération cellulaire ou (6) à une inhibition de l'immunité adaptative T. Les ROS, les cytokines et les diverses enzymes protéolytiques produites et sécrétées par les neutrophiles sont les acteurs moléculaires impliqués dans leur rôle pro-tumoral (**figure 1.10**) (Amulic et al., 2011; Gregory and Houghton, 2011; Mantovani et al., 2011).

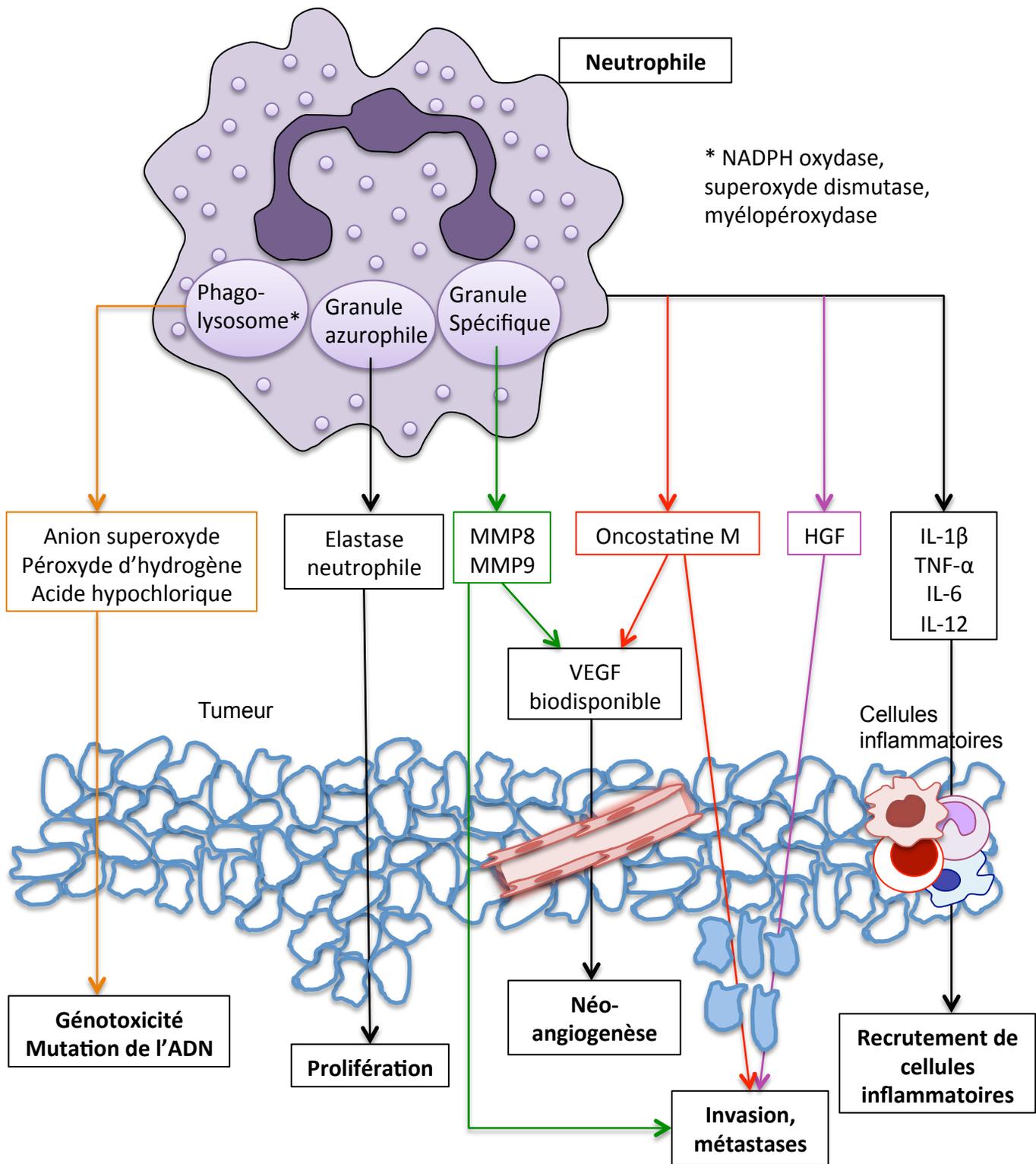


Figure 1.10 : Rôles pro-tumoraux des neutrophiles, indépendants de la réponse immunitaire spécifique.

Les neutrophiles peuvent avoir des fonctions pro-tumorales de différentes façons : recrutement de cellules inflammatoires, invasion et dissémination métastatique, angiogenèse, prolifération, induction de mutations dans l'ADN. Les neutrophiles peuvent aussi inhiber l'activation des LT, ce qui n'est pas représenté sur le schéma.

Adapté de Gregory, A. et McGarry Houghton, A., *Cancer Research*, 2011

- Les neutrophiles peuvent sécréter des molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12, recrutant et modulant la fonction de nouvelles cellules inflammatoires, maintenant ainsi l'état inflammatoire pro-tumoral.
- Les dérivés réactifs de l'oxygène produits par les neutrophiles, de la même façon qu'ils causent des dommages aux microorganismes, vont induire des dommages dans les cellules tumorales. Il a été montré que cela pouvait conduire à la lyse des cellules tumorales (Dallegrì et al., 1991), ou au contraire à une instabilité génétique favorisant la progression tumorale. Les ROS induisent en effet des mutations dans l'ADN (Gungor et al., 2010; Knaapen et al., 2006), augmentant l'hétérogénéité de la population de cellules tumorales et permettant l'apparition de nouvelles mutations dont certaines peuvent apporter un avantage sélectif.
- Tout comme nous l'avons vu précédemment pour les macrophages, les neutrophiles secrètent la métalloprotéase MMP9 qui augmente la biodisponibilité du VEGF piégé dans la MEC, induisant ainsi l'angiogenèse tumorale (Nozawa et al., 2006).
- Les neutrophiles peuvent favoriser la migration des cellules de mélanome et leur intravasation dans les vaisseaux sanguins en adhérant à l'épithélium vasculaire, servant de point d'ancrage aux cellules cancéreuses. Une surexpression de l'intégrine β 2 est induite sur les neutrophiles via l'IL-8 sécrétée par les cellules tumorales. Celles-ci peuvent alors interagir avec les neutrophiles grâce aux molécules d'ICAM-1 exprimées à leur surface. Dans le cas du carcinome hépatocellulaire, il a été montré que les cellules tumorales induisent la sécrétion du facteur de croissance HGF (facteur de croissance des hépatocytes ou hepatocyte growth factor) par les neutrophiles, ce qui a pour conséquence d'augmenter la capacité migratoire des cellules tumorales (Imai et al., 2005). Dans le cancer du sein, les cellules tumorales, par la production de GM-CSF, induisent la sécrétion de l'oncostatine M par les neutrophiles. Cette molécule agit en retour sur les cellules malignes en augmentant leur sécrétion de VEGF et leur pouvoir invasif (Queen et al., 2005). Les diverses protéases libérées par les neutrophiles participent à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) favorisant la migration des cellules tumorales.
- L'élastase participe quant à elle à la prolifération des cellules tumorales dans le cas du cancer du poumon (Houghton et al., 2010). Après sa libération, elle peut être internalisée par les cellules cancéreuses, atteindre des compartiments endosomaux spécifiques dans lesquels elle dégrade la molécule IRS-1 (substrat du récepteur à

l'insuline 1). IRS-1 est un inhibiteur de la voie de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) : il bloque l'interaction de cette kinase avec certains récepteurs aux facteurs de croissance, et dans ce cas-ci avec le récepteur au PDGF (platelet-derived growth factor). Ainsi, l'hydrolyse de l'IRS-1 par l'élastase va permettre d'augmenter la transduction du signal via la voie de la PI3K, aboutissant à une augmentation de la prolifération cellulaire.

- Enfin, les neutrophiles peuvent inhiber l'activation des lymphocytes T par la sécrétion de l'arginase et du NO, selon les mêmes mécanismes que ceux décrits précédemment pour les macrophages M2. Des neutrophiles produisant de l'IL-10 et capables d'inhiber l'activation des lymphocytes T ont aussi été mis en évidence dans le sang de patients atteints de mélanomes (De Santo et al., 2010).

(4) Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) ont été définies comme des cellules myéloïdes immatures possédant la capacité d'inhiber l'activation des lymphocytes T. La population des MDSCs est hétérogène, et on distingue principalement les MDSCs de type granulocytaire (noyau polylobé) et les MDSCs de type monocytique (Gabrilovich et al., 2012). Il est pourtant difficile de savoir si les MDSCs sont des cellules réellement distinctes des granulocytes neutrophiles ou des macrophages qui auraient acquis des fonctions immunosuppressives. Selon les revues, ces populations cellulaires sont présentées comme une population de cellules à part entière distincte des autres populations myéloïdes (Gabrilovich et al., 2012; Youn and Gabrilovich, 2010) ou sont décrites comme une population de neutrophiles ou de macrophages (par exemple) altérés phénotypiquement et fonctionnellement par la tumeur et les facteurs qu'ils sécrètent (Amulic et al., 2011; Fridlender et al., 2012; Galli et al., 2011). Certains auteurs présentent même les MDSCs comme l'ensemble des monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles et précurseurs myéloïdes immatures qui possèdent la capacité d'inhiber une réponse immunitaire spécifique (Gabrilovich et al., 2012; Ueha et al., 2011). Les travaux sur les MDSCs ont par la suite montré que leurs effets pro-tumoraux n'étaient pas limités à leur capacité à inhiber la réponse immunitaire T mais qu'elles participaient aussi à l'induction d'un environnement favorable à la croissance tumorale. Les nombreux mécanismes qu'elles possèdent pour faire cela reflètent l'hétérogénéité de ces populations. De nombreux travaux de recherche ont porté sur le

rôle des « MDSCs » dans le développement des tumeurs au sein desquelles elles s'accumulent. Nous allons donc, à partir de ces études, décrire ce que sont ces cellules et quelles sont leurs actions immunosuppressives et pro-tumorales.

Les marqueurs permettant de mettre en évidence les MDSCs chez la souris sont : le marqueur myéloïde CD11b et le marqueur Ly6C. Les MDSCs granulocytiques expriment en plus le marqueur spécifique des neutrophiles Ly6G et sont donc CD11b+/Ly6C+/Ly6G+, alors que les MDSCs monocytiques sont CD11b+/Ly6C+/ Ly6G-. Ces cellules expriment aussi le récepteur au CSF (CD115), au M-CSF (CD80) et à l'IL-4 (CD124). Il n'existe pas d'équivalent de Gr1 (Ly6G et Ly6C) chez l'Homme, et les MDSCs sont principalement caractérisées par l'expression de CD11b en l'absence du marqueur CD14 (marqueur exprimé par les macrophages et monocytes). Ce phénotype peut être précisé par l'expression du marqueur myéloïde commun CD33, en l'absence des marqueurs de lignées (LIN-) et du CHM II (HLA-DR-) (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

Dans les souris saines, les cellules correspondant phénotypiquement aux MDSCs sont appelées cellules myéloïdes immatures (IMCs). Elles sont principalement localisées dans la moelle osseuse où elles représentent 20 à 30% des cellules et n'ont pas de propriétés immunosuppressives. On en trouve un faible pourcentage dans la rate (2-4%) et elles sont absentes des ganglions lymphatiques. Les IMCs se différencient rapidement en DCs, granulocytes ou macrophages. La découverte des MDSCs a tout d'abord été faite dans les souris portant des tumeurs (Bunt et al., 2007; Fu et al., 1990; Song et al., 2005; Young et al., 1996; Young et al., 1991). Dans la plupart des modèles tumoraux, ces populations myéloïdes s'accumulent dans la moelle osseuse, la rate (où elles représentent alors 20 à 40% des cellules) et la tumeur. On remarque que les MDSCs granulocytiques sont les plus représentées puisqu'elles constituent 80% des MDSCs totales dans les souris développant un cancer. D'autre part, il est intéressant de noter que les MDSCs monocytiques peuvent se différencier en macrophages (de type M2) ou en cellules dendritiques après avoir infiltré la tumeur, alors que les MDSCs granulocytes conservent leur état immature (Corzo et al., 2010). Les patients atteints de divers cancers présentent aussi une augmentation du nombre de MDSCs dans le sang, jusqu'à dix fois supérieur à ce qui est observé chez un patient sain (Almand et al., 2001; Ochoa et al., 2007). Une étude réalisée sur 106 patients présentant différentes tumeurs solides a confirmé cette surreprésentation des MDSCs dans le sang des patients, et a de plus mis en évidence une corrélation entre le nombre de MDSCs chez les patients et le stade de

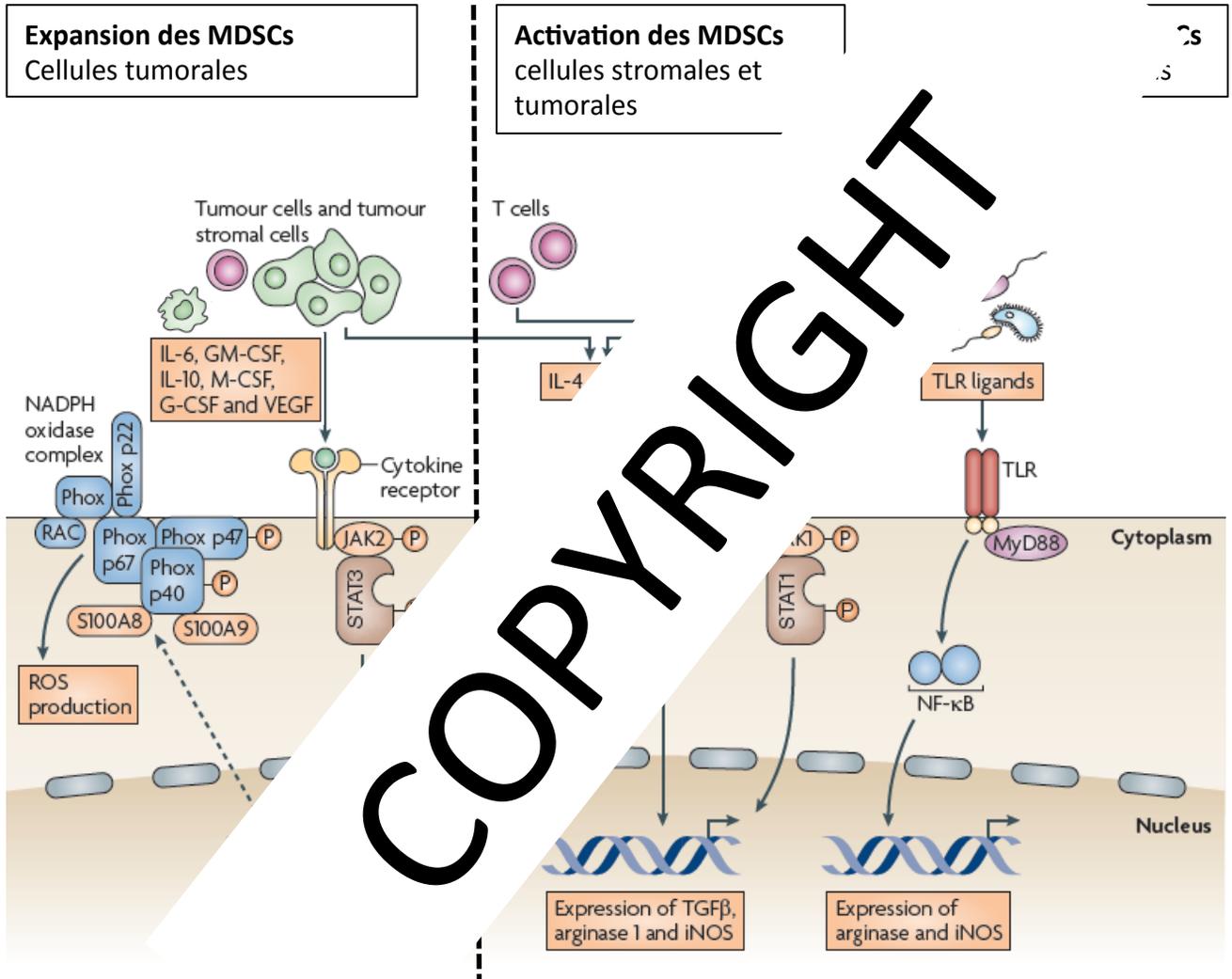


Figure 1.11 : Induction de la prolifération et de l'activation des MDSCs

La prolifération des MDSCs peut être induite par certains facteurs produits par les cellules tumorales comme l'IL-6, l'IL-10, le GM-CSF, le M-CSF, le G-CSF et le VEGF. Ces facteurs induisent l'activation du facteur de transcription STAT3 qui initie la prolifération cellulaire.

Des facteurs sécrétés par les cellules stromales et tumorales (IL-4, IL-13, IFN γ , IL-1 β) induisent une voie de signalisation aboutissant à l'activation de STAT1 et de STAT6 dans les MDSCs. Cette voie entraîne l'activation des MDSCs qui se traduit par l'expression de molécules immunosuppressives : TGF β , arginase et iNOS.

Certains facteurs microbiens, reconnus par les TLRs, peuvent aussi induire l'activation des MDSCs, via le facteur de transcription NF- κ B. Cette voie a aussi pour finalité l'expression de molécules immunosuppressives (arginase et iNOS)..

Adapté de Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. Nat Rev Imm 2009

leur cancer, avec une augmentation des MDSCs chez les patients atteints d'un cancer à un stade avancé. De plus, parmi les patients ayant un cancer de stade IV, une corrélation a été observée entre le taux de MDSCs et le développement de métastases (Diaz-Montero et al., 2009).

La prolifération et l'activation des MDSCs dans les souris développant des tumeurs sont dues à (**figure 1.11**): (1) des facteurs produits par les cellules tumorales elles-mêmes qui induiront la prolifération des cellules myéloïdes immatures dans la moelle osseuse tout en inhibant leur différenciation en cellules myéloïdes matures « classiques », (2) des facteurs produits par les cellules du stroma tumoral, dont les LT, qui sont pour leur part impliqués dans l'activation des MDSCs. Parmi les facteurs tumoraux induisant l'expansion des MDSCs, se trouvent : les prostaglandines, le SCF (stem cell factor), le GM-CSF (Granulocyte/Macrophage CSF) et le VEGF (vascular endothelial growth factor). En aval des voies de signalisation induites par ces facteurs, le facteur de transcription STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) est le principal inducteur de la survie et de la prolifération des MDSCs. L'acquisition de l'activité suppressive des MDSCs nécessite une activation de ces cellules par d'autres facteurs : ligands des TLRs, IFN γ , TGF β , IL-3, IL-4, qui induiront l'activation des facteurs de transcription STAT1, STAT6 et NF κ B (nuclear factor κ B). Ces facteurs vont ensuite permettre l'expression des diverses molécules secrétées par les MDSCs et responsables notamment de l'inhibition de la réponse immunitaire T.

La caractéristique principale des MDSCs, en plus des critères phénotypiques décrits précédemment, est leur capacité à inhiber l'activité anti-tumorale des lymphocytes T et des cellules NK (Gabrilovich et al., 2007). L'inhibition de la réponse immunitaire est donc l'un des rôles pro-tumoraux joué par les MDSCs, mais ce n'est pas le seul, puisqu'elles sont aussi capables de stimuler l'angiogenèse tumorale et la dissémination métastatique.

- Le mécanisme d'inhibition de l'activation des lymphocytes T diffèrera selon la population de MDSCs concernée. En effet les deux sous-types, granulocytaire et monocytique, n'expriment pas les mêmes enzymes productrices de substances suppressives (**figure 1.12 A**). Ainsi, les MDSCs granulocytaires secrètent de grandes quantités de ROS et de faibles quantités de NO, alors que l'inverse est observé pour la population de type monocytique. En revanche, le niveau d'expression de l'arginase 1 est identique. Pourtant, *in vitro*, les deux groupes de MDSCs montrent une capacité

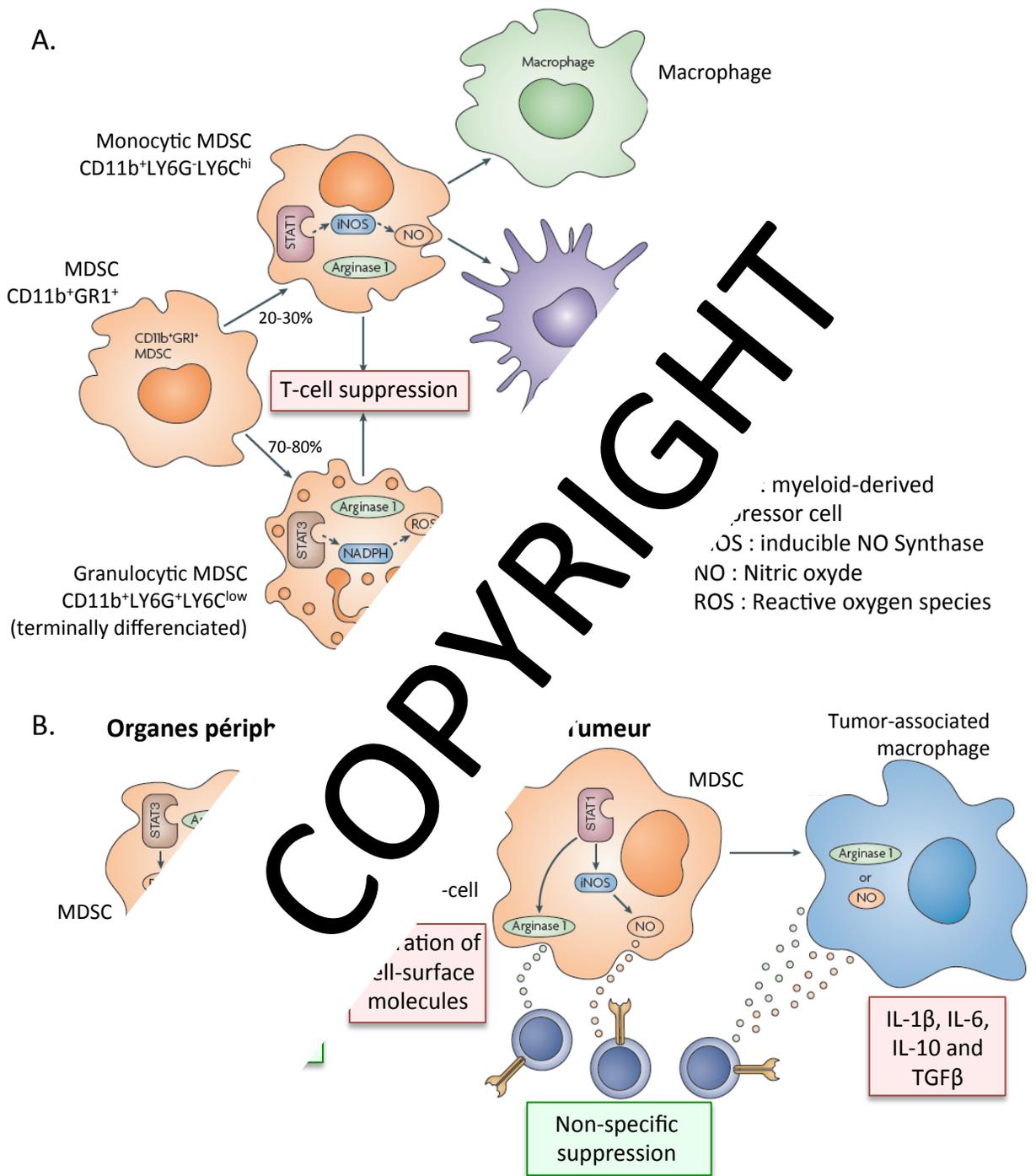


Figure 1.12 : Les populations de MDSCs et leurs mécanismes immunosuppresseurs.

A. Dans la tumeur, 70 à 80% des MDSCs sont de type granulocytique, elles produisent principalement des ROS et expriment l'arginase. Les MDSCs monocytiques produisent principalement du NO et expriment aussi l'arginase. Ces dernières peuvent se différencier en DCs et macrophages. **B.** Les mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire T sont principalement spécifiques de l'antigène dans les organes périphériques : les MDSCs présentent l'antigène via le CMH-I aux LT et inhibent l'activation des T spécifiques qui interagissent avec elles par la production de péroxynitrite (ONOO⁻). Dans les tumeurs, en revanche, le mécanisme d'inhibition est non spécifique de l'antigène et passe par la sécrétion de facteurs solubles (arginase et NO principalement) qui agissent à distance sans nécessiter de contact direct. Ces MDSCs peuvent se différencier en macrophages qui produisent ou du NO ou de l'arginase et peuvent aussi sécréter des cytokines suppressives. *Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. Nat Rev Imm 2009*

identique à inhiber la réponse T spécifique de l'antigène. Cette inhibition nécessite dans certains cas un contact cellulaire direct, indiquant soit l'existence d'une interaction physique entre la MDSC et le LT, soit la nécessité d'une forte proximité en raison de la libération de molécules à très courte durée de vie. De plus, l'inhibition de l'activation des lymphocytes T induite par les MDSCs peut être spécifique (Gabrilovich et al., 2001) ou non (Kusmartsev et al., 2000; Watanabe et al., 2008) de l'antigène (**Figure 1.12 B**). Il semble que dans les organes lymphoïdes, l'inhibition serait spécifique de l'antigène : les MDSCs capturent et présentent les antigènes puis entrent en contact avec des LT spécifiques qu'elles inhibent par la production de péronitrite (ONOO-, issu de la réaction entre le NO et l'ion superoxyde). En revanche dans les tumeurs, les mécanismes d'inhibition seraient indépendants de l'antigène : les MDSCs induiraient une suppression générale et locale des LT infiltrant la tumeur par production de molécules suppressives comme l'arginase et le NO. D'autre part, il a été montré que ces MDSCs pouvaient se différencier en macrophages au sein de la tumeur (Kusmartsev and Gabrilovich, 2005). Ceux-ci participent à l'inhibition non spécifique des LT par production d'arginase ou de NO, mais aussi de cytokines suppressives. Nous avons discuté précédemment des mécanismes par lesquels la déplétion de l'arginine par la sécrétion de l'arginase 1, la production de NO par la NOS et la production des ROS induisent l'inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T. L'importance des ROS est soulignée par le fait que dans certains modèles, l'inhibition de la production des ROS par les MDSCs inhibe complètement la suppression de l'activation des lymphocytes T *in vitro* (Kusmartsev et al., 2004). Enfin, les MDSCs peuvent aussi participer à l'induction de lymphocytes T régulateurs *in vivo*, inhibant ainsi de façon indirecte l'activation des LT (Yang et al., 2006).

- Les cellules myéloïdes suppressives jouent aussi un rôle pro-tumoral par la modification du microenvironnement tumoral, et plus particulièrement en favorisant l'angiogenèse. BV8 est une cytokine qui peut induire la prolifération des MDSCs dans la moelle osseuse ainsi que leur recrutement au sein de la tumeur. Si des souris sont traitées avec un anticorps anti-BV8, on observe une inhibition du recrutement des MDSCs au site tumoral et le développement d'un réseau vasculaire moins dense (Shojaei et al., 2007). D'autre part, si les MDSCs purifiées d'une tumeur sont co-injectées dans une souris saine avec des cellules tumorales (lignée MC26, cancer colorectal), la vascularisation de la tumeur qui se développe est plus importante que lorsque les

cellules tumorales sont injectées seules (Yang et al., 2004). Dans cette même étude, il est montré que cet effet est dépendant de la sécrétion de MMP9 et les auteurs confirment que cette métalloprotéase augmente la biodisponibilité du VEGF, induisant ainsi une angiogenèse tumorale plus importante. Une autre observation est que les MDSCs semblent promouvoir la formation des nouveaux vaisseaux sanguins en s'intégrant directement dans la paroi des capillaires intratumoraux et même en adoptant des caractéristiques propres aux cellules endothéliales (forme, expression de CD31). Les MDSCs semblent ainsi participer à la construction et/ou au renforcement des nouveaux vaisseaux.

- Les MDSCs exercent aussi un rôle pro-métastatique, qui serait dépendant de la production de métalloprotéases MMP par ces cellules. Dans deux modèles de tumeurs mammaires, il a été montré que le recrutement des cellules CD11b⁺ Gr1⁺ se faisait principalement au front d'invasion de la tumeur, et si ce recrutement est augmenté, les cellules tumorales sont plus invasives et plus de métastases pulmonaires se développent. Par ailleurs, la co-injection des cellules tumorales avec les MDSCs (purifiées de tumeurs mammaires) entraîne un développement métastatique plus important (Yang et al., 2008).

Nous venons ainsi de décrire les macrophages, les neutrophiles, les MDSCs granulocytiques et monocytiques. En lisant la littérature sur ces différents types de cellules et en décrivant leurs caractéristiques phénotypiques ainsi que leurs caractéristiques fonctionnelles dans le cadre de la croissance tumorale, je me suis rendue compte à quel point ces cellules étaient similaires. Au vu de ceci, il me semble impossible de distinguer ces populations cellulaires et surtout les neutrophiles intra-tumoraux (ou TAN pour Tumor-Associated Neutrophiles) des MDSCs granulocytiques. En effet, ces cellules ont les mêmes caractéristiques phénotypiques (cellules granuleuses avec un noyau plurilobé), expriment les mêmes marqueurs et exercent les mêmes fonctions via les mêmes acteurs moléculaires. Ainsi, lorsque je discuterai des résultats que j'ai obtenus lors de l'étude des cellules CD11b⁺/Ly6C⁺/Ly6G⁺ présentes dans les souris portant une tumeur, je les nommerai « neutrophiles/MDSCs ».

Comme nous venons de le voir, les interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire sont complexes. Elles varient selon le type de cancer et tout au long du développement de la tumeur. Connaître le rôle des différents sous-types de

cellules immunitaires dans le développement tumoral est déterminant pour la mise en place de thérapies basées sur la modulation du système immunitaire ou « immunothérapies ». Il est aussi important de comprendre comment les tumeurs affectent et parfois détournent à leur avantage l'activité des cellules immunitaires : l'inhibition de la molécule responsable peut parfois renverser le cours de la réponse immunitaire comme cela a été observé pour l'activité des neutrophiles après inhibition du TGF β (Fridlender et al., 2009). La réponse immunitaire tumorale est modulée au sein du microenvironnement tumoral par des interactions physiques entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires, ou via la libération de facteurs solubles qui pourront agir à plus ou moins longue distance. Mais il existe un autre moyen de communication particulier qui n'entre dans aucune de ces deux catégories : les vésicules membranaires extracellulaires. Dans le cadre de cette thèse, nous avons voulu étudier le rôle joué par une population précise de ces vésicules membranaires, les exosomes secrétés par les tumeurs, dans le développement tumoral et dans la modulation de la réponse immunitaire tumorale. Nous allons ainsi dans cette seconde partie de l'introduction présenter ce que sont les exosomes et quelles sont les fonctions qui leur sont actuellement attribuées.

B- LES EXOSOMES

Nous allons dans cette partie présenter les exosomes, leurs propriétés et leurs fonctions. Nous allons commencer par parler de leur découverte et de l'ensemble des caractéristiques qui permettent de les définir. Nous détaillerons ensuite les mécanismes impliqués dans la sécrétion des exosomes. De nombreux travaux de recherche ont été menés sur les exosomes et nous reviendrons sur les différentes fonctions qui leur ont ainsi été attribuées. Ces découvertes ont mis en évidence la possibilité d'utiliser les exosomes dans les immunothérapies anti-cancéreuses, et nous en discuterons dans la dernière partie.

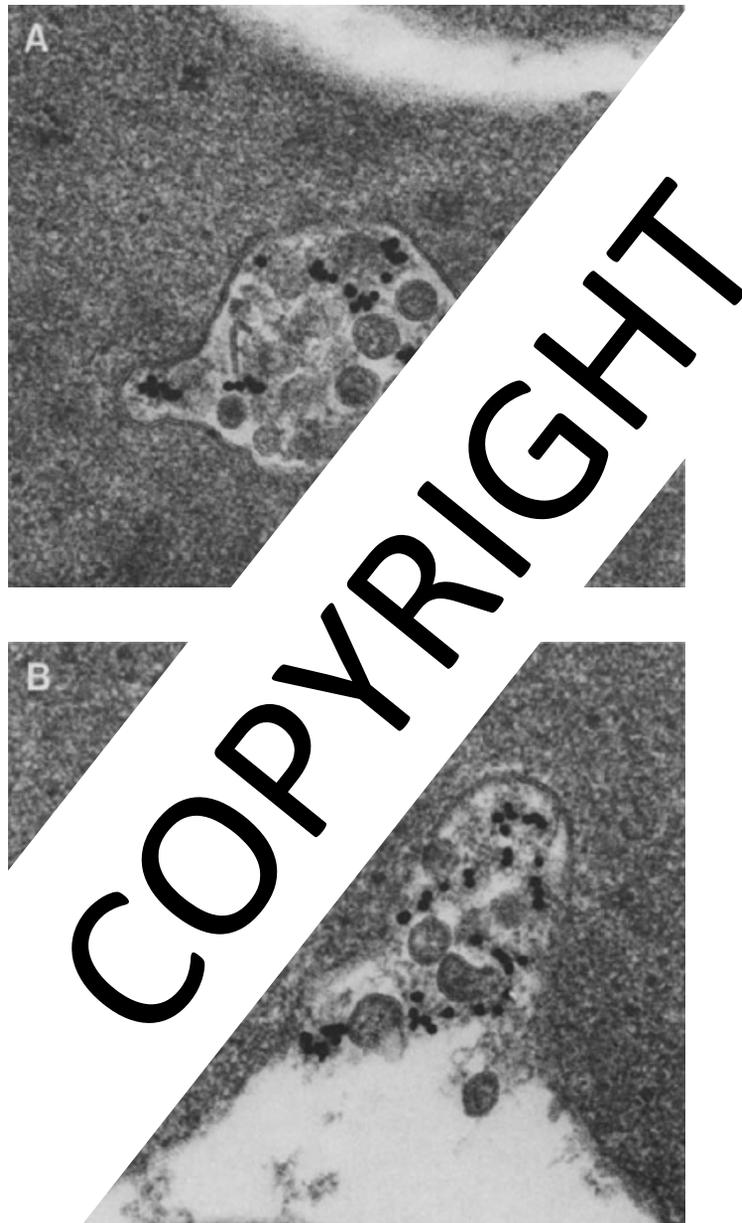


Figure 1.13 : Mise en évidence de la sécrétion des vésicules intraluminales par fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique.

A. L'analyse en microscopie électronique à transmission des réticulocytes révèle la présence de corps multivésiculaires, contenant des vésicules intraluminales d'environ 50nm de diamètre, dans lesquelles est incorporé le récepteur de la transferrine (internalisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement le récepteur de la transferrine et de protéine A marquée à la ferritine pour la détection). **B.** La fusion de corps multivésiculaires avec la membrane plasmique et la libération dans le milieu extracellulaire des vésicules intraluminales a aussi été montrée. Ces vésicules portent à leur surface le récepteur de la transferrine.

Pan et al. 2008 The Journal of Cell Biology

1/ Découverte des exosomes

La première utilisation du terme « exosome » a été faite en 1981 par Trams, E.G. *et al*, qui mirent en évidence la sécrétion par plusieurs lignées cellulaires (tumorales ou non) d'une population hétérogène de vésicules contenant une activité 5'-nucléasique (Trams et al., 1981). En 1983 et 1985, les groupes de Johnstone et Stahl décrivirent la libération par les réticulocytes dans le milieu extracellulaire de vésicules membranaires d'un diamètre de 50 à 100 nm de diamètre portant le récepteur de la transferrine (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985). A l'aide d'images de microscopie électronique, ils mirent en évidence que ces vésicules ne provenaient pas d'un bourgeonnement de la membrane plasmique, mais qu'elles se formaient dans les corps multivésiculaires (MVB pour multivesicular bodies) de la voie d'endocytose. Il était alors connu que les MVBs fusionnaient avec les lysosomes, conduisant à la dégradation de leur contenu. Mais dans ces deux études, il fut observé que les MVBs pouvaient aussi fusionner avec la membrane plasmique, libérant ainsi les vésicules qu'ils contiennent dans le milieu extracellulaire (**Figure 1.13**). Ainsi, depuis 1987, le terme « exosome » est utilisé pour désigner ces vésicules extracellulaires, originaires de la voie d'endocytose (Johnstone et al., 1987). Il fallu cependant attendre les années 1990 avant qu'un réel intérêt ne soit porté aux exosomes, avec une étude de Raposo, G. *et al*, démontrant un rôle fonctionnel des exosomes dans l'activation des lymphocytes T (Raposo et al., 1996). Ces travaux sur des lymphocytes B humains transformés par le virus EBV (Epstein Barr virus) ont montré la fusion de compartiments intracellulaires riches en CMH II, les MIIC pour MHC II-enriched compartments, avec la membrane plasmique. Les MIICs sont impliqués dans la prise en charge et la génération des peptides antigéniques, ainsi que dans leur apprêtement sur les molécules du CMH II. Ces compartiments contiennent des vésicules semblables aux exosomes et riches en complexes CMH-II-peptide, et leur fusion avec la membrane plasmique entraîne la libération de ces vésicules dans le milieu extracellulaire. Cette étude a donné une toute nouvelle importance aux exosomes puisque les complexes CMH-II-peptide présents sur les exosomes se sont avérés fonctionnels: ils sont capables d'induire l'activation des lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène présenté par les molécules du CMH II (Raposo et al., 1996). Deux années plus tard, ces résultats ont aussi été montrés avec des exosomes de cellules dendritiques murines par Zitvogel, L. *et al*. Ces travaux ont d'abord mis en évidence la sécrétion d'exosomes portant à la fois des complexes CMH-I-peptide et CMH-II-peptide

par les DCs (Zitvogel et al., 1998). Puis ils ont montré que les exosomes produits par des DCs chargées avec des peptides tumoraux, injectés *in vivo* chez la souris, sont capables d'induire une réponse immunitaire inhibant la croissance des tumeurs qui expriment ces antigènes. Cet effet thérapeutique (les exosomes étant injectés à des souris portant une tumeur de 50-80 mm²) est dépendant de la présence des lymphocytes T dans la souris et de la présence d'un CMH du bon haplotype sur les exosomes, soutenant la possibilité d'une activation directe des LT par les exosomes de DCs.

Depuis, la sécrétion des exosomes a pu être mise en évidence dans de très nombreux types cellulaires : cellules épithéliales, cellules nerveuses, cellules hématopoïétiques... et ils sont aussi produits par les cellules tumorales.

Les exosomes sont sécrétés *in vitro* dans les milieux de culture, mais ils sont aussi présents dans divers fluides corporels indiquant que la sécrétion des exosomes existe aussi *in vivo*. Des exosomes ont ainsi été détectés dans le sérum (Taylor et al., 2006) et le plasma (Caby et al., 2005), le liquide bronchoalvéolaire (Admyre et al., 2003), l'urine (Pisitkun et al., 2004), la salive (Palanisamy et al., 2010), le lait (Admyre et al., 2007), le liquide séminal (Gatti et al., 2005), le liquide amniotique (Asea et al., 2008), les ascites tumorales (Andre et al., 2002b; Taylor and Gercel-Taylor, 2005). La présence dans les exosomes de protéines spécifiquement exprimées dans les cellules épithéliales, hématopoïétiques et tumorales montre que ces différents types cellulaires sont capables de les produire *in vivo*. L'isolation des exosomes directement depuis les organes est rendue difficile par la génération artificielle de vésicules pendant la dissociation des tissus, masquant les potentielles vésicules réellement sécrétées *in vivo*. La mise en évidence de la présence d'exosomes au sein d'un organe a tout de même pu être faite par observation en microscopie électronique à transmission de coupes ultrafines d'amygdales. Sur ces sections, des exosomes arborant des molécules du CMH II apparaissaient au contact des cellules dendritiques folliculaires présentes dans les amygdales. Or, ces cellules n'expriment pas le CMH II, les exosomes observés ont donc été produits par un autre type cellulaire (probablement des LB) avant de venir interagir avec les DCs folliculaires (Denzer et al., 2000).

Ainsi, les exosomes sont produits par de nombreux types cellulaires *in vitro* et *in vivo*. Cependant, de nombreux autres types de vésicules existent, il est donc important

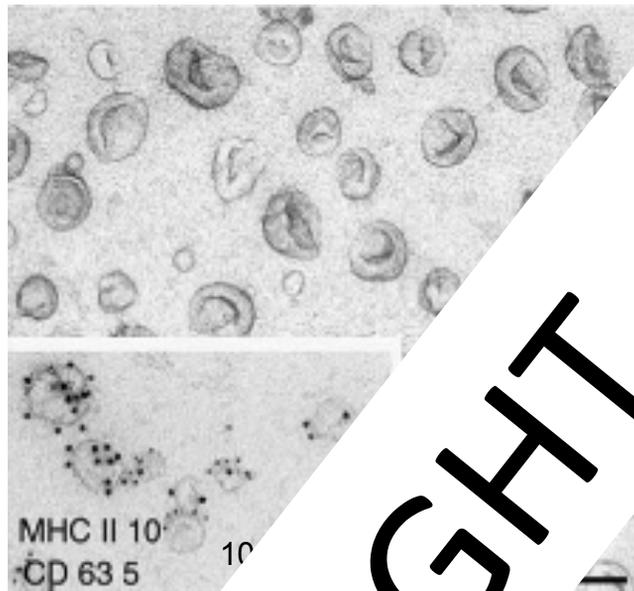


Figure 1.14 : Aspect des exosomes en microscopie électronique à transmission.

Cette micrographie a été réalisée par Thery et al. (2006). Elle présente des exosomes sécrétés par des lymphocytes B. Ils contiennent des molécules d'antigène MHC II. Dans l'insert en bas à gauche, ils contiennent également des molécules de CD63.

microscopie électronique à transmission.

exosomes sécrétés par des lymphocytes B. Ils contiennent des molécules d'antigène MHC II. Dans l'insert en bas à gauche, ils contiennent également des molécules de CD63.

Feature*	Exosome	Microvesicles	Exosomes	Membrane particles	Exosome-like vesicles	Apoptotic vesicles
Size	50–150 nm	100–1000 nm	50–200 nm	50–80 nm	20–50 nm	50–500 nm
Density in sucrose	1.16–1.28 g/ml	1.16–1.28 g/ml	ND	1.04–1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16–1.28 g/ml
Appearance by electron microscopy	Small, spherical	Large, spherical	Bilamellar round structures	Round	Irregular shape	Heterogeneous
Sedimentation	100,000 g	100,000 g	160,000–200,000 g	100,000–200,000 g	175,000 g	1,200g, 10,000 g or 100,000 g
Lipid composition	Expose phosphatidylserine	Expose phosphatidylserine	Enriched in cholesterol and diacylglycerol; expose phosphatidylserine	ND	Do not contain lipid rafts	ND
Markers	CD63, CD81, TSG101	Integrins, selectins and CD40 ligand	CR1 and proteolytic enzymes; no CD63	CD133; no CD63	TNFR1	Histones
Origin	Internal compartments (vesicles)	Plasma membrane	Plasma membrane	Plasma membrane	Internal compartments?	ND
Main references	3	143	8	17	144	

Tableau 1.2: Les différents types de vésicules membranaires sécrétées et leurs caractéristiques physicochimiques.

Il existe de nombreuses vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules. Ces populations de vésicules présentent des caractéristiques physiques (taille, densité, apparence en microscopie électronique à transmission, sédimentation) et biochimiques (composition lipidique et protéique) qui peuvent être utilisées pour les différencier mais qui parfois se recoupent. L'origine cellulaire est un critère permettant de distinguer les exosomes des autres vésicules extracellulaires.

Théry, C., Ostrowski, M. and Segura, E. *Nat Rev Imm* 2009

de connaître les critères qui permettent de définir un exosome et de le distinguer des autres classes de vésicules.

2/ Les exosomes : définition

Les exosomes sont une population de vésicules hétérogènes : leur taille, leur composition, leur densité, et leurs fonctions peuvent varier selon le type de cellules dont ils proviennent, et pour un même type cellulaire, selon les conditions dans lesquelles ils sont produits. Cependant, ils partagent tous des caractéristiques clés, reflétant pour la plupart leur origine endosomale, qui permettent de les définir en tant qu'exosomes (Simons and Raposo, 2009; Thery et al., 2009). Observés en microscopie électronique à transmission, les exosomes présentent une forme concave et ont une taille comprise entre 40 et 100 nm de diamètre (**figure 1.14**). D'autre part, ils sédimentent après une centrifugation à 100.000g, flottent sur un gradient de sucrose à une densité allant de 1,13 à 1,19 g/mL et ont une composition protéique, lipidique et en acides nucléiques particulière. La taille et la composition spécifique des exosomes rappellent celles des vésicules intraluminales observées dans les MVBs des cellules productrices et appuient ainsi de l'origine endosomale des exosomes. Des protéines spécifiquement enrichies dans les exosomes par rapport aux lysats cellulaires sont utilisées comme « marqueurs » pour définir les exosomes : Tsg101, Alix, Hsc70, CD9, CD63, CD81, Mfge8, et les molécules du CMH. La plupart d'entre elles sont des protéines impliquées dans la voie d'endocytose d'où proviennent les exosomes. Du point de vue lipidique, on observe un enrichissement en cholestérol, sphingomyéline, céramide et l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface des exosomes.

Toutes ces caractéristiques permettent de définir les exosomes, et de les distinguer des autres vésicules produites par les cellules que sont les microvésicules, les ectosomes, les microparticules, les exovésicules et les corps apoptotiques dont les caractéristiques sont résumées dans le **tableau 1.2** (Thery et al., 2009). Il existe donc une très grande variété de vésicules extracellulaires, et l'origine endosomale des exosomes est la principale caractéristique qui les différencie des autres. En effet, les microvésicules, les ectosomes et les microparticules sont produits par bourgeonnement depuis la membrane plasmique, elles doivent donc avoir une composition protéique différente des exosomes, marquée par l'absence des marqueurs endosomaux. Les corps

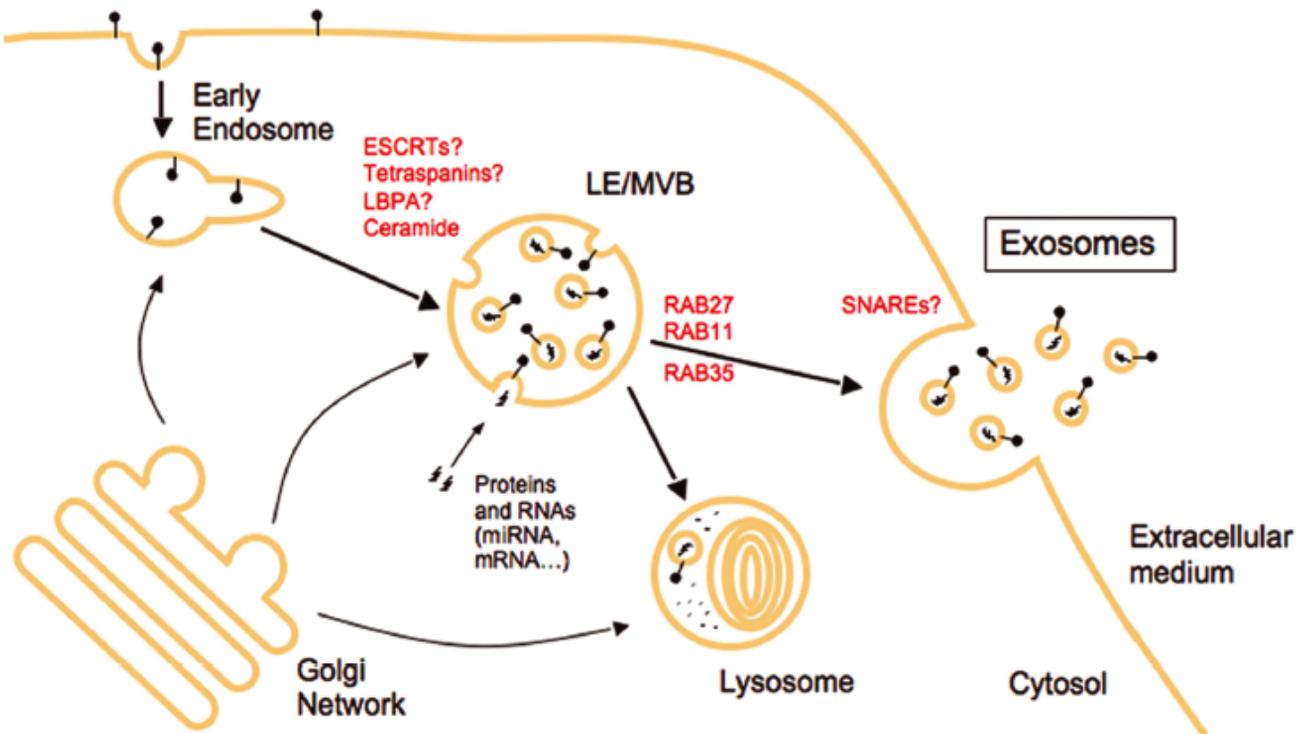


Figure 1.15 : Voie de biogenèse des exosomes et acteurs moléculaires impliqués
 Une vésicule d'endocytose se forme par invagination de la membrane plasmique puis fusionne avec un endosome précoce, qui lui-même fusionne ensuite avec un endosome tardif. Les exosomes se forment par invagination de la membrane limitante des endosomes tardifs. Des vésicules intraluminales (ILVs) sont ainsi créées et le compartiment est appelé corps multivésiculaire (MVB). Celui-ci peut alors fusionner avec les lysosomes entraînant la dégradation de son contenu, ou alors fusionner avec la membrane plasmique libérant les ILVs le milieu extracellulaire. Ces vésicules sont les exosomes.
Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G. and Théry, C. Traffic Review 2011

apoptotiques sont issus de la dislocation de la cellule après le processus de mort apoptotique. Des vésicules très hétérogènes sont ainsi formées, avec des tailles, des densités et des vitesses de sédimentation très variées. Ainsi, pour étudier proprement une population de vésicules donnée comme les exosomes, il est nécessaire de travailler dans des conditions peu délétères pour les cellules. Cela explique aussi la difficulté de purifier des exosomes à partir de cultures d'organes *ex vivo*.

3/ La biogenèse des exosomes

Comme nous venons de le décrire, l'origine endosomale des exosomes est leur principale caractéristique et elle leur confère des propriétés particulières : les exosomes correspondent aux vésicules intraluminales (ILVs) présentes dans les corps multivésiculaires (MVBs) intracellulaires. Nous allons dans cette partie décrire plus précisément les mécanismes de formation des exosomes au sein de la voie d'endocytose et du trafic vésiculaire intracellulaire.

a) Présentation de la voie de production et de sécrétion des exosomes

La voie d'endocytose est une voie de transport permettant à la cellule d'internaliser des molécules extracellulaires ou enchâssées dans la membrane plasmique. Cette voie aboutit soit à la dégradation, soit au recyclage des protéines endocytées. Elle participe aussi au phénomène de transcytose dans les épithéliums (transfert des molécules d'un côté à l'autre de la cellule épithéliale). La voie d'endocytose (**figure 1.15**) débute par une invagination de la membrane plasmique qui aboutit à la formation d'une vésicule d'endocytose. Ces vésicules d'endocytose fusionnent ensuite avec les endosomes précoces qui fusionnent finalement avec les endosomes tardifs. Des invaginations de la membrane limitante de ces derniers induisent la formation de vésicules intraluminales (ILVs). On parle alors de corps multivésiculaires (MVBs). La fusion des MVBs avec les lysosomes va aboutir à la dégradation de leur contenu. Cependant, les MVBs peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985; Raposo et al., 1996), libérant leurs ILVs dans le milieu extracellulaire. Les vésicules ainsi secrétées sont les exosomes, et il est intéressant de remarquer que leur bicouche lipidique a la même orientation que la membrane plasmique des cellules. La question de l'existence de

différentes sous-populations des MVBs se pose actuellement : certains seraient destinés à fusionner avec les lysosomes alors d'autres seraient destinés à fusionner avec la membrane plasmique. L'autre possibilité, même si elle paraît conceptuellement moins probable, serait l'existence d'une seule population de MVBs contenant des ILVs dont certaines seront dégradées et d'autres secrétées. Quelques études semblent soutenir l'idée que différentes populations de MVBs pourraient coexister dans une même cellule. En effet, dans les LB, il a été montré que deux populations de MVBs au moins étaient présentes dans la même cellule : des MVBs enrichis en cholestérol et d'autres non enrichis en cholestérol (Mobius et al., 2002). D'autre part, il a été montré que l'EGF et son récepteur, après internalisation, sont transportés dans la cellule via des MVBs négatifs pour l'acide lyso-bisphosphatidique (LBPA), un marqueur d'endosomes tardifs, et non par des MVBs portant ce lipide (White et al., 2006). Ces deux sous-populations sont pourtant positives pour CD63, et leur observation par microscopie électronique confirme que ces deux types de MVBs sont morphologiquement identiques. Plus de sous-populations pourraient même exister, puisque les auteurs ont constaté la présence de MVBs négatifs pour l'EGF-R et pour le LBPA.

Une exception à l'origine endosomale des exosomes a été apportée par une étude sur les lymphocytes T, dans laquelle la sécrétion de vésicules très semblables aux exosomes a été observée par bourgeonnement de la membrane plasmique des LT, à partir de domaines similaires à ceux présents dans les endosomes (Booth et al., 2006). Ces vésicules sont enrichies en marqueurs caractéristiques des exosomes, sont de même taille et de même densité. Il semble en effet difficile de les différencier des exosomes d'origine endosomale. Cependant, il n'est pas certain que ce mécanisme existe dans beaucoup d'autres types cellulaires, contrairement à la sécrétion par voie endosomale.

Les acteurs moléculaires impliqués dans la formation des MVBs et de leurs vésicules intraluminales, ainsi que ceux impliqués dans la fusion avec la membrane plasmique ne sont pas encore bien connus. Quelques uns ont tout de même été décrits, et il semble qu'il n'y ait pas un mécanisme général, mais plutôt plusieurs mécanismes en fonction du type cellulaire considéré, ou même au sein d'un même type cellulaire, en fonction de la molécule adressée considérée. Nous allons présenter dans un premier temps des molécules impliquées dans la formation des ILVs et/ou dans l'incorporation

de protéines dans ces vésicules, puis dans un second temps des protéines impliquées dans la fusion des MVBs à la membrane plasmique.

b) Formation des vésicules intraluminales et adressage aux exosomes

(1) Les protéines ESCRT

Il est connu que les protéines ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) sont impliquées à la fois dans le processus d'invagination aboutissant à la formation des ILVs destinées à la dégradation et dans la sélection des protéines qui incorporeront les ILVs (Williams and Urbe, 2007). Les protéines ESCRT permettent ainsi le tri entre les protéines à dégrader et celles à recycler, en dirigeant les protéines ubiquitinylées vers les lysosomes. Il a donc été envisagé que les ESCRT puissent être aussi impliquées dans le tri des protéines vers les exosomes. L'enrichissement dans les exosomes de certaines protéines ESCRT (Alix, Tsg101) ainsi que de protéines ubiquitinylées va dans le sens de cette hypothèse (Buschow et al., 2005). De plus, la protéine Alix est nécessaire à l'incorporation du récepteur de la transferrine dans les exosomes (Geminard et al., 2004). Cependant, diverses études ont mis en évidence l'adressage de protéines dans les exosomes selon des mécanismes indépendants des ESCRT et faisant intervenir : les tétraspanines (Buschow et al., 2009; van Niel et al., 2011), l'agrégation de protéines (Fang et al., 2007), ou encore un lipide, la céramide (Trajkovic et al., 2008).

(2) Les tétraspanines

Les tétraspanines sont des molécules transmembranaires particulièrement enrichies dans les exosomes (CD9, CD63, CD81 et CD82) et dont certaines semblent jouer un rôle dans l'adressage de protéines dans les exosomes. Elles sont capables de s'associer afin de former d'importants réseaux protéiques au sein des bicouches lipidiques. Suite à une analyse protéomique et biochimique de la composition des exosomes de lymphocytes B humains, il avait été montré que la plupart des protéines exosomales étaient contenues dans des domaines insolubles en présence de certains détergents (Wubbolts et al., 2003). Ces protéines insolubles sont probablement incluses dans des radeaux lipidiques contenant des réseaux de tétraspanines. Les molécules du

CMH II ont un temps de demi-vie très court dans les cellules dendritiques immatures qui ont pour rôle de présenter continuellement les antigènes présents dans l'environnement. Les molécules du CMH II sont ainsi ubiquitinylées et prises en charge par les protéines ESCRT qui les incorporent dans les ILVs des MVBs afin d'aboutir à leur dégradation dans les lysosomes ou à leur sécrétion dans les exosomes. En revanche, quand la cellule dendritique est activée, elle ne présente que les antigènes présents dans le milieu au moment de son activation, ce qui nécessite de stopper la dégradation des molécules de CMH II. Pour cela, les phénomènes d'ubiquitinylation sont arrêtés. Pourtant, les molécules de CMH II sont toujours présentes et même encore plus enrichies dans les exosomes de DCs activées que dans les exosomes de DCs immatures (Segura et al., 2005). Ceci implique un adressage du CMH II sur les exosomes indépendant de l'ubiquitinylation et donc des protéines ESCRT. Il semble que l'inclusion des molécules du CMH II dans des réseaux composés de tétraspanines et notamment de CD9 soit à l'origine de cet adressage du CMH II aux exosomes (Buschow et al., 2009). Une autre étude a montré que CD63 participait à la formation des ILVs dans les MVBs de mélanocytes et à l'adressage du domaine luminal de la protéine PMEL dans les ILVs de façon indépendante des protéines ESCRT (van Niel et al., 2011). Il semble donc que les tétraspanines participent à plusieurs étapes de la voie de sécrétion des exosomes.

(3) Les phénomènes d'oligomérisation des protéines

L'oligomérisation des protéines, qui n'est pas sans rappeler ce qui se passe dans le cas des réseaux de tétraspanines, pourrait aussi participer à la formation des exosomes en favorisant l'incorporation des protéines ainsi regroupées dans les ILVs. Cela a d'abord été mis en évidence par l'agrégation de protéines à l'aide d'anticorps spécifiques. L'ajout d'anticorps dirigés contre le récepteur à la transferrine dans les réticulocytes (Vidal et al., 1997), contre les molécules du CMH II dans les DCs (Muntasell et al., 2007) ou encore contre CD43 dans les LT (Fang et al., 2007), induit l'adressage de ces protéines dans les exosomes.

(4) La céramide

D'autres études ont mis en évidence le rôle d'un lipide, la céramide, dans l'incorporation de certaines protéines dans les exosomes. La céramide, de par sa

structure, induit naturellement une courbure de la bicouche lipidique. C'est la formation de cette courbure qui permettrait à la céramide de participer à la formation des ILVs ainsi que d'y incorporer les molécules qui lui sont associées. Le groupe de M. Simons a ainsi montré, dans une lignée d'oligodendrocytes murins, que l'adressage de la protéine protéolipide (PLP) dans les exosomes était dépendante de la céramide, mais pas des protéines ESCRT (Trajkovic et al., 2008).

(5) Adressage des ARN aux exosomes

Les exosomes contiennent aussi des molécules d'ARN (ARN messagers et micro-ARN) qui, tout comme les protéines, sont enrichies de manière sélective et non aléatoire dans les exosomes (Valadi et al., 2007). Les mécanismes responsables de la sélection des ARN qui sont empaquetés dans les exosomes ne sont pas connus. Les protéines ESCRT sont des candidats potentiels à cette fonction, puisque certaines des protéines ESCRT-II sont capables de lier des ARNm (Irion and St Johnston, 2007). Par ailleurs, Gibbings, D. *et al* ont mis en évidence la localisation sur les MVBs de deux protéines du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) : Argonaute 2 (AGO2) et GW182, ainsi que de miRNA et de leurs ARNm cibles (Gibbings et al., 2009). GW182, mais pas AGO2, est ensuite retrouvée dans les exosomes sécrétés dans le milieu extracellulaire. Ces protéines pourraient éventuellement être impliquées dans le transport de certains miRNA dans les exosomes, mais cela n'a pas été démontré.

c) Fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique

Après l'étape de formation des ILVs dans les corps multivésiculaires, ces derniers doivent être transportés, ancrés puis doivent fusionner avec la membrane plasmique afin de permettre la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire. Les protéines de la famille Rab sont des petites GTPases impliquées dans le mouvement des vésicules intracellulaires, et dans l'ancrage puis la fusion de ces vésicules avec la membrane réceptrice. Ainsi, il était supposé que des membres de cette famille puissent être impliqués dans certaines étapes de la biogenèse des exosomes, allant de la formation des ILVs jusqu'à la fusion des MVBs avec la membrane plasmique en passant par le transport de ces compartiments.

En effet, les protéines Rab11, Rab27 et Rab35 participent toutes les trois à la sécrétion des exosomes dans certains types cellulaires. Dans une lignée cellulaire leucémique érythrocytaire, Rab11 est impliquée dans la formation des MVBs et plus particulièrement dans l'ancrage et la fusion homotypique de ces compartiments entre eux. Une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire permettra ensuite la fusion des MVBs avec la membrane plasmique et la libération des exosomes (Savina et al., 2005). Rab11 ne semble donc pas jouer un rôle dans la sécrétion constitutive des exosomes, mais plutôt dans la sécrétion régulée par le calcium, comme c'est le cas dans ce type cellulaire. Un criblage des protéines inhibitrices des Rab, les GAP (GTPase-activating protein) a mis en évidence un rôle des protéines GAP TBC1D10A-C dans la sécrétion des exosomes par les oligodendrocytes (Hsu et al., 2010). Ces trois protéines ont Rab35 pour substrat. La surexpression de Rab35 dans ces cellules entraîne une augmentation de la sécrétion des exosomes porteurs de la PLP dans les oligodendrocytes. A l'inverse, l'inhibition de l'expression de cette protéine diminue la sécrétion de ces exosomes, et induit l'accumulation des compartiments endosomaux tardifs dans les cellules. Plus précisément les auteurs montrent que Rab35 est impliquée dans l'ancrage des MVBs à la membrane plasmique. Enfin, il est intéressant de noter que TBC1D10A a aussi pour substrat la petite GTPase Rab27a, et qu'une étude menée dans le laboratoire a confirmé le rôle de Rab27a, mais aussi de Rab27b, dans la sécrétion des exosomes par les cellules épithéliales humaines HeLa (Ostrowski et al., 2010). Dans cette dernière étude, un criblage a aussi été réalisé, portant cette fois-ci directement sur les protéines Rab. Rab27a et Rab27b sont les deux protéines de cette famille qui ont été mises en évidence comme nécessaires à la sécrétion des exosomes par cette méthode. Nous reviendrons sur cette étude plus en détails dans la troisième partie de l'introduction portant sur les protéines Rab. Brièvement, la conclusion est que les deux isoformes sont impliquées de façon non redondante dans la sécrétion des exosomes. Rab27b participe au transfert des MVBs depuis le réseau de microtubules vers le cytosquelette cortical d'actine, dans le maintien de ces MVBs à la périphérie cellulaire et dans l'ancrage à la membrane plasmique. Le rôle joué par Rab27a n'est pas aussi clairement défini, mais il se joue à un autre niveau : Rab27a pourrait soit avoir pour rôle d'inhiber la fusion des MVBs entre eux ou avec des compartiments intracellulaires autres que la membrane plasmique, soit permettre l'ancrage des MVBs à la membrane

(et en son absence, les vésicules fusionnent entre elles plutôt qu'avec la membrane plasmique).

Enfin, une autre famille de protéines pouvant être impliquées dans la sécrétion des exosomes est la famille des protéines SNAREs (Soluble NSF attachment protein receptor). Ces protéines permettent le déclenchement de la fusion entre les membranes des deux compartiments destinés à fusionner. Cependant, aucun rôle des SNAREs dans la voie de sécrétion des exosomes n'a encore été démontré.

d) Régulation de la sécrétion des exosomes

La plupart des cellules secrètent les exosomes de façon constitutive. Cependant, pour certaines cellules, cette sécrétion peut être modulée en fonction des signaux extérieurs et de l'état de maturation ou d'activation des cellules. Ainsi, les réticulocytes secrètent des exosomes portant le récepteur de la transferrine au moment de leur maturation (Pan et al., 1985). La sécrétion des exosomes par les lymphocytes T est augmentée après leur activation par un engagement du TCR (Blanchard et al., 2002). La sécrétion des exosomes par les cellules dendritiques est aussi augmentée suite à leur interaction avec un LT spécifique de l'antigène qu'elles présentent sur les molécules de CMH (Buschow et al., 2009). En revanche, la situation est moins claire pour les cellules dendritiques activées par le LPS (lipopolysaccharide) : il a été montré dans le laboratoire que les DCs ainsi activées secrétaient moins d'exosomes que les cellules dendritiques immatures (Segura et al., 2005; Thery et al., 1999), mais des travaux récents réalisés dans le laboratoire de W. Stoorvogel ne confirment pas cette observation. Il semble que l'utilisation de la filtration pour purifier les exosomes dans les études réalisées en 1999 et 2005 ait entraîné la perte d'exosomes (peut-être agrégés) faisant croire à une diminution de la quantité d'exosomes sécrétée. En revanche, les deux groupes ont observé une modification de la composition protéique des exosomes suite à l'activation des DCs par le LPS (Hoen et al., 2011; Segura et al., 2005). Tout comme pour les LT, l'engagement du BCR sur les lymphocytes B (Arita et al., 2008; Riolland et al., 2006), ou leur activation via la protéine CD40 (Arita et al., 2008; Saunderson et al., 2008) induit une augmentation de la sécrétion des exosomes par ces cellules. Enfin, la sécrétion des exosomes par les mastocytes est induite lorsque ceux-ci sont activés par des complexes antigène-IgE (Raposo et al., 1997). De plus, cette

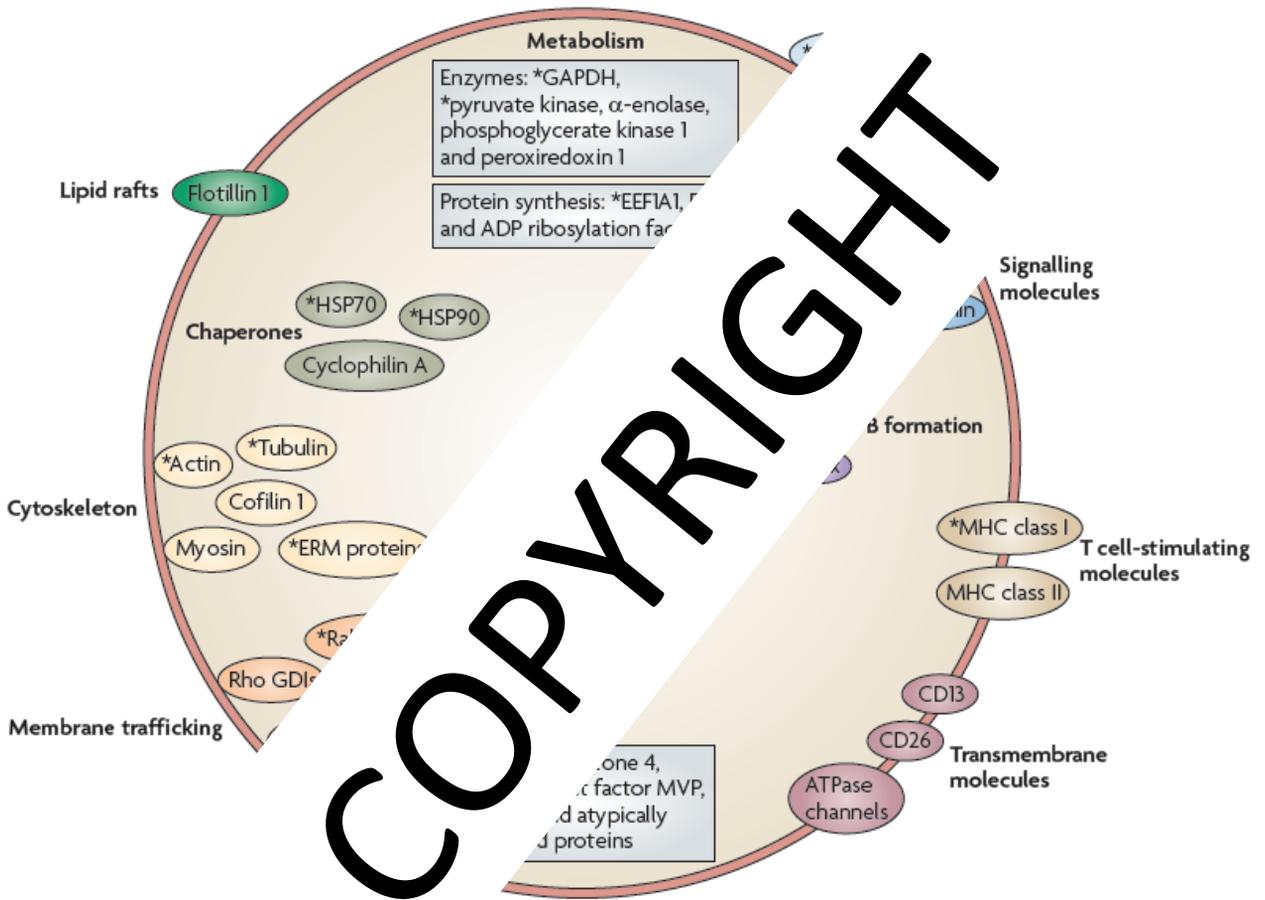


Figure 1.16 : Composition protéique des exosomes

Ce schéma représente les protéines les plus classiquement retrouvées dans les exosomes de différents types cellulaires. Il est basé sur 15 différentes analyses protéomiques, réalisées avec des exosomes purifiés à partir de surnageants de cellules en culture et de liquides biologiques.

Théry, C. Ostrowski, M. and Segura, E. *Nat Rev Imm* 2010

sécrétion est dépendante du calcium, tout comme cela a pu être observé pour les cellules leucémiques érythrocytaires (Savina et al., 2003).

4/ La composition des exosomes

Les exosomes ainsi formés possèdent une composition très particulière, ce qui est l'un des critères permettant de les distinguer des autres vésicules extracellulaires. Nous allons ainsi dans cette partie détailler leur composition en protéines, lipides et en acides nucléiques.

a) Composition protéique des exosomes

L'analyse de la composition protéique des exosomes a tout d'abord été effectuée par western blot sur des exosomes de lymphocytes B, de mastocytes, de cellules dendritiques ou encore de cellules tumorales (Raposo et al., 1996; Raposo et al., 1997; Wolfers et al., 2001; Zitvogel et al., 1998). Depuis ces analyses ont été effectuées sur des exosomes provenant de multiples types cellulaires et sécrétés *in vitro* dans les surnageants de culture ou *in vivo* dans les fluides biologiques. Des analyses protéomiques ont permis de préciser de façon plus complète les protéines qui sont présentes sur les exosomes. Cela a tout d'abord été fait à partir d'exosomes de cellules dendritiques (Segura et al., 2005; Thery et al., 2001; Thery et al., 1999) puis sur des exosomes de diverses origines produits *in vitro* (Chaput et al., 2006; Choi et al., 2007; Faure et al., 2006; Hegmans et al., 2004; Mears et al., 2004; Potolicchio et al., 2005; Wubbolts et al., 2003) ou *in vivo* (Bard et al., 2004; Gatti et al., 2005; Pisitkun et al., 2004). Ces études ont de plus permis de mettre en évidence que les exosomes représentaient une population de vésicules bien distincte des corps apoptotiques (Thery et al., 2001). Ainsi, des protéines bien spécifiques sont présentes dans la membrane limitante mais aussi à l'intérieur des exosomes (**figure 1.16**). On peut classer ces protéines dans différents catégories : (1) des protéines impliquées dans le transport des compartiments intracellulaires dont les protéines Rab et les annexines ; (2) des protéines impliquées dans la formation des corps multivésiculaires : Tsg101, Alix, clathrine ; (3) des tétraspanines CD63, CD9, CD82, CD81 ; (4) des protéines du cytosquelette ou associées au cytosquelette : actine, tubuline, myosine, cofiline 1, protéines de la famille ezrine-radixine-moésine (ERM) ; (5) des molécules impliquées

dans l'adhésion comme la lactadhérine (ou MFGE8 pour Milk fat globule EGF factor 8) et les intégrines ; (6) des protéines associées aux radeaux lipidiques comme la flotiline 1 ; (7) des protéines chaperonnes : HSP70, HSP90 ; (8) des molécules de signalisation et du métabolisme ; (9) des molécules du CMH de classe I. Diverses autres protéines peuvent être présentes ou non en fonction du type cellulaire d'où proviennent les exosomes : des complexes CMH-II-peptides sur les exosomes de cellules présentatrices de l'antigène, des molécules de costimulation sur les exosomes de DCs activées, des antigènes tumoraux sur les exosomes issus de cellules tumorales par exemple. Comme nous le verrons plus tard, certaines de ces protéines peuvent participer à l'interaction entre les exosomes et d'éventuels partenaires cellulaires ainsi qu'à leurs fonctions par la transmission d'un signal aux cellules réceptrices.

Parmi toutes les protéines pouvant être incorporées dans les exosomes et mises en évidence par les méthodes de protéomique, certaines sont communément (indépendamment du type cellulaire ou de l'état d'activation) et spécifiquement enrichies dans les exosomes par rapport aux lysats cellulaires. Elles sont considérées comme des marqueurs des exosomes : CD63, CD81, CD9, Tsg101, Alix, MFGE8, Hsc70, CMH I et CMH II notamment.

b) Composition lipidique des exosomes

La composition en lipides des exosomes diffère de celle de la membrane plasmique. Leur membrane est spécifiquement enrichie en (1) cholestérol, (2) sphingolipides : le ganglioside GM3, la sphingomyéline, (3) céramide, (4) glycérophospholipides : phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine, acide phosphatidique (Subra et al., 2007; Trajkovic et al., 2008; Wubbolts et al., 2003). En revanche deux sphingolipides, le cardiolipide et l'acide lysobisphosphatidique (LBPA), sont absents des exosomes. La résistance des exosomes à la solubilisation par différents détergents confirme la présence radeaux lipidiques. Enfin, la phosphatidylsérine, normalement localisée sur le feuillet interne de la membrane plasmique (via une translocation active), est exposée à la surface des exosomes.

c) Des acides nucléiques dans les exosomes

En 2007, le groupe de J. Lötvall a mis en évidence pour la première fois la présence d'ARN messagers (ARNm) et de micro-ARN (miRNA) dans la lumière des exosomes sécrétés par les mastocytes murins et humains (Valadi et al., 2007). Les ARN ont été détectés par trois méthodes différentes : électrophorèse sur gel d'agarose, spectrophotométrie et Bioanalyzer. 1300 ARNm différents, soit 8% des ARNm transcrits par la cellule, ont pu être détectés dans les exosomes. Le traitement des exosomes par la RNase (ribonucléase) n'abolit pas la détection des ARN, éliminant la possibilité d'une contamination par des ARN libérés dans le milieu et co-centrifugés avec les exosomes. Par ailleurs, un traitement à la trypsine fut aussi effectué afin d'éliminer d'éventuels complexes macromoléculaires contenant des ARN qui pourraient être associés aux exosomes. De la même façon, ce traitement ne modifia pas les quantités d'ARN détectées dans les culots d'exosomes, indiquant que ces ARN sont bien présents dans la lumière des vésicules. De plus, ces ARN sont présents dans des vésicules flottant sur un gradient de sucrose à une densité comprise entre 1,11 et 1,21 g/mL, tout comme le marqueur exosomal CD63. Les exosomes contiennent donc des ARN messagers, qui de plus sont fonctionnels puisque cette même étude montre qu'ils peuvent être traduits *in vitro* et *in vivo* dans des cellules réceptrices. D'autre part, de nombreux ARN de petite taille sont mis en évidence dans les exosomes, et une analyse plus poussée a permis de montrer que les exosomes de mastocytes contiennent 121 miRNA différents. Dans le cas des ARNm comme dans celui des miRNA, les profils observés montrent qu'il y a une sélection des ARN incorporés dans les exosomes et non une capture au hasard du pool d'ARN présents dans le cytoplasme cellulaire. Depuis, d'autres groupes ont confirmé la présence d'ARN dans les exosomes. Par exemple, des miRNA viraux sont présents dans les exosomes produits par les lymphocytes B infectés avec l'EBV (Pegtel et al., 2010). Ces miRNA sont transférés dans des cellules dendritiques non infectées qui capturent les exosomes. Ils y induisent alors la répression de l'expression de leurs gènes cibles. Les exosomes de cellules dendritiques contiennent aussi des miRNA, et de façon intéressante ce contenu en miRNA change avec l'état de maturation des cellules et notamment après traitement par le LPS (Montecalvo et al., 2012). Ces miRNA peuvent être transférés à d'autres DCs dans lesquels ils sont fonctionnels. Une étude publiée la même année a confirmé la présence de miRNA dans les DCs mais aussi dans les exosomes de lymphocytes T et de lymphocytes B, avec un profil différent de celui

observé dans le cytoplasme cellulaire (Mittelbrunn et al., 2011). Cette étude a ainsi montré le transfert de ces miRNA via des exosomes CD63+ depuis les lymphocytes T vers les cellules présentatrices de l'antigène, suivi d'une modulation d'expression des gènes cibles (testé avec un gène rapporteur) dans ces dernières.

Enfin, d'autres groupes ont montré la présence d'ARNm et de miRNA biologiquement actifs dans des préparations contenant à la fois des microvésicules et des exosomes (Ratajczak et al., 2006; Skog et al., 2008; Zhang et al., 2010). Il serait donc intéressant de savoir si les ARN présents dans chacune de ces deux populations de vésicules sont les mêmes et en quelles proportions, ainsi que de savoir dans quel type de vésicules se trouvent les ARN induisant les modifications observées sur les cellules voisines.

Plus récemment, la présence de séquences d'ADN dans les exosomes a aussi été démontrée. Ces séquences sont des retrotransposons provenant de rétrovirus endogènes et des séquences oncogéniques amplifiées ou mutées (Balaj et al., 2011).

5/ Fonctions des exosomes sécrétés par les cellules tumorales

De nombreux groupes de recherche tentent actuellement de comprendre quelles sont les implications physiologiques de la sécrétion des exosomes *in vivo* et quels rôles ces vésicules peuvent-elles jouer. Au moment de leur découverte par les groupes de Johnstone et Stahl, les exosomes étaient simplement considérés comme un moyen pour les réticulocytes de se décharger de protéines qui ne leur étaient plus nécessaires au cours de leur maturation (le récepteur à la transferrine notamment). L'intérêt envers les exosomes s'est toutefois intensifié avec la mise en évidence que les exosomes sécrétés par les lymphocytes B (transformés par l'EBV) étaient capables d'induire l'activation des lymphocytes T CD4+ reconnaissant de façon spécifique les complexes CMH II-peptide présents sur les exosomes (Raposo et al., 1996). La démonstration du rôle des exosomes produits par des cellules dendritiques préalablement chargées avec des antigènes tumoraux, dans l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale conduisant à l'inhibition de la croissance des tumeurs *in vivo*, a ensuite permis d'envisager une possible utilisation des exosomes en tant qu'agents thérapeutiques anti-cancéreux (Zitvogel et al., 1998).

A l'heure actuelle, de nombreux rôles ont été attribués aux exosomes produits par différents types cellulaires, principalement suite à des observations *in vitro*, ou à des expériences *in vivo*, réalisées avec des exosomes préalablement purifiés et concentrés à partir de surnageants de culture ou de liquides biologiques. Il a ainsi pu être montré que les exosomes, selon leur origine cellulaire, pouvaient participer, comme nous l'avons dit à l'élimination de molécules et à la présentation antigénique, mais aussi au transfert de membranes, de protéines et d'acides nucléiques, à la dissémination des pathogènes ou de protéines pathogènes (par exemple dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Rajendran et al., 2006) et des maladies à prions (Fevrier et al., 2004)). Les travaux réalisés pendant cette thèse ont porté sur le rôle des exosomes produits par les cellules tumorales *in vivo* dans la croissance des tumeurs et la réponse immunitaire tumorale. Ainsi, dans cette partie, nous allons nous focaliser sur ce qui est connu concernant les rôles joués par les exosomes produits par les cellules tumorales, dans la croissance tumorale. Mais avant de pouvoir avoir une éventuelle action sur les cellules voisines, les exosomes doivent dans un premier temps pouvoir interagir avec celles-ci. Nous allons donc commencer par traiter des mécanismes d'interaction entre les exosomes et les cellules réceptrices, puis nous présenterons des rôles pro- ou anti-tumoraux des exosomes, dépendants ou non du système immunitaire.

a) Mécanismes d'interaction des exosomes avec les cellules voisines

De par les molécules qu'ils présentent à leur surface, les exosomes peuvent interagir avec les cellules voisines, de différentes façons et via différents récepteurs cellulaires. Cette interaction peut ensuite induire une voie de signalisation intracellulaire, conduire à la fusion des exosomes avec la membrane plasmique, ou encore aboutir à l'internalisation des exosomes par endocytose, suivie d'une fusion avec le compartiment endosomal. Dans ces deux derniers cas, les protéines et acides nucléiques contenus dans la lumière des exosomes seront libérés dans le cytoplasme de la cellule où ils pourront éventuellement modifier ses propriétés. Suivre le devenir des exosomes après leur sécrétion reste un but très difficile à atteindre du fait de leur taille si petite qu'elle se trouve dans la limite de résolution (< 150 nm) des microscopes à fluorescence, ne permettant pas de les visualiser avec ces appareils. Seules les techniques de microscopie électronique permettent une visualisation fiable des

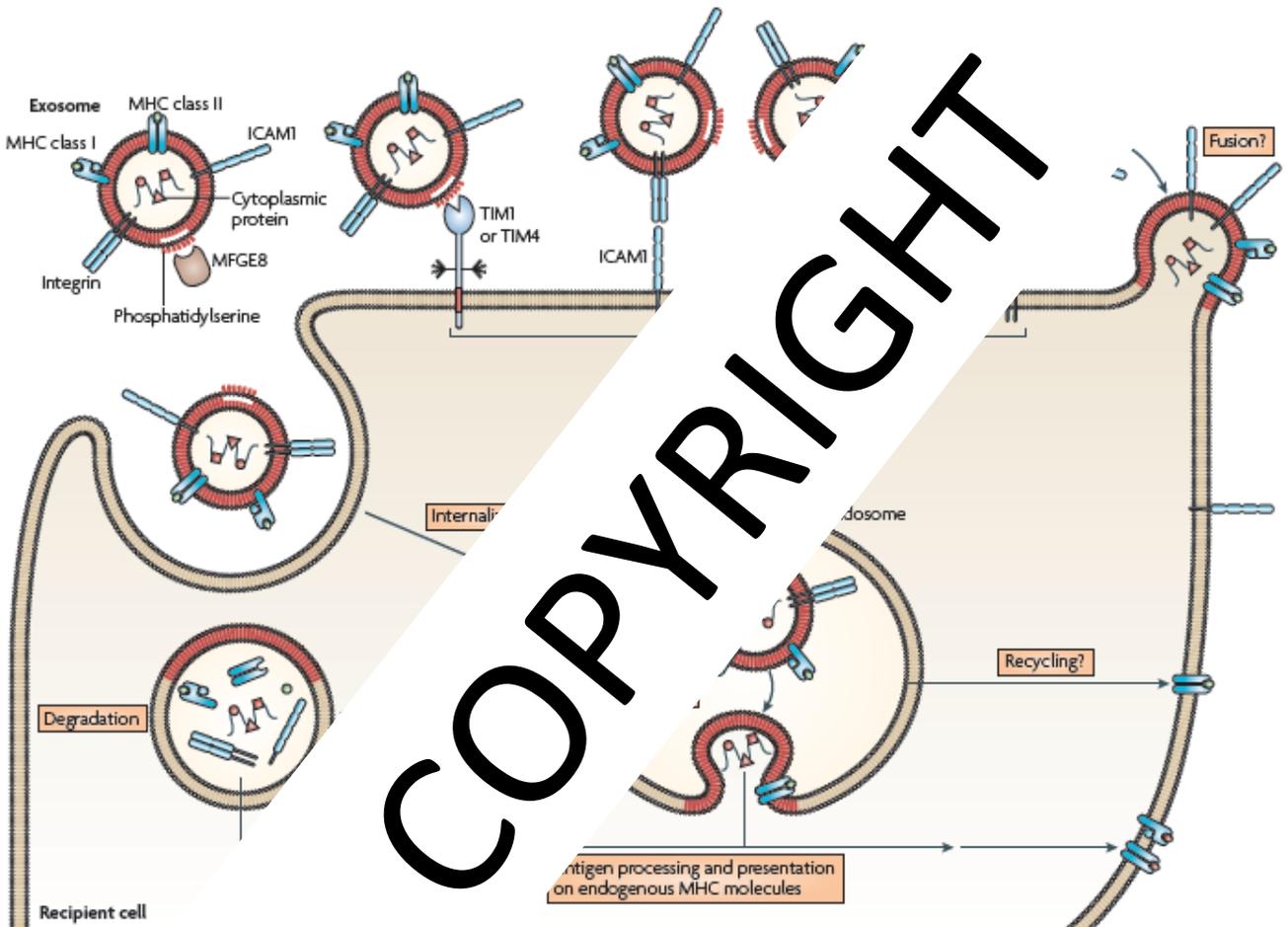


Figure 1.17 : Mécanismes d'interaction entre les exosomes et une cellule réceptrice.

Les exosomes peuvent interagir de différentes façons avec les cellules réceptrices. La phosphatidylsérine des exosomes peut être reconnue par les récepteurs TIM1 et TIM4 sur les LT, ou par la protéine soluble Mfge8. Cette dernière peut ensuite interagir directement avec les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ à la surface cellulaire. Il a aussi été montré que les exosomes portent à leur surface des intégrines reconnues par la molécule ICAM-1 sur les fibroblastes activés. Les exosomes de DCs peuvent eux-mêmes exposer ICAM-1 à leur surface et interagir avec des cellules exprimant LFA1 (DCs et LT activés). Les exosomes peuvent ensuite rester à la surface des cellules ou fusionner avec la membrane plasmique permettant le transfert de leur contenu dans le cytoplasme de la cellulaire. Ils peuvent aussi être phagocytés puis éventuellement fusionner avec la membrane du phagosome.

Théry, C. Ostrowski, M. and Segura, E. Nat Rev Imm 2010

exosomes, mais elles sont plus compliquées à mettre en place dans ce cadre d'expériences. La plupart du temps, des colorants lipophiles fluorescents qui se concentrent dans les exosomes sont utilisées afin de visualiser les cellules avec lesquelles ils interagissent.

Diverses méthodes d'études *in vitro*, notamment l'utilisation d'anticorps bloquants, ont toutefois permis d'identifier des molécules importantes pour l'interaction entre les exosomes et les cellules cibles (**figure 1.17**). Une première étude a ainsi montré que le blocage simultané de CD51 (intégrine α_v) et de CD61 (intégrine β_3) réduisait la prise en charge des exosomes de DCs par les DCs murines d'environ 30% (Morelli et al., 2004). En revanche, le blocage d'autres protéines comme CD9, CD81 et CD11a ne diminue la prise en charge des exosomes par les DCs que de 5 à 10%. La molécule d'adhésion ICAM-1 présente sur les exosomes de DCs permet leur interaction via le récepteur LFA-1 (leucocyte function associated antigen-1) avec les cellules dendritiques CD8+(Segura et al., 2007), mais aussi avec les lymphocytes T activés (Nolte-t Hoen et al., 2009). Il a d'autre part été montré que les exosomes de LB présentent à leur surface des intégrines (β_1 et β_2) fonctionnelles qui permettent l'adhérence de ces vésicules sur la matrice extracellulaire (collagène de type I et fibronectine) (Clayton et al., 2004; Rieu et al., 2000). Ces intégrines permettent aussi l'interaction avec les fibroblastes activés par le TNF- α , de façon dépendante de l'expression de ICAM-I sur ces derniers (Clayton et al., 2004). Comme nous le disions précédemment, les exosomes exposent à leur surface la phosphatidylsérine (PS), ce qui leur permet d'interagir avec des cellules exprimant des récepteurs à la PS comme le récepteur TIM-1 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein 1) exprimé par les LT activés et TIM-4 exprimé par les macrophages. Les exosomes sont ainsi recrutés à la surface des cellules exprimant Tim1 et Tim4, et il semblent même qu'ils pourraient servir de lien entre les deux types cellulaires, c'est à dire entre les LT activés et les macrophages (Miyanishi et al., 2007). D'autre part, la protéine Mfge8 (milk fat globule epidermal growth factor (EGF) factor 8), qui est trouvée enrichie dans les exosomes, est capable d'interagir avec la PS à la surface des vésicules extracellulaires. Via un autre domaine, la protéine Mfge8 entre en contact avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, ce qui fait d'ailleurs de Mfge8 un acteur essentiel dans la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires (Hanayama et al., 2002). Ainsi, un mécanisme semblable à celui observé pour les corps apoptotiques pourrait permettre

l'interaction entre les exosomes, la protéine Mfge8 et les cellules exprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. Cependant, un tel rôle de Mfge8 n'a pu être mis en évidence puisque les exosomes produits par des cellules dendritiques provenant de souris *Mfge8*^{-/-} sont toujours capables d'interagir avec d'autres cellules dendritiques et de leur transférer des antigènes, aboutissant à l'activation de lymphocytes T spécifiques (Segura et al., 2005; Veron et al., 2005). D'autres couples récepteur/ligand sont donc probablement impliqués ici.

L'interaction des exosomes avec les cellules réceptrices permet : (1) la transduction d'un signal intracellulaire via le récepteur impliqué dans l'interaction (2) la fusion des exosomes avec la membrane plasmique, ou (3) l'endocytose des exosomes éventuellement suivie de la fusion dans les compartiments d'endocytose. La fusion des exosomes avec la cellule cible a été suggérée le transfert d'ARNm ou miRNA exosomaux dans le cytoplasme des cellules interagissant avec les exosomes (Montecalvo et al., 2012; Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007). Le marquage des exosomes avec des colorants lipophiles fluorescents a été utilisé dans de nombreuses études afin de montrer la capture des exosomes par les cellules. Dans l'une de ces études, après avoir en effet constaté la localisation des exosomes dans divers compartiments intracellulaires (endosomes précoces et lysosomes), les auteurs ont cherché à savoir si les exosomes fusionnaient ou non avec ces compartiments. Pour cela, les exosomes ont été marqués avec la molécule R18 (octadecyl rhodamine B chloride), qui a pour propriété d'éteindre sa propre fluorescence. Ainsi, lorsqu'elle est concentrée comme c'est le cas dans les exosomes, aucune fluorescence n'est détectée. En revanche s'il y a fusion avec une autre membrane, la diffusion de la molécule dans la membrane receveuse permettra l'émission de fluorescence. Par cette méthode, les auteurs ont mis en évidence la fusion entre les exosomes et les compartiments de la voie d'endocytose. D'autre part, cette fusion se fait plus efficacement dans des conditions de pH acide qui correspondent au pH dans le microenvironnement tumoral (Parolini et al., 2009). Une étude plus récente a d'une part confirmé le transfert du contenu des exosomes dans une cellule dendritique réceptrice, et d'autre part l'existence d'un phénomène d'endocytose des exosomes et de fusion de ces vésicules avec une membrane de la cellule (Montecalvo et al., 2012). Le transfert du contenu de la lumière des exosomes a été montré par : (1) incubation d'exosomes contenant la luciférine (substrat de la luciférase) avec des DCs exprimant la luciférase : la détection d'une émission de lumière qui augmente au cours du temps

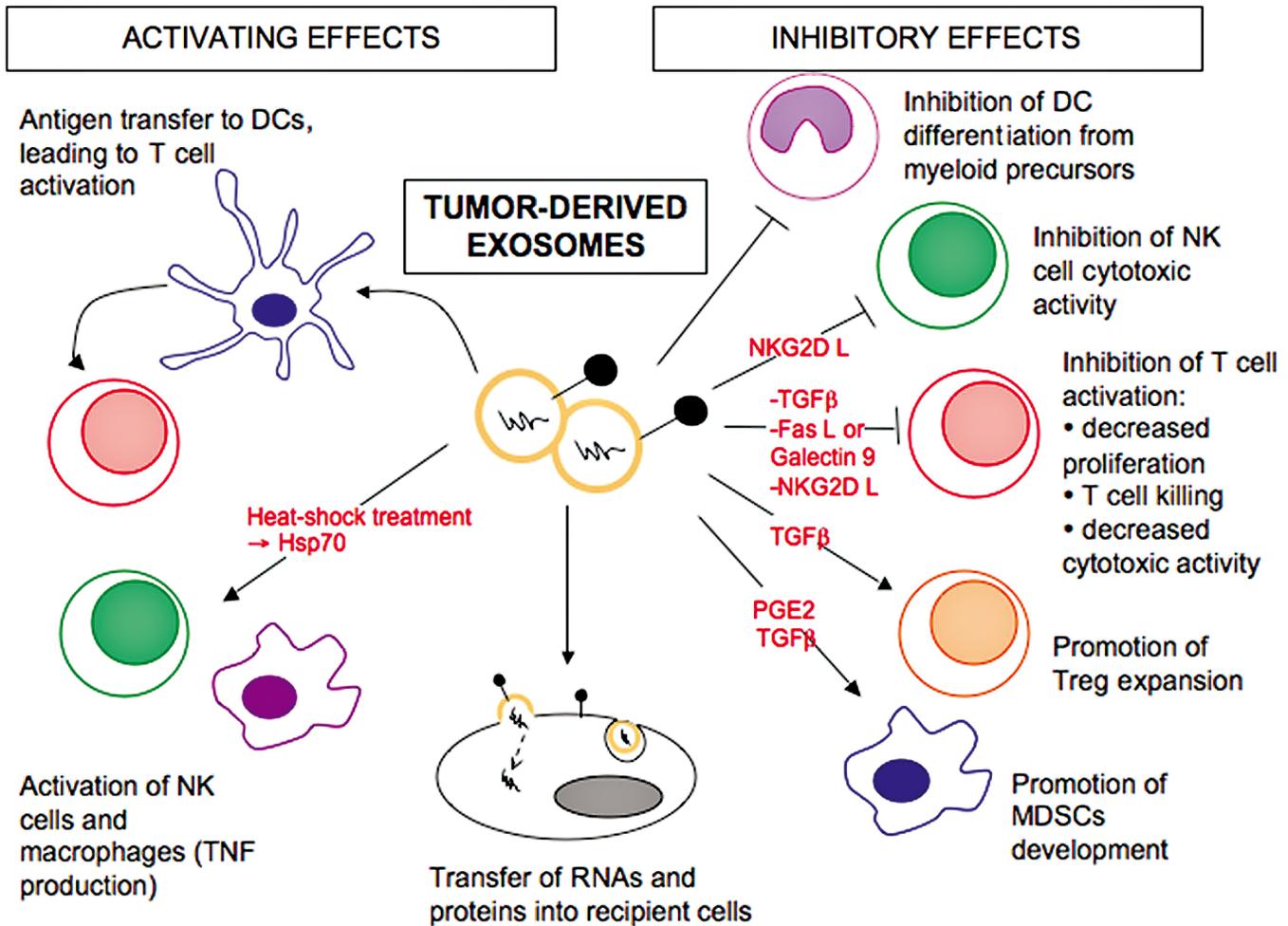


Figure 1.18 : Les effets activateurs et inhibiteurs des exosomes tumoraux sur les cellules du système immunitaire.

Les fonctions des exosomes tumoraux produits et purifiés *in vitro* sur l'activité des cellules immunitaires *in vitro* et *in vivo* ont été étudiées par de nombreux groupes. Sur la partie gauche du schéma sont représentées les fonctions pro-tumorales par activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. A droite du schéma se trouvent les fonctions pro-tumorales attribuées aux exosomes, par inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale et promotion d'un environnement immunosuppresseur et inflammatoire. Enfin, comme cela est représenté en bas du schéma, les vésicules (pas de démonstration directe que ce soit des exosomes) peuvent transférer des ARN et des protéines oncogènes aux cellules tumorales ou aux autres cellules de l'environnement.

Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G. and Théry, C. *Traffic Review* 2011

montre que la luciférine présente dans la lumière des exosomes est oxydée par la luciférase présente dans le cytosol des DCs. (2) incubation d'exosomes contenant les miRNA miR-451 et miR-148a avec les cellules de la lignée DC2.4 (qui ne possèdent pas ces miRNA) contenant un plasmide dans lequel se trouvent la séquence codant la luciférase et trois copies des séquences cibles de miR-451 ou miR-148a : l'expression de la luciférase est éteinte en présence des exosomes. Pour mettre en évidence l'endocytose des exosomes ceux-ci ont été marqués avec la pHrodo, une molécule qui devient fluorescente lorsqu'elle se trouve au pH phagosomal. De la fluorescence est émise par les DCs incubées avec ces exosomes, confirmant la phagocytose des exosomes par les DCs, phénomène qui peut être inhibé à 4° ou avec un inhibiteur du cytosquelette par exemple. Cette internalisation des exosomes est aussi confirmée *in vivo*. Enfin, la fusion des exosomes avec les cellules réceptrices a été mise en évidence, comme dans l'étude précédemment citée, par l'utilisation de la molécule R18. Cette fusion est inhibée à 4°C, n'a pas lieu si les DCs sont préalablement fixées (éliminant l'hypothèse d'un transfert direct des molécules de R18 des exosomes vers les DCs) et requiert la présence de microdomaines riches en cholestérol sur les cellules receveuses.

b) Les fonctions des exosomes tumoraux dans l'immunité tumorale

Diverses études ont étudié l'influence des exosomes produits par les tumeurs sur le système immunitaire et son action dans la croissance tumorale. Pour cela, les exosomes ont été, dans la grande majorité des cas, purifiés et concentrés à partir de lignées cellulaires en culture ou bien à partir d'ascites de patients atteints d'un cancer. Nous allons voir que selon leurs propriétés, et principalement selon leur composition protéique, les exosomes peuvent influencer la réponse immunitaire vers un rôle anti- ou pro-tumoral (**figure 1.18**) (Bobrie et al., 2011). Ils peuvent aussi moduler le microenvironnement tumoral de façon indépendante du système immunitaire.

(1) Rôles anti-tumoraux des exosomes par activation du système immunitaire

La principale caractéristique des exosomes de cellules tumorales qui leur permet d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale est la présence d'antigènes tumoraux dans les exosomes.

- Les cellules tumorales murines et humaines en culture produisent des exosomes qui portent des antigènes tumoraux. Ces exosomes, lorsqu'ils sont utilisés pour vacciner des souris de façon préventive, avant injection des cellules tumorales, protègent les souris du développement d'une tumeur plus efficacement que la vaccination par des cellules irradiées ou des lysats tumoraux. De plus, l'injection de cellules dendritiques traitées *ex vivo* avec les exosomes de la tumeur permet un ralentissement significatif de la croissance tumorale, via une réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T (Wolfers et al., 2001). Un transfert des antigènes tumoraux contenus dans les exosomes vers les cellules dendritiques semble ainsi permettre l'induction d'une réponse lymphocytaire T anti-tumorale. Ce résultat a été confirmé ensuite dans cette même étude avec un modèle humain *in vitro* : les exosomes de mélanomes, contenant l'antigène Mart-1/MelanA sont capables de transférer ces antigènes aux cellules dendritiques qui activent ensuite les lymphocytes T spécifiques.
- Les exosomes tumoraux produits chez des patients atteints d'un cancer et purifiés à partir d'ascites, présentent les mêmes propriétés. En effet, les exosomes présents chez les patients atteints d'un mélanome contiennent les antigènes TRP, gp 100 et Mart-1, alors que les exosomes provenant de patientes avec un cancer de l'ovaire ou du sein contiennent l'antigène Her2/Neu. Les exosomes d'ascites sont capables, en présence de cellules dendritiques, d'induire l'activation de clones de lymphocytes T spécifiques, mais aussi de lymphocytes T CD8+ purifiés du sang des patients *in vitro*. Ces LT présentent une activité cytotoxique envers les cellules tumorales autologues et produisent de l'IFN γ (Andre et al., 2002b).
- Certains traitements permettent de rendre les exosomes tumoraux immunostimulateurs : les exosomes produits par des cellules tumorales ayant subi un stress sont capables d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale. Par exemple, suite à un choc thermique, les cellules tumorales expriment à leur surface la protéine chaperonne Hsp70 (Vega et al., 2008). Les exosomes produits reflètent le niveau d'expression de Hsp70 par les cellules tumorales (Gastpar et al., 2005). Une expression plus importante de Hsp70 sur les exosomes leur donne la capacité d'activer les cellules NK (Gastpar et al., 2005), les macrophages (Vega et al., 2008), et d'induire plus efficacement la maturation des cellules dendritiques et une réponse T anti-tumorale (Dai et al., 2005). Lorsque ces exosomes enrichis en Hsp70 sont injectés à des souris portant des tumeurs (et en présence de CpG), ils induisent une réponse anti-tumorale de

type Th1 conduisant à un ralentissement de la croissance des tumeurs plus important que des exosomes produits par les mêmes cellules non stressées (Cho et al., 2009). D'autre part, les exosomes sécrétés par des cellules tumorales transfectées avec un vecteur viral contenant le gène de l'IL-18, contiennent cette interleukine et sont capables d'induire *in vitro* une meilleure maturation des cellules dendritiques et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques (Dai et al., 2006).

- Enfin, une étude a été réalisée dans le laboratoire dans le but d'étudier le rôle des exosomes produits *in vivo* par les tumeurs (sans étapes de purification, concentration et injection) et portant un antigène exogène (Zeelenberg et al., 2008). L'antigène utilisé, l'ovalbumine (OVA), était fusionné au domaine C1C2 de la protéine Mfge8 lui permettant de se lier aux phosphatidylsérines et donc aux exosomes et autres vésicules extracellulaires. Ainsi, les vésicules produites par les cellules tumorales exprimant la protéine OVA-C1C2 présentaient l'antigène OVA à leur surface. Ces tumeurs injectées *in vivo* montrent une croissance très ralentie dans des souris immunocompétentes par rapport à des tumeurs n'exprimant pas d'antigène ou sécrétant l'antigène OVA sous forme soluble. De plus, les tumeurs OVA-C1C2 sont rejetées si des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'ovalbumine (OT-I) sont injectés aux souris. Une forte activation et prolifération des OT-I est en effet observée dans les ganglions drainants des souris portant une tumeur sécrétant des vésicules qui présentent l'antigène, mais pas dans les souris portant les tumeurs sécrétant l'antigène sous forme soluble. Dans cette étude, les exosomes de tumeurs pourraient donc être capables d'induire une réponse immunitaire spécifique et efficace contre l'antigène tumoral qu'ils transportent.

(2) Rôles pro-tumoraux des exosomes par modulation du système immunitaire

A l'inverse de ce que nous venons de présenter, divers rôles pro-tumoraux ont été attribués aux exosomes de tumeurs dans différents modèles. Les effets rapportés sont principalement dus au transport de molécules immunosuppressives par les exosomes (**figure 1.18**).

Les exosomes produits par les cellules tumorales peuvent ainsi :

- Inhiber la différenciation des précurseurs myéloïdes en cellules dendritiques capables d'induire une réponse anti-tumorale adaptative (Yu et al., 2007). Les exosomes produits par les cellules du carcinome mammaire murin TS/A, après injection intraveineuse à des souris, sont capturés par les cellules de la moelle osseuse. *In vitro*, ces exosomes

inhibent la différenciation des précurseurs myéloïdes en cellules dendritiques. Ils induisent la production d'IL-6, une cytokine décrite comme pro-tumorale, par les cellules de la moelle osseuse. Cette cytokine est indispensable à l'inhibition de la différenciation des précurseurs myéloïdes en DCs. Ces résultats corrént avec l'observation de l'accumulation d'une population de cellules myéloïdes non différenciées dans la rate des souris injectées avec les exosomes de TS/A. Dans cette même étude, les exosomes de la lignée humaine de cancer du sein MDA-MB-231 inhibent aussi la différenciation des monocytes isolés du sang périphérique en cellules dendritiques.

- Promouvoir le développement des cellules myéloïdes suppressives (Chalmin et al., 2010; Liu et al., 2010b; Valenti et al., 2006; Xiang et al., 2009). Les exosomes produits par des lignées de mélanome ou de cancer du colon humains, inhibent eux aussi la différenciation des monocytes isolés du sang humain en cellules dendritiques. Les cellules générées par ce traitement maintiennent l'expression de CD14 et n'expriment pas ou peu les molécules du CMH de classe II (HLA-DR). De plus ces cellules ont la capacité d'inhiber la prolifération des LT et leur capacité cytotoxique induites par l'engagement du TCR, et ce de façon dépendante du TGF β . Les exosomes purifiés à partir du sang des patients atteints d'un mélanome ont les mêmes propriétés d'induction de cellules suppressives inhibant l'activation des LT spécifiques. D'autre part, des cellules myéloïdes non différenciées, présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles que celles observées *in vitro* circulent dans le sang des patients atteints d'un mélanome, et sont absentes chez les donneurs sains (Valenti et al., 2006). D'autres travaux menés chez la souris ont aussi mis en évidence un rôle des exosomes dans l'induction des MDSCs. Par exemple, l'injection des exosomes purifiés de cellules de carcinomes mammaires en culture à des souris augmente la croissance des tumeurs ainsi que le nombre de cellules CD11b⁺ Gr1⁺ présentes dans la rate de ces souris (Xiang et al., 2009). *In vitro*, les exosomes mis en culture avec des cellules de la moelle osseuse induisent la différenciation de cellules CD11b⁺ Gr1⁺ exprimant l'arginase-1, la cyclooxygénase-2 (cox2) et produisant du VEGF et de l'IL-6. Dans cette étude, la prostaglandine E2 (PGE2) et le TGF β présents dans les exosomes participent à cette induction de cellules myéloïdes suppressives. L'injection d'exosomes de tumeurs induit aussi une augmentation du développement des métastases, en parallèle d'une augmentation de la quantité des MDSCs. L'expression de la protéine MyD88 par les MDSCs est nécessaire à cet accroissement du développement métastatique (Liu et al.,

2010b). Ce rôle de MyD88 a été confirmé par un autre groupe, dont les résultats montrent que la présence de Hsp72 sur les microvésicules et/ou exosomes induit l'activité suppressive des MDSCs, par induction du facteur de transcription STAT3 de façon dépendante de MyD88 (Chalmin et al., 2010).

- Inhiber le pouvoir cytotoxique des cellules NK envers les cellules tumorales (Clayton et al., 2008; Liu et al., 2006). L'incubation des exosomes issus de cellules tumorales humaines en culture ou purifiés de liquide pleural de patients atteints d'un cancer, avec des cellules NK conduit à une diminution de l'expression du récepteur activateur NKG2D par ces cellules (Clayton et al., 2008). La sécrétion de ligands de NKG2D solubles et de TGF β par les cellules tumorales est une façon pour la tumeur de contrer leur reconnaissance par les cellules NK, ainsi que par les LT et cellules NKT, et d'éviter ainsi leur destruction par ces cellules. Les exosomes portent eux aussi des ligands de NKG2D et le TGF β . Si les ligands de NKG2D présents sur les exosomes participent en effet à la diminution d'expression des récepteurs NKG2D, c'est le TGF β qui est l'acteur majoritairement responsable de cet effet. Les lymphocytes NK ainsi modifiés par les exosomes présentent ensuite des défauts d'activation et de capacité cytolytique. L'inhibition de l'activité des cellules NK par les exosomes est aussi mise en évidence *in vivo* après injection d'exosomes de carcinomes mammaires à des souris (Liu et al., 2006). Ces injections ont pour effet d'augmenter la croissance tumorale par inhibition de l'activité des cellules NK due à un défaut de production de la perforine.

- Inhiber l'activation des lymphocytes T. Comme nous venons de le voir, les exosomes contiennent des ligands du récepteur NKG2D et le TGF β , et sont capables d'inhiber l'activité des cellules NK. De la même façon, ces deux molécules sont responsables de la diminution d'expression de NKG2D sur les LT et de la perte de leur activité cytotoxique (Clayton et al., 2008; Clayton and Tabi, 2005). Les exosomes tumoraux peuvent aussi inhiber la réponse lymphocytaire T en induisant leur apoptose par la voie Fas/FasL (Andreola et al., 2002). L'expression du ligand du récepteur de mort Fas (FasL) a été mise en évidence dans le cytoplasme des cellules de mélanome, et plus particulièrement dans les corps multivésiculaires. Les exosomes libérés par ces cellules présentent un FasL bioactif à leur surface, capable d'induire l'apoptose des lymphocytes T activés (qui expriment le récepteur Fas). Dans un modèle de lignée cellulaire de cancer colorectal humain, la présence de FasL mais aussi de TRAIL, un autre ligand de récepteur de mort, est détectée sur les exosomes (Huber et al., 2005). Ces deux ligands sont responsables

de la capacité des exosomes à induire *in vitro* l'apoptose des lymphocytes T humains activés. Des vésicules portant TRAIL et FasL sont aussi détectées dans le sang des patients atteints d'un cancer colorectal et sont capables d'induire l'apoptose des LT activés. Les exosomes purifiés du plasma des patients atteints d'un carcinome nasopharyngé contiennent la galectine 9, une lectine connue pour induire l'apoptose via le récepteur Tim3 exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺ Th1. En effet, *in vitro*, ces exosomes induisent l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ activés de façon dépendante de la galectine 9 et du récepteur Tim3 (Klibi et al., 2009).

- Induire l'expansion des lymphocytes T régulateurs (Clayton et al., 2007). La présence de TGFβ sur les exosomes, en plus de ce que nous avons vu précédemment, est aussi responsable d'une inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et NK en réponse à l'IL-2. Cet effet est dû d'une part à l'inhibition de CD25 sur les LT CD8⁺ (chaîne du récepteur de haute affinité à l'IL-2), mais surtout à l'expansion de la population de LT CD4⁺ FoxP3⁺, c'est à dire des lymphocytes T régulateurs.

(3) Rôles pro-tumoraux des exosomes indépendants du système immunitaire

De par leur composition protéique et en acides nucléiques, les exosomes sont aussi impliqués dans le développement de la tumeur via des modulations non immunologiques du microenvironnement tumoral : prolifération des cellules tumorales, angiogenèse, induction de la migration et promotion de la dissémination métastatique...

- Angiogenèse: Les exosomes produits par des cellules de glioblastomes de patients contiennent de nombreux facteurs pro-angiogéniques : IL-8, IL-6, angiogénine, VEGF, TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloprotease 1), TIMP-2 qui pourraient agir via des interaction récepteur-ligand pour induire l'angiogenèse (Skog et al., 2008). Par ailleurs, parmi les ARNm présents dans ces mêmes vésicules, nombre d'entre eux sont associés à la migration, au développement métastatique, à l'angiogenèse ou encore à la prolifération cellulaire. L'ajout de ces exosomes sur des cellules endothéliales du système microvasculaire cérébral humain induit leur prolifération et un allongement de la vasculature semblable à ce qui est observé suite à l'ajout de facteurs angiogéniques. Ainsi, les exosomes de glioblastomes promeuvent l'angiogenèse. D'autre part, lorsque les cellules de gliome (lignée U87) sont mises en culture avec les exosomes de glioblastomes primaires, leur prolifération est augmentée. Ainsi, ces exosomes pourraient aussi jouer un rôle de stimulation de la prolifération cellulaire de façon

autocrine. Enfin, une étude plus récente a montré un rôle des exosomes produits par des cellules myéloïdes leucémiques dans la promotion de l'angiogenèse, via un mécanisme dépendant de la signalisation de la voie Src (Mineo et al., 2012).

- Transfert de protéines oncogènes: Chez des patients atteints d'un glioblastome, certaines des cellules tumorales expriment une forme tronquée oncogénique du récepteur à l'EGF : EGFRvIII, ce qui est un marqueur de mauvais pronostic. Cette protéine tronquée est présente sur les exosomes et microvésicules produits par les cellules tumorales exprimant ce récepteur *in vitro* (Al-Nedawi et al., 2008), mais aussi *in vivo* : des exosomes portant le EGFRvIII peuvent être purifiées à partir du plasma des patients (Skog et al., 2008). Il est de plus intéressant de noter qu'il ne sont plus détectés chez un même patient après résection chirurgicale de la tumeur. Au sein d'une même tumeur, les cellules exprimant la forme tronquée de ce récepteur ont un caractère plus agressif puisque les voies en aval du récepteur, et notamment la voie des MAPK et la voie Akt, sont activées en permanence, aboutissant à une prolifération cellulaire plus intense, à la résistance à l'apoptose et à la libération de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF. Les exosomes contenant l'EGFRvIII sont capables de le transférer à des cellules de gliomes n'exprimant pas ce récepteur (Al-Nedawi et al., 2008). Cette transmission est inhibée par la pré-incubation des exosomes avec l'annexine V, qui bloque les interactions via la phosphatidylsérine. Les récepteurs mutés acquis par les cellules de gliome sont actifs puisque les voies des MAPK et Akt sont induites suite à ce transfert. En conséquence, ces cellules ont un phénotype plus agressif : modifications morphologiques, production de VEGF, augmentation de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-x_L, et diminution de l'expression d'un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (dont le rôle est d'inhiber la prolifération cellulaire). Ainsi, les exosomes favorisent la croissance tumorale par le transfert de protéines oncogéniques depuis les cellules les plus agressives, vers les cellules qui ne le sont pas encore. Ces cellules développent alors toutes les capacités des cellules agressives, sans pour autant avoir eu à acquérir la mutation au niveau génétique. Le transfert de protéines est donc possible entre cellules tumorales, et comme nous l'avons précédemment dit, il semble même être favorisé en pH acide. L'environnement tumoral hypoxique et acide est ainsi propice au transfert de protéines et acides nucléique via des vésicules membranaires comme les exosomes (Parolini et al., 2009).

- Dissémination métastatique : Les exosomes de tumeurs peuvent aussi favoriser le développement de métastases. Les lignées BL6-10 et F1 sont des cellules de mélanomes dérivant de la même lignée parentale. BL6-10 est métastatique et caractérisée par le marqueur Met72, alors que F1 n'est pas capable d'induire des métastases après injection intraveineuse et n'exprime pas Met72. Les cellules F1 peuvent capturer les exosomes produits par la lignée BL6-10. Elles acquièrent alors la capacité de devenir métastatiques et Met72 est détecté dans ces cellules. Ceci indique qu'un transfert de matériel via les exosomes peut transmettre à une cellule la possibilité de devenir métastatique (Hao et al., 2006). Dans le microenvironnement tumoral, les exosomes sécrétés *ex vivo* par les cellules de tumeurs mammaires contiennent de la fibronectine, ce qui n'est pas le cas des exosomes issus des cellules tumorales seules *in vitro*. Ces exosomes contenant la fibronectine acquièrent une action pro-tumorale en favorisant l'invasion des cellules tumorales et le développement de métastases (Deng et al., 2012). Enfin, une étude actuellement en cours de publication a mis en évidence le rôle joué par les exosomes produits par des cellules de mélanomes dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Peinado, H., Nature medicine, 2012). Les exosomes tumoraux injectés en intraveineuse vont se localiser dans les organes connus comme étant des sites métastatiques : poumons, moelle osseuse, rate et foie. Dans les poumons, les exosomes augmentent la perméabilité vasculaire et induisent un changement du profil d'expression génique dans le tissu pulmonaire, augmentant l'expression de transcrits en lien avec le remaniement de la matrice extracellulaire et l'inflammation. Les exosomes, injectés à des souris portant une tumeur, augmentent le développement de nodules métastatiques dans les poumons et accélèrent légèrement la croissance tumorale. A l'inverse, la diminution de sécrétion des exosomes par les tumeurs, induite par inhibition de Rab27a, réduit la croissance tumorale et le développement métastatique. De plus, les auteurs montrent que ces exosomes « éduquent » les cellules de la moelle osseuse qui acquièrent des fonctions pro-tumorales et migrent dans la tumeur et les poumons (avant même l'apparition des métastases). Le transfert de la protéine Met fonctionnelle dans les cellules de la moelle osseuse via les exosomes serait à l'origine des effets observés.

D'autres groupes ont mis en évidence le rôle de microvésicules dans l'induction de l'angiogenèse tumorale ou de la promotion du développement métastatique, sans

toutefois faire la distinction entre les exosomes et les autres microvésicules (Lima et al., 2009; Millimaggi et al., 2007).

6/ Les exosomes en clinique

a) Les exosomes comme outils de diagnostic

La présence d'antigènes tumoraux et d'un profil bien particulier d'ARNm et miARN dans les exosomes en font de bons marqueurs du développement de certains cancers. De plus, ils peuvent être purifiés à partir de liquides biologiques facilement accessibles comme le plasma des patients, l'urine ou les effusions tumorales. Il a par exemple été proposé d'utiliser les exosomes du sang des patients, en complément des autres méthodes, pour déterminer l'agressivité des glioblastomes par la présence ou non de EGFRvIII (Skog et al., 2008). Ceci pourrait permettre de suivre l'évolution de cette expression au cours des traitements. L'utilisation des exosomes du sang ou de l'urine comme bio-marqueurs a aussi été proposée pour le diagnostic des cancers du colon (Mathivanan et al., 2010), du cancer de la prostate (Nilsson et al., 2009), le cancer de l'ovaire (Li et al., 2009) et plus récemment du mélanome (Peinado, H. 2012).

b) Les exosomes en immunothérapie

Les exosomes produits par les cellules tumorales peuvent avoir des effets immunostimulateurs, mais comme nous l'avons vu, la plupart d'entre eux agissent sur différents acteurs du système immunitaire ou sur le microenvironnement tumoral afin de promouvoir la croissance tumorale. Le fait que les exosomes soient une source d'antigènes tumoraux (Andre et al., 2002a) est la principale caractéristique qui les rend potentiellement utilisables dans les stratégies de thérapie. D'autre part, comme nous l'avons vu, l'immunogénicité des exosomes peut être augmentée par différentes modifications des cellules tumorales (traitement par choc thermique, expression de cytokines pro-immunes) ou par co-injection avec des adjuvants. Un essai clinique de phase I a été réalisé par traitement autologue de patients atteints d'un cancer colorectal à un stade avancé (stade III ou IV) avec des exosomes purifiés d'ascite (Dai et al., 2008). Ces exosomes présentent des molécules du CMH, des protéines HSP, et l'antigène CEA. Les patients ont reçu quatre injections d'exosomes d'ascite en sous-cutané, en présence

ou non de GM-CSF (20 patients pour chaque groupe). Le traitement a été bien toléré par les patients avec des effets secondaires modérés. Le traitement par les exosomes seuls induisit une réponse LT CD8+ spécifique chez 20% des patients, alors que cette réponse fut promue chez 76,9% des patients traités avec le GM-CSF en plus des exosomes. Aucune réponse clinique ne fut observée chez les patients recevant des injections d'exosomes uniquement. Parmi les patients traités avec les exosomes et le GM-CSF, une personne présenta une stabilisation de sa maladie, et une autre une légère réponse.

Auparavant, deux essais cliniques de phase I avaient été réalisés à partir d'exosomes cette fois-ci issus de cellules dendritiques. Les patients enrôlés étaient atteints d'un mélanome (Escudier et al., 2005) ou d'un cancer du poumon non à petites cellules (Morse et al., 2005), exprimant l'antigène MAGE (melanoma-associated antigen). Dans l'essai réalisé avec des patients souffrant de mélanomes, quelques réponses cliniques ont pu être observés chez des patients n'ayant répondu à aucun traitement auparavant (trois réponses sur six patients). Ceci ne put être associé à une activation des LT CD8 spécifiques, en revanche, après immunisation par les exosomes plus de la moitié des patients présentent une augmentation de l'activation des cellules NK. Dans le second essai avec les patients atteints d'un cancer du poumon, trois réponses cliniques ont pu être observées sur les neuf patients traités. De nouveau, peu de cas d'activation du système immunitaire furent observées après le traitement par les exosomes : l'activation des LT CD8+ spécifiques a été mesurée chez un patient, et deux patients présentèrent une plus forte activation des cellules NK. Cependant, le pourcentage des LT régulateurs parmi les LT CD4+ est aussi augmenté, et elle pourrait être la cause de l'absence d'activation des LT CD8+. Ces essais ont permis de mettre en évidence la faisabilité des traitements par les exosomes ainsi que leur bonne tolérance par les patients et les résultats sont encourageants. Il est important de noter que les patients de ces études ne forment pas des groupes homogènes : ils sont tous à divers stades avancés, ils présentent des maladies différentes, et ils ont été soumis à différents traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie auparavant. Or, le traitement par les exosomes serait plutôt préconisé comme un traitement visant à prolonger le temps de survie des patients sans progression de leur maladie (après stabilisation par d'autres traitements), et non comme un traitement à utiliser sur des tumeurs résistantes aux thérapies déjà existantes.

Un essai clinique de phase II est actuellement en cours à l'Institut Gustave Roussy (Paris), incluant des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules stabilisés par la chimiothérapie. Ces patients seront traités avec des exosomes de cellules dendritiques traitées à l'IFN γ (exprimant ainsi le récepteur NKG2D et la chaîne α récepteur à l'IL-15) capables d'induire une meilleure activation des cellules NK (Viaud et al., 2009). En même temps, les patients recevront un traitement afin d'inhiber les LT régulateurs.

Une autre méthode envisagée pour l'immunothérapie par les vésicules (et non plus seulement les exosomes) est l'induction de la sécrétion de vésicules immunogéniques *in vivo*, par vaccination ADN. Dans le laboratoire, l'étude faite avec la construction OVA-C1C2 qui dirige l'antigène sur les vésicules, a montré qu'une vaccination préventive avec l'ADN induisait une protection anti-tumorale plus efficace que les vecteurs codant l'OVA soluble (Zeelenberg et al., 2008). La vaccination ADN peut aussi avoir pour but d'induire la formation de vésicules immunogènes par bourgeonnement de la membrane plasmique, de façon similaire à ce que font les virus à enveloppe à la fin de leur cycle de réplication virale. Ces vésicules sont appelées virus-like particle ou VLP (Bellier et al., 2006). Ces séquences d'ADN sont générées de façon à produire des VLP présentant des épitopes d'intérêt et capables d'induire une réponse immunitaire spécifique après vaccination chez la souris.

Les possibles fonctions des exosomes, sécrétés *in vivo*, ne sont pas connues, puisque les moyens d'inhiber ou d'augmenter spécifiquement leur sécrétion n'existaient pas. Ainsi, toutes les études visant à étudier l'effet des exosomes dans différents contextes ont presque toujours été réalisées avec des exosomes purifiés et concentrés. Les quantités utilisées dans ces études, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, ne miment qu'artificiellement la production qui a réellement lieu *in vivo*. Dans un contexte physiologique, les partenaires cellulaires et solubles sont nombreux et varient au cours du temps, ce qui peut modifier à la fois la quantité des exosomes sécrétés, mais aussi leur composition en protéines, lipides ou acides nucléiques. Afin de trouver des outils permettant d'inhiber la production des exosomes *in vivo*, des criblages ont été réalisés ou sont en cours dans le laboratoire sur des familles de protéines pouvant être impliquées dans la biogenèse et la sécrétion des exosomes : ESCRT, Rab et SNARE. Le criblage réalisé sur les protéines Rab a permis de mettre en évidence l'implication de

RAB27A et de RAB27B dans la sécrétion des exosomes par les cellules humaines HeLa (Ostrowski et al., 2010). Au cours de ma thèse, nous avons donc choisi d'étudier les fonctions des exosomes en affectant leur sécrétion par l'inhibition de l'expression des protéines Rab27a et Rab27b dans des cellules tumorales murines. Dans cette troisième et dernière partie de l'introduction, je vais donc présenter brièvement la famille des protéines Rab, puis plus en détails la sous-famille des protéines Rab27 et leurs fonctions dans la sécrétion de compartiments intracellulaires.

C- LES PROTEINES RAB27

Les cellules sont délimitées par la membrane plasmique, constituée d'une bicouche lipidique, et les cellules eucaryotes sont de plus compartimentées : elles contiennent différents organites possédant chacun des fonctions spécifiques et eux-mêmes délimités par une membrane (bicouche lipidique) ou bien par une enveloppe (double bicouche lipidique). L'une des propriétés de ces membranes et enveloppes est de rendre la cellule ou les organites imperméables au passage d'un certain nombre de composés : seules les substances lipophiles peuvent les traverser, ce qui signifie que les molécules polaires (comme l'eau) et les molécules chargées (comme les ions, protéines et acides nucléiques) ne peuvent pas traverser une bicouche lipidique par diffusion simple. Pour autant, des échanges entre les milieux intracellulaire et extracellulaire sont nécessaires au bon fonctionnement des cellules et des différents organites. Il existe pour cela différents mécanismes permettant aux molécules de traverser les bicouches lipidiques : (1) des complexes protéiques permettent la diffusion (canaux) ou le transport (transporteurs) de composés solubles d'un côté à l'autre d'une membrane, (2) un réseau de vésicules intracellulaires permettant le transport de molécules solubles et transmembranaires entre les différents compartiments de la cellule, et entre la cellule et le milieu extracellulaire. Ces mécanismes permettent ainsi la régulation des échanges dans le temps et de façon indépendante des gradients de diffusion : les échanges se font donc en fonction des besoins de la cellule ou des organites.

Le trafic intracellulaire fait intervenir une voie d'endocytose et une voie d'exocytose (**figure 1.19**). Au cours de la voie d'exocytose, les protéines synthétisées au

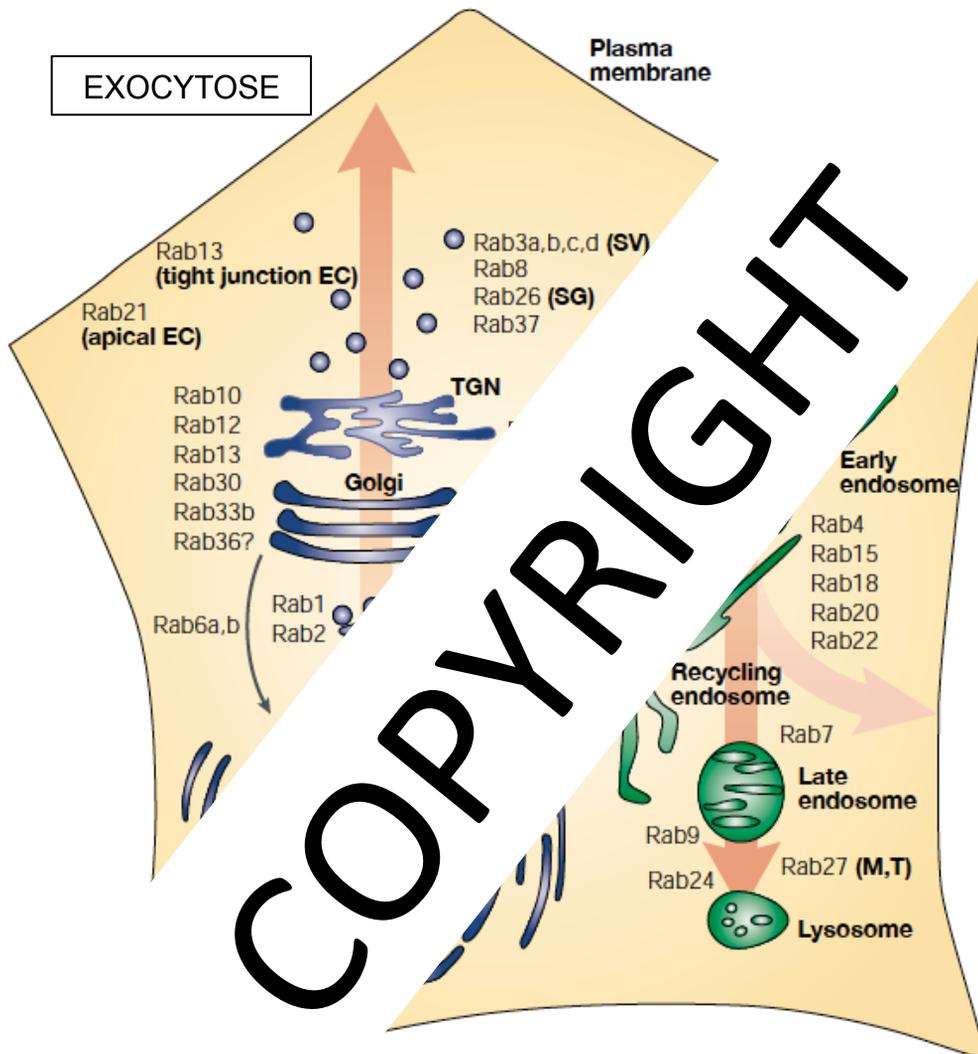


Figure 1.19 : Les grandes voies de trafic intracellulaire vésiculaire, et les protéines Rab associées.

La participation des protéines Rab dans les différentes étapes du trafic intracellulaire sont représentées sur ce schéma. Certaines de ces protéines sont exprimées spécifiquement dans des tissus ou des types cellulaires particuliers.

CCV : clathrin-coated vesicle; CCP : clathrin-coated pit; EC : epithelial cells; ER : endoplasmic reticulum; IC : ER-Golgi intermediate compartment; M : melanosomes; MTOC : microtubule-organizing centre; SG : secretory granules; SV : synaptic vesicles; T : T-cell granules; TGN : trans-golgi network

Zerial, M., McBride, H. 2001 *Nat Rev Molecular Cell Biology*

niveau du réticulum endoplasmique granuleux sont incorporées dans différents types de vésicules (manteau de clathrine, manteaux de coatomères ou absence de manteau) qui auront différentes destinations (membrane plasmique, organites, lysosomes). Ces vésicules se déplacent dans la cellule le long des microtubules et vont fusionner spécifiquement avec la membrane réceptrice du compartiment dans lequel les protéines cargo doivent être transportées. La sécrétion peut être constitutive ou régulée. La voie d'endocytose débute par une invagination au niveau de la membrane plasmique qui aboutit à la formation d'une vésicule d'endocytose incorporant des molécules solubles et membranaires. Ces vésicules fusionnent ensuite avec des endosomes précoces, puis tardifs. Les corps multivésiculaires et les lysosomes constituent les derniers compartiments de cette voie d'internalisation.

Ce trafic intracellulaire de vésicules est régulé par de nombreuses protéines. Différentes étapes sont critiques : la sélection des protéines cargo, l'assemblage du manteau au moment de la formation de la vésicule, le transport des vésicules, le désassemblage du manteau, l'ancrage puis la fusion spécifique avec le compartiment récepteur. Les petites GTPases Rab sont les protéines qui coordonnent les différentes étapes du trafic intracellulaire vésiculaire (Stenmark, 2009; Zerial and McBride, 2001) (**figure 1.19**), et nous allons les présenter brièvement dans une première partie avant de nous intéresser plus en détails aux protéines Rab27 qui ont été plus particulièrement utilisées au cours de cette thèse.

1/ La famille des protéines Rab

a) Le cycle d'activation des protéines Rab

Les protéines Rab font partie de la grande famille des petites GTPases, dont elles sont quantitativement les protéines majoritaires. Les Rab sont des protéines très conservées chez les eucaryotes, de la levure à l'Homme, ce qui appuie leur importance pour le bon fonctionnement de la cellule. Chez l'Homme, plus de 60 protéines Rab ont été décrites et sont spécifiquement localisées au niveau de différents compartiments intracellulaires d'où elles participent à différentes étapes du trafic intracellulaire.

Les petites GTPases fonctionnent selon des cycles d'activation et d'inactivation (**figure 1.20**), dépendant de leur association au GDP (guanosine diphosphate) ou au GTP (guanosine triphosphate), tout ceci étant contrôlé par différentes protéines régulatrices

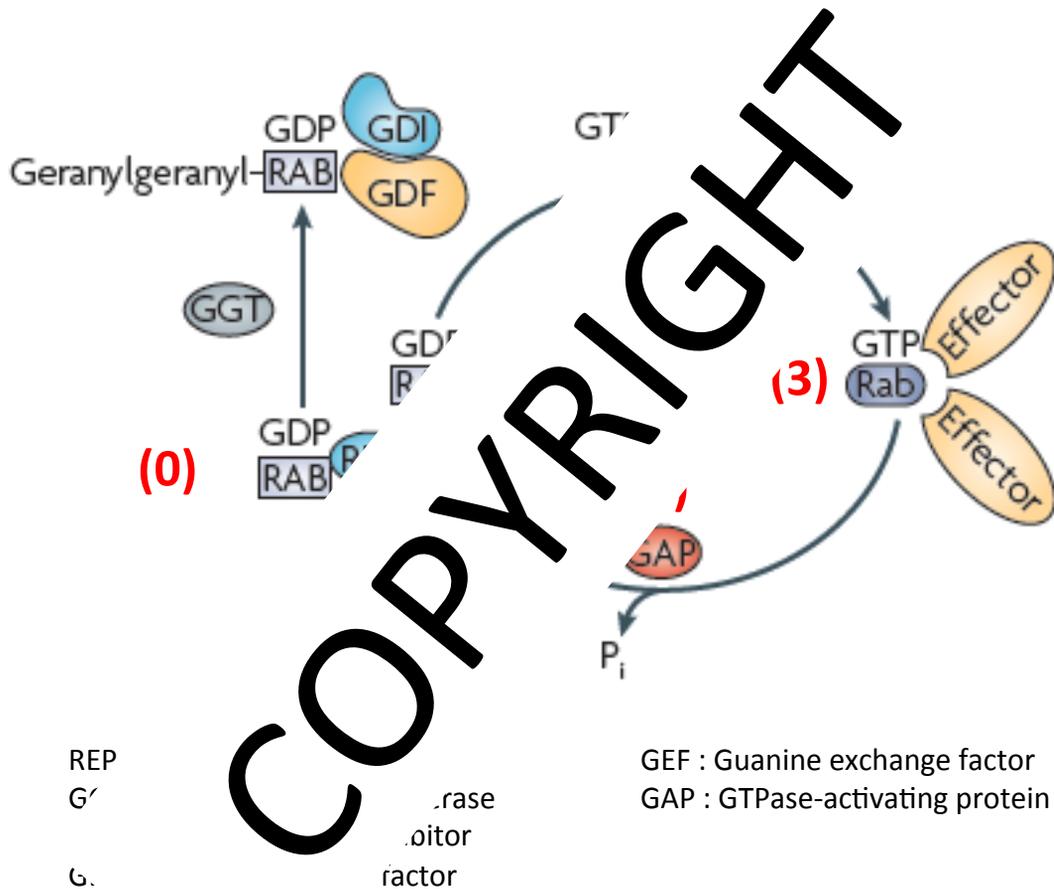


Figure 1.20 : Le cycle d'activation des petites GTPases RAB

(1) La petite GTPase Rab associée au GDP est sous forme inactive. (2) Un facteur d'échange GEF déplace le GDP, ce qui permet au GTP présent dans le cytoplasme de venir se fixer à la petite GTPase qui se trouve alors sous sa forme activée (3). Le passage à la forme activée induit un certains nombres de changements conformationnels qui permettent le recrutement d'effecteurs spécifiques de la protéine Rab. (4) Une protéine activatrice de l'activité GTPase (GAP) induit l'hydrolyse du GTP en GDP par la protéine Rab. Celle-ci retourne dans un état inactivé (1). (0) La protéine Rab nouvellement synthétisée est prise en charge par la protéine chaperonne REP qui présente la GTPase à une GGT. Cette dernière ajoute des groupements géranylgéranyles nécessaires à l'ancrage des Rab aux membranes. Les protéines GDI participent au maintien de la protéine Rab sous une forme inactive, mais aussi à son adressage spécifique au niveau de certains compartiments intracellulaires. En effet, l'interaction des GDI avec les GDF présents sur différents compartiments participerait à la localisation intracellulaire spécifique des protéines Rab.

Stenmark, H. 2009, Nat Rev Molecular Cell Biology

des Rab. Les petites GTPases alternent ainsi entre un état activé lié au GTP ((**3**) sur la figure 1.18) et une forme inactive liée au GDP ((**1**) sur la figure 1.18). L'activation de la petite GTPase (étape (**2**)) est permise par l'échange du GDP par du GTP, étape catalysée par les facteurs d'échange GEF (guanine exchange factors). Plus précisément, les GEF permettent de libérer le GDP de la protéine Rab, et celui-ci est aussitôt remplacé par une molécule de GTP présente dans le cytoplasme. La mise en place de la molécule de GTP induit des modifications conformationnelles de la structure tertiaire de la protéine Rab. Des domaines d'interaction avec des compartiments cellulaires et avec des effecteurs spécifiques sont exposés par les protéines Rab activées. Ce sont ces interactions qui permettront aux Rab d'exercer leurs fonctions. La capacité d'hydrolyse du GTP en GDP, c'est-à-dire l'activité GTPasique des protéines Rab est très faible, et la conversion vers un état inactivé lié au GDP nécessite l'intervention de facteurs protéiques (étape (**4**) sur la figure 1.18). Ces facteurs sont des protéines activatrices de l'activité GTPasique ou GAP (guanine-activating protein). D'autres protéines modulent l'activité des Rab (étape (**0**) sur la figure 1.18). Les protéines GDI (GDP dissociation inhibitor), par exemple, participent au maintien des Rab dans une forme inactive, mais aussi à leur localisation spécifique à la membrane de certains compartiments. Cet adressage des Rab dépend de la géranylgéranoylation de leur domaine carboxy-terminal. Pour cela, les protéines Rab nouvellement synthétisées sont prises en charge par des protéines nommées REP (Rab escort protein) qui ont pour fonction de les présenter à des géranylgéranyltransférases (GGT). Par la suite, les Rab sont accompagnées dans le cytoplasme jusqu'à leur point d'arrivée par les protéines GDI qui jouent alors un rôle de protéine chaperonne. Les facteurs de dissociation des GDI, les GDF (GDI dissociation factor), participeraient à la spécificité d'adressage des Rab vers leur membrane cible en reconnaissant les GDI associées aux Rab. Ce sont ensuite les interactions hydrophobes entre les groupements géranylgéranyles des Rab et les lipides des bicouches lipidiques qui permettent aux protéines Rab de s'associer aux membranes des différents compartiments.

b) Les protéines Rab et l'identité des membranes

Les petites GTPases Rab sont caractérisées par leur localisation spécifique au niveau de compartiments bien précis (**figure 1.21**). Elles servent de marqueurs des différents compartiments intracellulaires, permettant leur reconnaissance par les

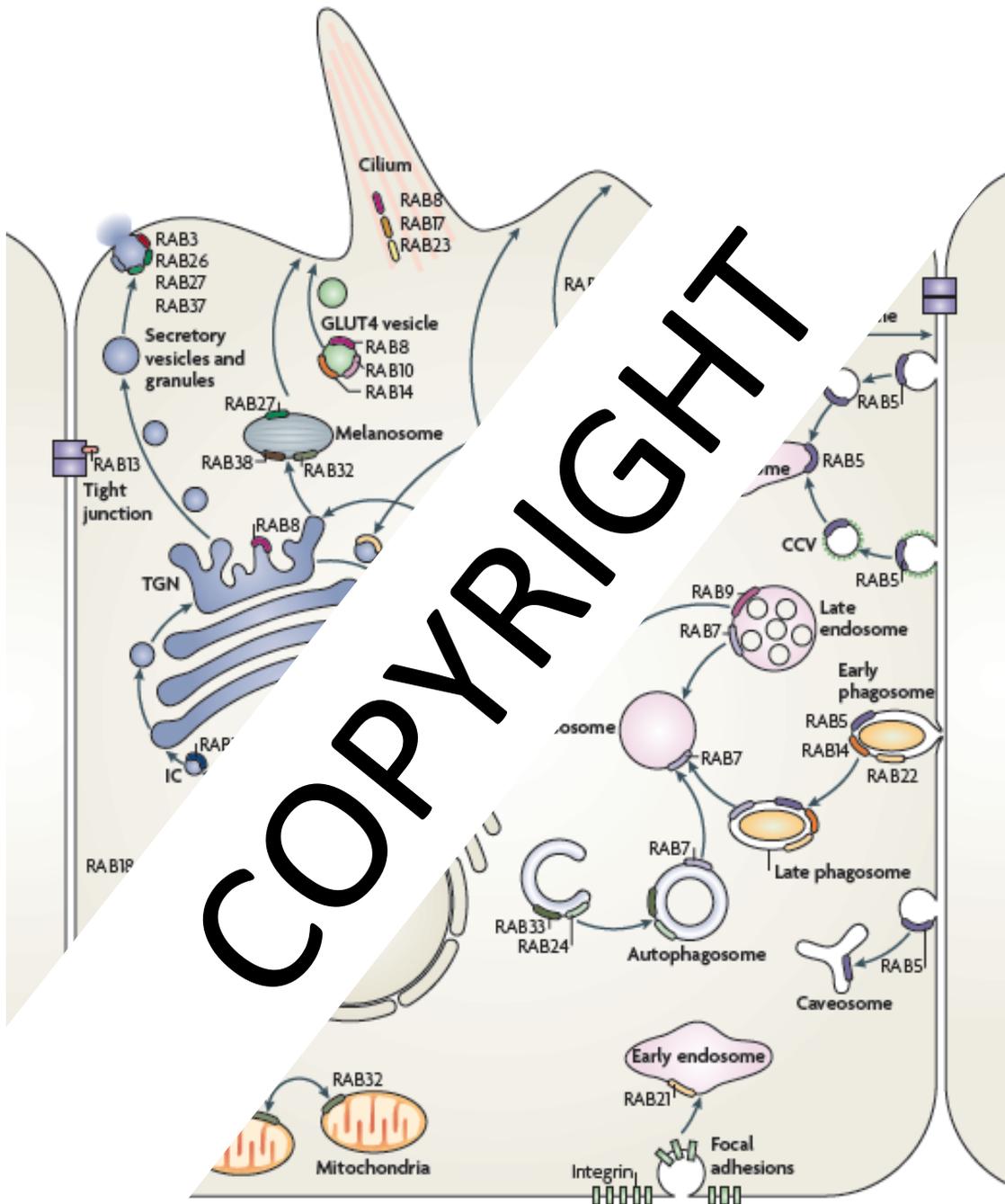


Figure 1.21 : Localisation des protéines Rab au niveau des différents compartiments cellulaires.

Les protéines Rab sont localisées spécifiquement sur certains organites et compartiments intracellulaires. Elles participent ainsi à l'identité des membranes nécessaire pour permettre aux vésicules de transporter leur chargement depuis le compartiment donneur vers le bon compartiment receveur.

Stenmark, H. 2009 Nat Rev Molecular Cell Biology

vésicules de transport. Par exemple, la protéine Rab5 est un marqueur des endosomes précoces, Rab7 et Rab9 des endosomes tardifs, Rab8 est présente au niveau du réseau du transgolgi... Il est intéressant de remarquer que lorsque plusieurs protéines Rab sont présentes au sein d'un même organite, elles sont souvent localisées dans différents microdomaines de la membrane, appelés « domaines Rab » (Sonnichsen et al., 2000). En effet, des études de localisation à l'aide de protéines rab fusionnées à des protéines fluorescentes ont permis d'identifier ce phénomène. Ainsi, dans les endosomes précoces, Rab4, Rab5 et Rab11 sont présentes mais elles ne sont pas localisées dans les mêmes microdomaines de la membrane : les auteurs ont pu observer des domaines contenant Rab5 uniquement, ou Rab4 et Rab5 ou encore Rab4 et Rab11. D'autre part, les Rab spécifient encore plus finement l'identité des compartiments en recrutant différentes protéines (leurs effecteurs) au niveau de leurs microdomaines, mais aussi en contrôlant localement, au sein de la membrane, la concentration en phosphoinositides. Ces lipides participent au recrutement de protéines et complexes protéiques qui sont ainsi des marqueurs supplémentaires définissant l'identité de la membrane qui les contient.

c) Les fonctions des protéines Rab dans le trafic vésiculaire intracellulaire

Les protéines Rab exercent leurs fonctions par le recrutement d'effecteurs spécifiques. Une même protéine Rab peut interagir avec deux effecteurs en même temps et au même moment sur une vésicule, ou bien mobiliser ses effecteurs successivement au cours du temps afin de contrôler le passage entre différentes étapes. Lorsque les protéines Rab sont activées, elles recrutent et activent ces différents effecteurs, participant ainsi à toutes les étapes du trafic intracellulaire : (1) formation des vésicules, incluant la formation du manteau et le recrutement des protéines cargo, (2) transport le long du réseau de microtubule, (3) dissociation du manteau, (4) ancrage à la membrane réceptrice, (5) fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane du compartiment receveur.

De nombreux exemples du rôle des Rab dans les transports intracellulaires pourraient ainsi être détaillés, mais nous allons nous focaliser sur les protéines Rab27 et leurs rôles dans le transport vésiculaire intracellulaire.

2/ Les protéines Rab27

La sous-famille des protéines Rab27 est composée de deux isoformes codées par deux gènes différents: Rab27a et Rab27b, qui présentent 71% de similarités au niveau de leur séquence en acides aminés. Elles sont exprimées dans différents tissus et différentes cellules de l'organisme et elles ont plus particulièrement été détectées dans des types cellulaires spécialisés dans la sécrétion (Gomi et al., 2007; Tolmachova et al., 2004). Différents profils d'expression existent : certaines cellules expriment les deux isoformes, alors que d'autres n'en expriment qu'une seule sur les deux. Les protéines Rab27 participent à la sécrétion de différents compartiments membranaires intracellulaires, aussi bien des vésicules de sécrétion (originaires de l'appareil de Golgi) que des granules d'origine lysosomale. Elles sont principalement impliquées dans les voies de sécrétion régulées plutôt que dans les voies de sécrétion constitutives de ces différents compartiments. Des récents travaux dans le laboratoire ont de plus mis en évidence leur implication dans la sécrétion constitutive des exosomes par des cellules tumorales humaines (Ostrowski et al., 2010). Nous allons dans cette partie commencer par détailler dans quels tissus et types cellulaires les protéines Rab27 sont exprimées, puis nous préciserons dans quelles voies de sécrétion elles sont impliquées. Ensuite, nous détaillerons plus précisément les mécanismes moléculaires par lesquels Rab27a et Rab27b participent à ces voies de sécrétion, lorsque cela est connu. Nous terminerons enfin par le rôle joué par ces deux protéines dans la voie de sécrétion des exosomes.

a) Expression des protéines Rab27 dans les différents types cellulaires

L'expression et la fonction de l'isoforme Rab27a a tout d'abord été mise en évidence dans les mélanocytes et les lymphocytes T par l'étude des patients (puis des souris) porteurs d'une mutation dans le gène *Rab27a*. Ces patients sont atteints du syndrome de Griscelli (GS), une maladie génétique autosomique récessive décrite en 1978 (Griscelli et al., 1978). Ils présentent une hypopigmentation de la peau et des cheveux, due à un défaut de sécrétion des mélanosomes par les mélanocytes (Bahadoran et al., 2001), parfois associée à un syndrome hémophagocytaire (activation incontrôlée des LT et des macrophages) (Klein et al., 1994; Menasche et al., 2000). Il existe trois sous-groupes de patients atteints de ce syndrome, et à chacun de ces groupes correspond une mutation génétique de *Rab27a* ou de l'un de ses effecteurs (direct ou

indirect). La mutation au niveau du gène *Rab27a* est à l'origine du syndrome de Griscelli de type 2 (GS2). Chez ces patients, on observe une susceptibilité accrue aux infections, due à une immunodéficience causée par un défaut de sécrétion des granules cytotoxiques par les lymphocytes T et les cellules NK (Haddad et al., 2001; Menasche et al., 2000). C'est une mutation de la myosine Va qui est impliquée dans le syndrome de Griscelli type 1 (GS1) et une mutation de la mélanophiline dans le syndrome de type 3 (GS3). Ces deux mutations induisent le même phénotype d'albinisme partiel que la mutation de *Rab27a*, mais n'induisent pas de déficits immunitaires. Ainsi, si *Rab27a* semble coopérer avec la myosine V et la mélanophiline dans le transport et la sécrétion des mélanosomes dans les mélanocytes, il semble que cette coopération n'aie pas lieu dans les autres types cellulaires, et notamment dans les cellules du système immunitaire. Il existe un modèle murin avec une mutation naturelle dans le gène codant *Rab27a* : les souris *Ashen* (Wilson et al., 2000) qui présentent, comme les patients atteints du GS2, des défauts de sécrétion des mélanosomes et des granules cytotoxiques. Il existe aussi des souris avec une mutation dans le gène codant la myosine Va : les souris *dilute*. L'isoforme *Rab27b* n'est exprimée ni dans les lymphocytes T ni dans les mélanocytes.

La mise en évidence de l'expression tissulaire de la protéine *Rab27a* a tout d'abord été réalisée chez le rat et la souris par western blot sur les lysats d'organes (Barral et al., 2002; Seabra et al., 1995). Il a ainsi été montré que cette isoforme, en plus d'être fortement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et les mélanocytes, était exprimé dans la rate, l'œil, le pancréas, l'appareil gastro-intestinal, le poumon, mais très faiblement voire pas du tout dans le cœur, les muscles, le cerveau, le foie et les testicules. Quelques années plus tard, la création de souris exprimant *Rab27a* fusionnée à la protéine fluorescente GFP a permis de préciser la distribution de l'expression de cette protéine (Tolmachova et al., 2004). Ainsi, *Rab27a* est exprimée à la surface des granules de sécrétion de nombreuses cellules sécrétrices dans (1) l'appareil gastro-intestinal (cellules sécrétrices de l'estomac, cellules caliciformes, cellules de Paneth), (2) l'appareil respiratoire (cellules de Clara), (3) les glandes exocrines (glandes salivaires, cellules acineuses du pancréas, glandes sébacées) et (4) les glandes endocrines (appareil gastro-intestinal, cellules des îlots de Langerhans du pancréas, glandes surrénales, thyroïde). Cette expression très large de la protéine *Rab27a* dans des cellules spécialisées dans la

sécrétion régulée indique probablement un rôle crucial de cette protéine dans leur fonctionnement, c'est à dire dans les voies de sécrétion.

Concernant Rab27b, aucune maladie liée à une mutation du gène codant cette protéine n'existe chez l'Homme ni chez la souris. Son expression a été mise en évidence dans les cellules endocrines de l'hypophyse (Zhao et al., 2002), les plaquettes (Barral et al., 2002) et mégacaryocytes (Tiwari et al., 2003), l'urothélium (Chen et al., 2003), le pancréas (Chen et al., 2004) et la glande parotide (Imai et al., 2004). Comme pour Rab27a, la localisation subcellulaire est plus précisément observée au niveau de la membrane des vésicules de sécrétion. Un groupe a ensuite étudié la localisation de Rab27b en créant une souris transgénique exprimant le gène *LacZ* et donc la β -galactosidase à la place du gène *Rab27b* et sous le contrôle de son promoteur. Après fixation et coupe des tissus, l'activité de la β -galactosidase est mise en évidence, permettant de visualiser les tissus dans lesquels le promoteur de *Rab27b* est actif. Ainsi, les auteurs confirment l'expression de Rab27b dans le pancréas, la vessie, les mégacaryocytes et les plaquettes. Ils mettent de plus en évidence l'expression de cette protéine dans les yeux, le foie, les poumons, les reins, la rate, l'appareil gastro-intestinal, le pancréas, la peau, la moelle osseuse, l'épididyme, différentes structures du cerveau et la moelle épinière. Au niveau cellulaire, Rab27b est plus précisément exprimée dans les cellules séreuses des glandes salivaires, dans les cellules caliciformes du tube digestif, dans les cellules exocrines du pancréas et dans diverses autres cellules sécrétrices des organes précédemment cités.

En conclusion, Rab27a et Rab27b sont exprimées dans de nombreux types de cellules sécrétrices, et présentes à la surface des vésicules de sécrétion dérivées du golgi, des granules dérivées des lysosomes et des mélanosomes. En plus de leur expression, il a été montré dans certains de ces types cellulaires que Rab27a et/ou Rab27b étaient en effet nécessaires au bon déroulement de la sécrétion de ces compartiments et c'est ce dont nous allons parler à présent.

b) Rôles des protéines Rab27 dans la sécrétion de compartiments vésiculaires

Les protéines Rab27 sont impliquées dans les voies d'exocytose régulées de différents types de granules de sécrétion par différents types cellulaires. Les deux isoformes peuvent avoir des rôles distincts ou redondants.

(1) Rab27a

Les types cellulaires dans lesquels un rôle de Rab27a dans les voies de sécrétion a pu être mis en évidence sont : les mélanocytes, les LT, les neutrophiles, les cellules NK, les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, les cellules neuroendocrines, les mégacaryocytes.

- Rab27a est nécessaire à la sécrétion des mélanosomes par les mélanocytes (Bahadoran et al., 2001) et à la sécrétion des granules cytotoxiques des lymphocytes T (Haddad et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001), comme cela a tout d'abord été mis en évidence chez les patients atteints du syndrome de Griscelli. Rab27b n'est pas exprimée dans les lymphocytes T, ni dans les mélanocytes. Cependant, l'induction d'une expression ubiquitaire de Rab27b dans les souris *Ashen* restaure la pigmentation et la coloration des poils des souris, montrant la possibilité pour ces protéines de jouer des rôles redondants (Barral et al., 2002). Les auteurs n'ont pas observé d'expression du transgène Rab27b dans les lymphocytes T (contrairement aux mélanocytes), ainsi, une éventuelle restauration de leur fonction dans les souris *Ashen* par Rab27b n'a pu être démontrée. Plus récemment, il a aussi été montré que Rab27a est nécessaire à la sécrétion des granules cytotoxiques des cellules NK (Liu et al., 2010a).
- Rab27a participe aussi à la sécrétion des trois types de granules contenus dans les neutrophiles (Herrero-Turrion et al., 2008; Johnson et al., 2010). Rab27b est aussi impliquée dans la sécrétion des granules azurophiles, et joue un rôle non redondant avec Rab27a.
- Rab27a, via son effecteur la granophiline, est impliquée dans la sécrétion régulée de l'insuline par les cellules β des îlots pancréatiques (Yi et al., 2002). La surexpression de Rab27a ou d'un dominant constitutivement activé de cette protéine augmente la sécrétion d'insuline induite par le potassium, sans affecter la sécrétion basale.
- Rab27a et l'effecteur MyRIP/Slac2-c participent à la sécrétion régulée des vésicules à cœur dense contenant des neuropeptides par les cellules neuroendocrines (Desnos et al., 2003; Tsuboi, 2008). Dans ce cas, la surexpression de Rab27a entraîne une diminution et non une augmentation de la sécrétion des neuropeptides. Rab27a joue dans ces cellules un rôle dans la mobilité des vésicules au sein du réseau d'actine sous-cortical, étape précédant l'ancrage de la vésicule à la membrane plasmique.

(2) Rab27b

Rab27b participe aux voies de sécrétion dans différents types cellulaires comme par exemple les plaquettes, les cellules acineuses des glandes parotides et du pancréas, les cellules de l'hypophyse antérieure, ou encore les cellules de l'urothélium.

- Rab27a et Rab27b sont exprimées dans les mégacaryocytes et participent à la formation des pro-plaquettes dans le cytoplasme de ces cellules, par le recrutement de granules nécessaires à leur constitution (Tiwari et al., 2003; Tolmachova et al., 2007). Les souris *gunmetal* (*Rggtq^{gm}*) sont des souris qui possèdent une mutation dans une sous-unité d'une géranylgeranyltransférase dont Rab27a et Rab27b sont des substrats. Ces souris présentent un défaut important de la coagulation, de la maturation des mégacaryocytes et des plaquettes, ainsi que de la sécrétion des granules α par ces cellules. Il a été confirmé par la suite que Rab27a et Rab27b, en plus de leurs rôles dans la formation des plaquettes, étaient bien impliquées dans la sécrétion des granules plaquettaires. En effet, les souris *Rab27b* KO ou *Rab27a* et *Rab27b* double KO (*Rab27a^{ash/ash} Rab27b^{-/-}*) présentent des maladies hémorragiques, avec un défaut d'agrégation plaquettaire, et une réduction de la sécrétion des granules denses (Tolmachova et al., 2007). En revanche, les souris *Ashen* (n'exprimant que Rab27b) ne présentent pas de défaut de la coagulation, ni de la quantité ou de l'aspect des plaquettes et des mégacaryocytes (Barral et al., 2002) indiquant que le rôle de Rab27a peut ici être compensé, probablement par Rab27b. L'étude des différents mutants a permis de mettre en évidence que si les deux isoformes participent à la sécrétion des granules à cœur dense contenant la sérotonine, Rab27b est l'isoforme jouant le rôle majeur dans la formation et la sécrétion de ces granules (Tolmachova et al., 2007).

- L'amylase est une enzyme sécrétée de façon régulée par les cellules acineuses des glandes parotides. Rab27b et l'effecteur MyRIP/Slac2-c sont nécessaires à cette sécrétion induite (Imai et al., 2004).

- Après avoir montré la présence de Rab27b sur les granules de zymogène dans les cellules pancréatiques, des expériences de surexpression d'une forme inactive ou d'une forme constitutivement active de la protéine Rab27b ont montré son implication dans la sécrétion régulée de ces granules de zymogène (contenant de l'amylase) (Chen et al., 2004).

A. Mélanocytes

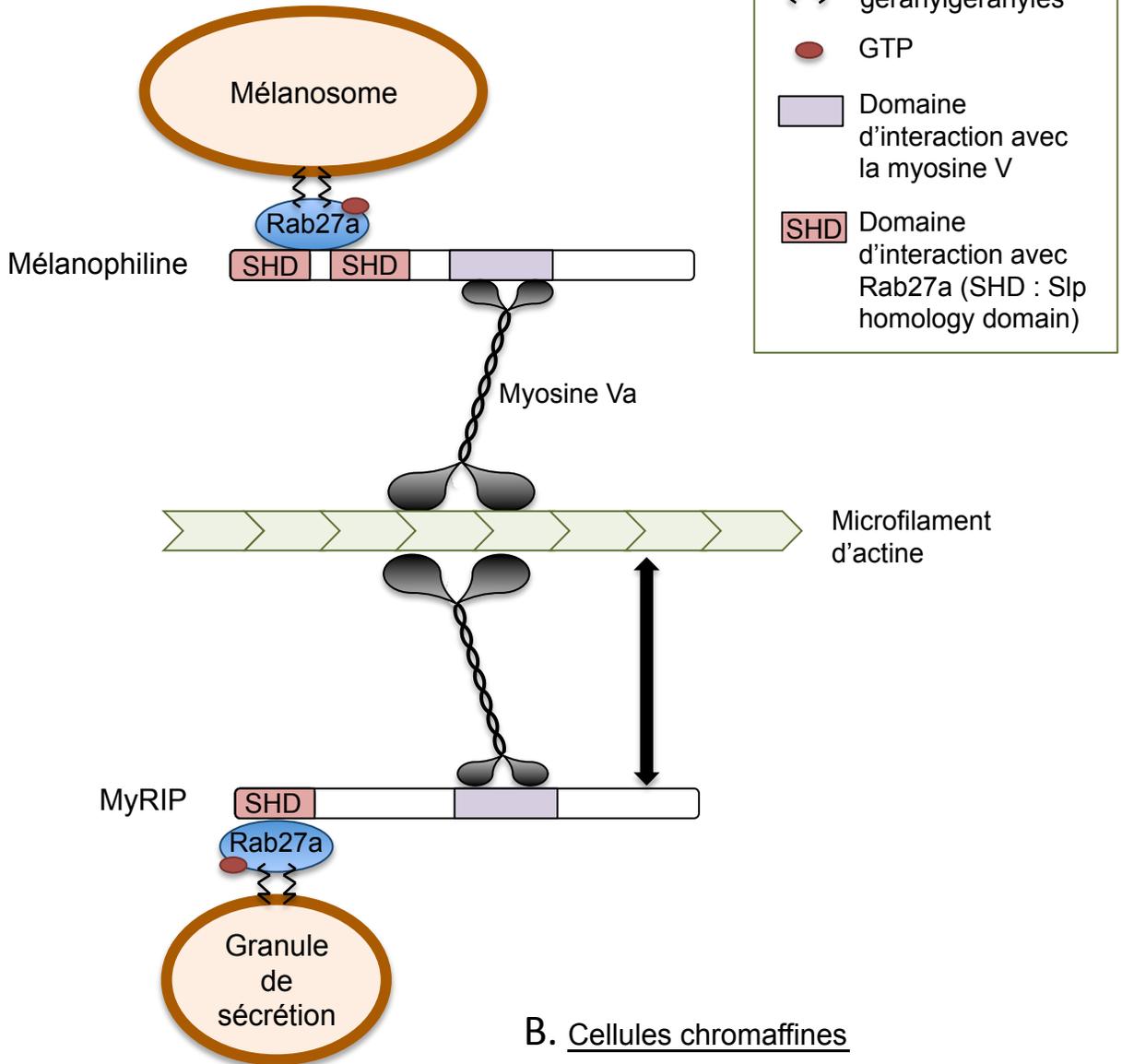


Figure 1.22 : Représentation de l'ancrage des mélanosomes sur les microfilaments d'actine dans les mélanocytes.

A. Rab27a, présent à la surface des mélanosomes, permet d'ancrer ces compartiments sur les microfilaments d'actine, permettant leur transport jusqu'aux sites de fusion avec la membrane plasmique. Pour cela, Rab27a recrute l'un de ses effecteur : la mélanophiline. Celle-ci peut alors interagir avec la myosine-Va, un moteur moléculaire présent sur les microfilaments d'actine. **B.** Dans les cellules chromaffines des glandes médullosurrénales, c'est l'effecteur MyRIP qui est recruté par Rab27a et qui permet l'ancrage des granules de sécrétion sur les microfilaments d'actine, soit directement, soit par interaction avec la myosine Va.

- Dans l'hypophyse antérieure, il existe cinq types de cellules endocrines, qui sécrètent différents neuropeptides et qui expriment différents niveaux de Rab27a et Rab27b. Les cellules sécrétant l'ACTH n'expriment que Rab27b, et cette isoforme participe à la sécrétion des granules contenant l'ACTH. En effet, la surexpression d'une forme inactive de la protéine Rab27b diminue la sécrétion induite d'ACTH par les cellules hypophysaires (Zhao et al., 2002).

c) Rab27 et sécrétion de compartiments vésiculaires : mécanismes moléculaires

Les protéines Rab27 semblent être impliquées plus particulièrement dans deux étapes de la voie d'exocytose des vésicules : le transport des vésicules vers la périphérie cellulaire et l'ancrage à la membrane plasmique avant fusion.

(1) Rab27 et mobilité des vésicules

- Il a été montré que Rab27a participait au déplacement des mélanosomes le long des microfilaments d'actine dans les mélanocytes. Rab27a permet d'une part le transport des mélanosomes à la membrane plasmique et d'autre part la distribution périphérique de ces compartiments dans la zone sous-corticale, sous la membrane plasmique. Pour cela, Rab27a, localisée à la membrane des mélanosomes, interagit avec deux effecteurs : la mélanophiline (Fukuda et al., 2002b; Wu et al., 2002) dans un premier temps, puis la protéine synaptotagmine-like 2 (Slp-2) (Kuroda and Fukuda, 2004). La mélanophiline interagit avec un moteur moléculaire, la myosine Va, permettant le déplacement des mélanosomes le long des microfilaments d'actine, vers la périphérie cellulaire (**figure 1.22**). L'absence de Rab27a, de la mélanophiline ou de la myosine Va cause une accumulation des mélanosomes en périphérie du noyau des mélanocytes, alors qu'ils sont normalement localisés en périphérie de la cellule lorsque ces protéines sont exprimées. Ceci correspond à l'hypopigmentation observée chez les patients atteints d'une des trois formes du syndrome de Griscelli. Rab27a et la mélanophiline permettent donc le transfert des mélanosomes depuis le cytosquelette de microtubules vers le cytosquelette d'actine. L'étude des souris Ashen (*Rab27a* KO), Dilute (*Myosine Va* KO) et Leaden (*melanophilin* KO) a permis d'identifier la séquence chronologique aboutissant à l'interaction indirecte de Rab27a avec l'actine : Rab27a est la première recrutée sur les

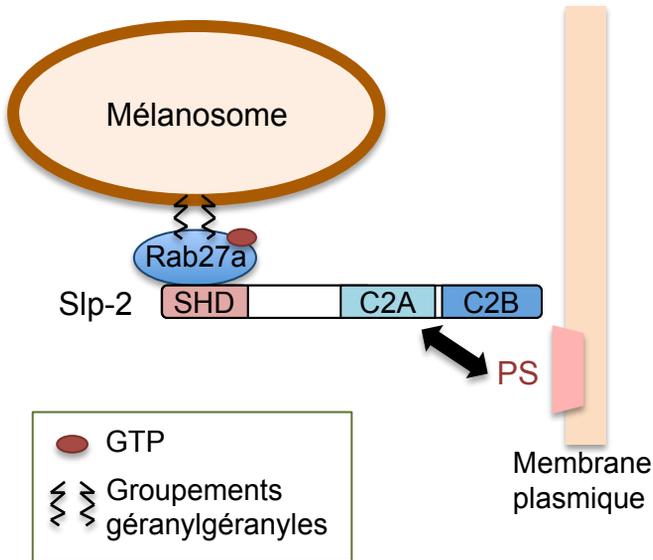
mélanosomes, elle recrute ensuite la mélanophiline, qui va interagir avec la myosine Va, moteur moléculaire localisé sur les microfilaments d'actine (Wu et al., 2002).

- Dans les cellules chromaffines des glandes médullo-surrénales, il a été montré que Rab27a, localisée au niveau des granules de sécrétion, était impliquée dans le recrutement de ces granules sur le cytosquelette sous-cortical d'actine via l'effecteur MyRIP (Desnos et al., 2003). MyRIP est capable d'interagir avec l'actine directement et aussi indirectement en recrutant la myosine Va. Les surexpressions de Rab27a ou de MyRIP, ou encore l'expression d'une protéine mutante de Rab27a constitutivement activée entraînent une diminution de la sécrétion régulée des granules de sécrétion. La sécrétion constitutive n'est en revanche pas modifiée. Cette diminution de fusion des granules à la membrane plasmique s'explique par une stabilisation de leur association sur les microfilaments d'actine dans le cortex cellulaire, empêchant les mouvements nécessaires à l'ancrage puis à la fusion au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, Rab27a et MyRIP contrôlent le mouvement des vésicules de sécrétion dans le cortex sous-cortical et ainsi l'accès aux sites d'exocytose. Plus récemment, il a été montré que MyRIP était aussi nécessaire à l'ancrage des granules de sécrétion à la membrane plasmique dans ce même type cellulaire. En effet, l'inhibition d'expression de MyRIP cause une diminution de la fréquence des périodes d'immobilisation des vésicules à la membrane plasmique et aussi une réduction de la durée d'immobilisation, indiquant que MyRIP participe au complexe d'ancrage des vésicules à la membrane plasmique (Huet et al., 2012).

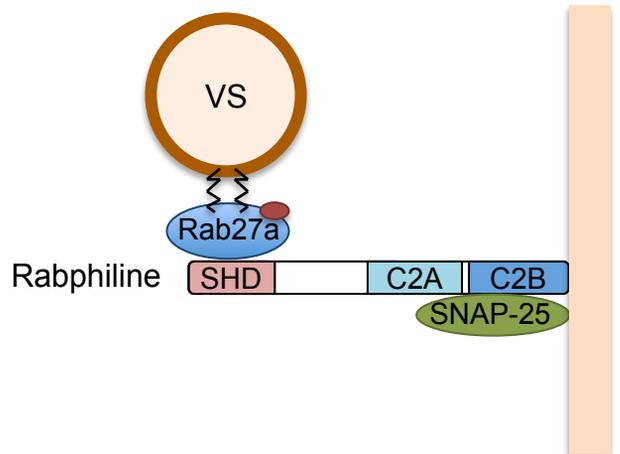
(2) Rab27 et l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique

- Dans les mélanocytes, il a été montré que Rab27a interagissait avec un autre effecteur que la mélanophiline : la protéine synaptotagmine-like 2 (slp2). Une même molécule de Rab27a ne semble pas être associée à la fois à la mélanophiline et à slp2, en revanche les deux types de complexes peuvent être présents sur un même mélanosome. L'inhibition de l'expression de Slp2 n'entraîne pas le même phénotype que l'inhibition de l'expression de la mélanophiline. En effet, les mélanosomes ne s'accumulent pas autour du noyau, ils se répartissent dans l'ensemble du cytoplasme excepté en périphérie de la cellule. Il semble donc que Slp2 participe à la répartition et au maintien en périphérie des mélanosomes dans les mélanocytes. Slp2 possède un domaine

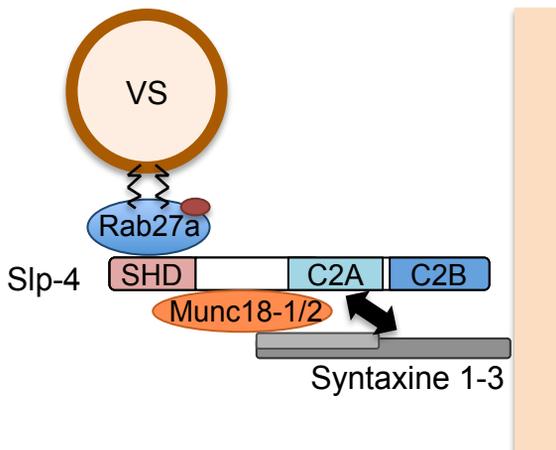
A. Mélanocytes



C. Cellules neuroendocrines



B. Cellules neuroendocrines Cellules β-pancréatiques



D. Lymphocytes T, Neutrophiles, Mastocytes

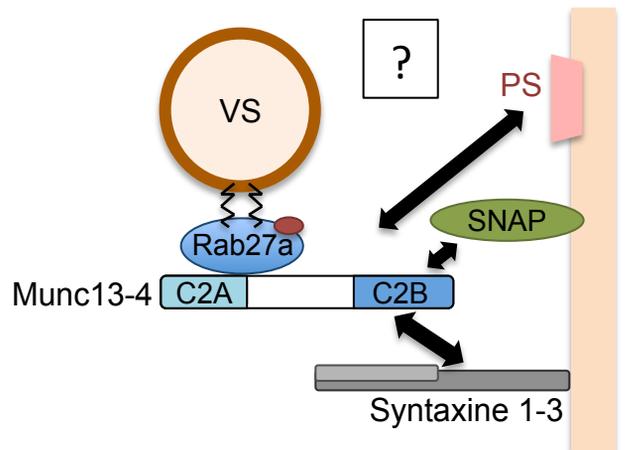


Figure 1.23 : Mécanismes d'ancrage des vésicules à la membrane plasmique par Rab27a et ses effecteurs.

Rab27a, sous sa forme active et donc liée au GTP, participe à l'ancrage des vésicules de sécrétion (VS) à la membrane plasmique dans différents types cellulaires et en faisant intervenir différents effecteurs. **A.** Dans les mélanocytes, l'ancrage des mélanosomes fait intervenir la synaptotagmine-like 2 (Slp2). Celle-ci interagit avec la phosphatidylsérine de la membrane plasmique. **B.** Dans les cellules neuroendocrines et les cellules β-pancréatiques, c'est l'effecteur Slp4 qui est recruté. Cet effecteur interagit avec Munc18, qui lui-même entre en contact avec les syntaxines localisées dans les membranes. **C.** La rabphiline, capable de se lier à SNAP25, participe aussi à l'ancrage des vésicules de sécrétion dans les cellules neuroendocrines. **D.** Enfin, dans les lymphocytes T, les neutrophiles et les mastocytes, l'ancrage des vésicules médié par Rab27a fait intervenir l'effecteur Munc13-4 qui pourrait interagir avec la phosphatidylsérine, les protéines SNAP ou les syntaxines. .

d'interaction avec la phosphatidylsérine qui se trouve sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Ainsi, cet effecteur de Rab27a permet l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique (**figure 1.23 A**), étape précédant la fusion entre les deux compartiments (Kuroda and Fukuda, 2004). Rab27a/b et Slp2 sont aussi impliquées dans l'ancrage des vésicules contenant du mucus à la membrane apicale des cellules gastriques (Saegusa et al., 2006).

- La protéine Slp4, ou granulophiline, est un autre effecteur des protéines Rab27 exprimé notamment dans les cellules neuroendocrines et les cellules β -pancréatiques dans lesquelles sa surexpression augmente la quantité de vésicules « inertes » ancrées à la membrane plasmique (en l'absence de toute stimulation) (Torii et al., 2004; Tsuboi and Fukuda, 2006). Ces vésicules sont dites « inertes » puisque malgré leur ancrage à la membrane, lorsque Slp4 est surexprimée, le nombre et la probabilité des événements d'exocytose de ces compartiments après stimulation sont diminués (Coppola et al., 2002; Fukuda et al., 2002a; Torii et al., 2002; Tsuboi and Fukuda, 2006; Yi et al., 2002). La sécrétion des hormones contenues dans les vésicules à cœur dense par les cellules neuroendocrines et de l'insuline par les cellules β -pancréatiques est alors inhibée. Ces résultats sont confirmés par le fait que les cellules β -pancréatiques déficientes pour l'expression de Slp4 présentent une plus faible quantité de vésicules ancrées à la membrane plasmique et la sécrétion d'insuline après stimulation est augmentée (Gomi et al., 2005). L'ancrage à la membrane plasmique est permis par l'interaction entre Slp4 et la protéine Munc18-1, qui elle-même interagit avec la syntaxine-1a, une protéine transmembranaire impliquée dans la fusion membranaire (**figure 1.23 B**). L'effet de la surexpression de Slp4 sur la sécrétion de l'insuline et des neuropeptides est dépendant de Rab27a. Rab27a participe donc à la fois à la régulation négative (via Slp4) et positive de la sécrétion induite de certains compartiments cellulaires. Enfin, Slp4 est aussi présente sur les granules de sécrétion de l'amylase dans les cellules acineuses de la glande parotide chez le rat. Dans ces cellules Munc18-1 et la syntaxine-1a ne sont pas exprimées, mais Munc18-2 et les syntaxines-2 et 3 le sont, et ces dernières participent à la formation du complexe moléculaire initié par Rab27a et permettant l'ancrage des granules à la membrane plasmique apicale des cellules acineuses (Fukuda et al., 2005).
- Tout comme Slp4, la surexpression de la Rabphiline, elle aussi un effecteur des protéines Rab27, augmente la quantité de vésicules ancrées à la membrane plasmique dans les cellules neuroendocrines, mais contrairement à Slp4, cette surexpression de la

rabphiline augmente la sécrétion d'hormone induite par le chlorure de potassium (Tsuboi and Fukuda, 2005). La rabphiline interagit directement avec la protéine de fusion SNAP25 (synaptosome-associated-protein of 25 kDa) localisée à la membrane plasmique (**figure 1.23 C**) et donc, en plus de participer à la phase d'ancrage, elle permettrait d'initier la fusion des vésicules.

- L'étude en microscopie électronique à transmission de la synapse entre les LT, issus de souris sauvages ou de souris *Ashen*, et des cellules cibles a tout d'abord permis de proposer un rôle de Rab27a dans l'ancrage des granules lytiques à la membrane plasmique : dans les LT n'exprimant pas Rab27a, ces granules ne sont jamais au contact de la membrane plasmique à la synapse avec la cellule cible (Stinchcombe et al., 2001). Rab27a est impliquée dans l'ancrage des granules cytotoxiques dans les lymphocytes T activés via l'effecteur Munc13-4 (Elstak et al.; Menager et al., 2007) (**figure 1.23 D**). Dans une première étude basée sur des analyses en microscopie confocale et en microscopie électronique à transmission, il a été montré que Munc13-4 participe à la formation de compartiments endosomaux spécialisés, nécessaires à la sécrétion des granules cytotoxiques par les LT : de façon indépendante de Rab27a, Munc13-4 assemble les vésicules de recyclage exprimant Rab11 et les endosomes tardifs portant Rab27a, formant ainsi une population de vésicules disponibles pour participer au processus d'exocytose régulée (Menager et al., 2007). Ces compartiments spécialisés sont recrutés au niveau de la zone de contact entre le LT et la cellule cible, tout comme les granules cytotoxiques. Il est supposé que la fusion hétérotypique entre les deux types de vésicules, celles contenant les molécules cytotoxiques et celles contenant la machinerie nécessaire à l'exocytose, aboutirait à l'exocytose du contenu des granules lytiques dans la fente de la synapse immunologique. Les résultats de cette étude suggèrent un second rôle de Munc13-4 dans cette voie d'exocytose, cette fois-ci dépendant de la protéine Rab27a, dans une étape plus tardive du processus et probablement dans la préparation ou l'ancrage des vésicules à la fusion (phase de « priming »). Une étude plus récente a confirmé l'implication du complexe Rab27a-Munc13-4 dans l'ancrage des granules lytiques à la membrane plasmique des lymphocytes T (Elstak et al.). Les auteurs ont pour cela comparé les mouvements de ces compartiments intracellulaires sous la membrane plasmique par microscopie à onde évanescente (total internal reflection fluorescence, TIRF), dans des cellules exprimant la forme sauvage ou deux formes mutées de Munc13-4 incapables d'interagir avec Rab27a.

Lorsque les LT sont activés, les vésicules sont moins mobiles, indiquant l'ancrage de celles-ci à la membrane plasmique, précèdent l'étape de fusion. Cette diminution de mobilité est dépendante de l'interaction entre Munc13-4 et Rab27a, puisqu'elle n'est pas observée dans les cellules exprimant les mutants de Munc13-4 ne pouvant lier Rab27a. Une autre étude réalisée sur les neutrophiles stimulés par le LPS (lipopolysaccharide) présente des résultats similaires quant au rôle de Munc13-4 dans la restriction des mouvements des granules de sécrétion portant Rab27a permettant la fusion des celles-ci avec la membrane plasmique (Johnson et al., 2011). Dans les mastocytes aussi le complexe entre Rab27a et Munc13-4 est nécessaire à la fusion des compartiments sécrétoires dérivés des lysosomes avec la membrane plasmique (Neeft et al., 2005). Munc13-4 possède des domaines d'interaction avec les lipides membranaires, mais aussi avec des protéines associées aux membranes et impliquées dans l'exocytose : les syntaxines et les SNAP. Il est intéressant de noter que les lymphocytes T déficients pour l'expression de Munc13-4 présentent des granules cytotoxiques ancrés normalement (mais qui ne fusionnent pas) à la membrane plasmique contrairement aux LT déficients en Rab27a. Un autre mécanisme d'ancrage semble donc exister dans les LT, et notamment, la Slp2 dont nous avons parlé précédemment pour les mélanocytes, serait un bon candidat (Kuroda and Fukuda, 2004). Munc13-4 n'en reste pas moins nécessaire à la sécrétion des vésicules, en permettant le recrutement des protéines nécessaires à la fusion.

d) Rab27 et la sécrétion des exosomes

Il a été montré récemment dans le laboratoire que RAB27A et RAB27B étaient nécessaires à la sécrétion des exosomes par les cellules tumorales humaines HeLa (Ostrowski et al., 2010). Les cellules utilisées sont plus précisément les cellules HeLa B6H4 qui expriment les molécules du CMH II (montrées comme étant enrichies sur les exosomes), et qui secrètent l'ovalbumine (de poulet) par la voie de sécrétion classique. Le rôle des protéines RAB dans la sécrétion des exosomes a été étudié dans ces cellules à l'aide d'une banque de shRNA (short hairpin RNA) ciblant 59 protéines de la famille RAB. La sécrétion des exosomes et de l'ovalbumine soluble a été mesurée après introduction des shRNA dans les cellules à l'aide d'un vecteur viral. L'inhibition de l'expression des protéines RAB27A et RAB27B induit dans ces cellules une diminution de

la sécrétion des exosomes sans modulation de la sécrétion de l'ovalbumine, indiquant un rôle spécifique de ces deux protéines dans la voie de formation et de libération des exosomes. Cette étude montre de plus que ces deux protéines jouent des rôles non redondant dans la voie de sécrétion des exosomes. L'observation des corps multivésiculaires (CD63+) dans les cellules exprimant les shRNA montre différents phénotypes selon l'isoforme réprimée. Lorsque RAB27A est inhibée, les MVBs sont répartis dans l'ensemble du cytoplasme comme c'est le cas dans les cellules exprimant un shRNA contrôle, mais ils sont significativement plus larges. L'analyse en microscopie électronique à transmission confirme l'élargissement des MVBs, qui sont bien remplis de vésicules intraluminales. Dans le cas des cellules inhibées pour l'expression de RAB27B, les MVBs, qui présentent une taille normale, s'accumulent dans la zone périnucléaire du cytoplasme des cellules. De façon intéressante, RAB27A et RAB27B ne montrent pas la même localisation subcellulaire au sein des cellules HeLa. RAB27A est présente à la membrane des MVBs et est l'isoforme qui leur est majoritairement associée. Si RAB27B peut lui aussi y être détecté, sa localisation principale est dans la zone périnucléaire, au niveau des structures du réseau transgolgien. Par microscopie à onde évanescente, le nombre de MVBs à la membrane plasmique ainsi que la vitesse de leurs déplacements ont pu être mesurés. L'absence de RAB27A ou de RAB27B induit une diminution du nombre de MVBs à proximité de la membrane plasmique, indiquant un rôle de ces deux protéines dans la redistribution de ces compartiments à la périphérie. De plus, l'inhibition de RAB27A et de RAB27B diminue le pourcentage de vésicules ancrées à la membrane plasmique ainsi que la durée de ces interactions. Enfin, l'étude de différents effecteurs semble montrer que Slp4 est un partenaire de RAB27A et Slac2b de RAB27B dans la voie de sécrétion des exosomes. En conclusion de ce travail, il semble que RAB27B soit impliqué dans le transfert des MVBs du réseau de microtubules vers le réseau cortical d'actine et dans l'ancrage de ces compartiments à la membrane plasmique. En revanche, Rab27a pourrait jouer plusieurs rôles qui ne peuvent être discriminés dans cette étude : (1) RAB27A est impliqué dans l'ancrage et la fusion des MVBs à la membrane plasmique, les MVBs élargis seraient alors dus à une fusion des MVBs entre eux (ou avec d'autres compartiments intracellulaires), à défaut de fusionner avec la membrane plasmique (2) RAB27A a pour rôle d'inhiber la fusion des compartiments intracellulaires entre eux, et en son absence, les gros compartiments qui se forment ne peuvent être ancrés correctement à la membrane plasmique.

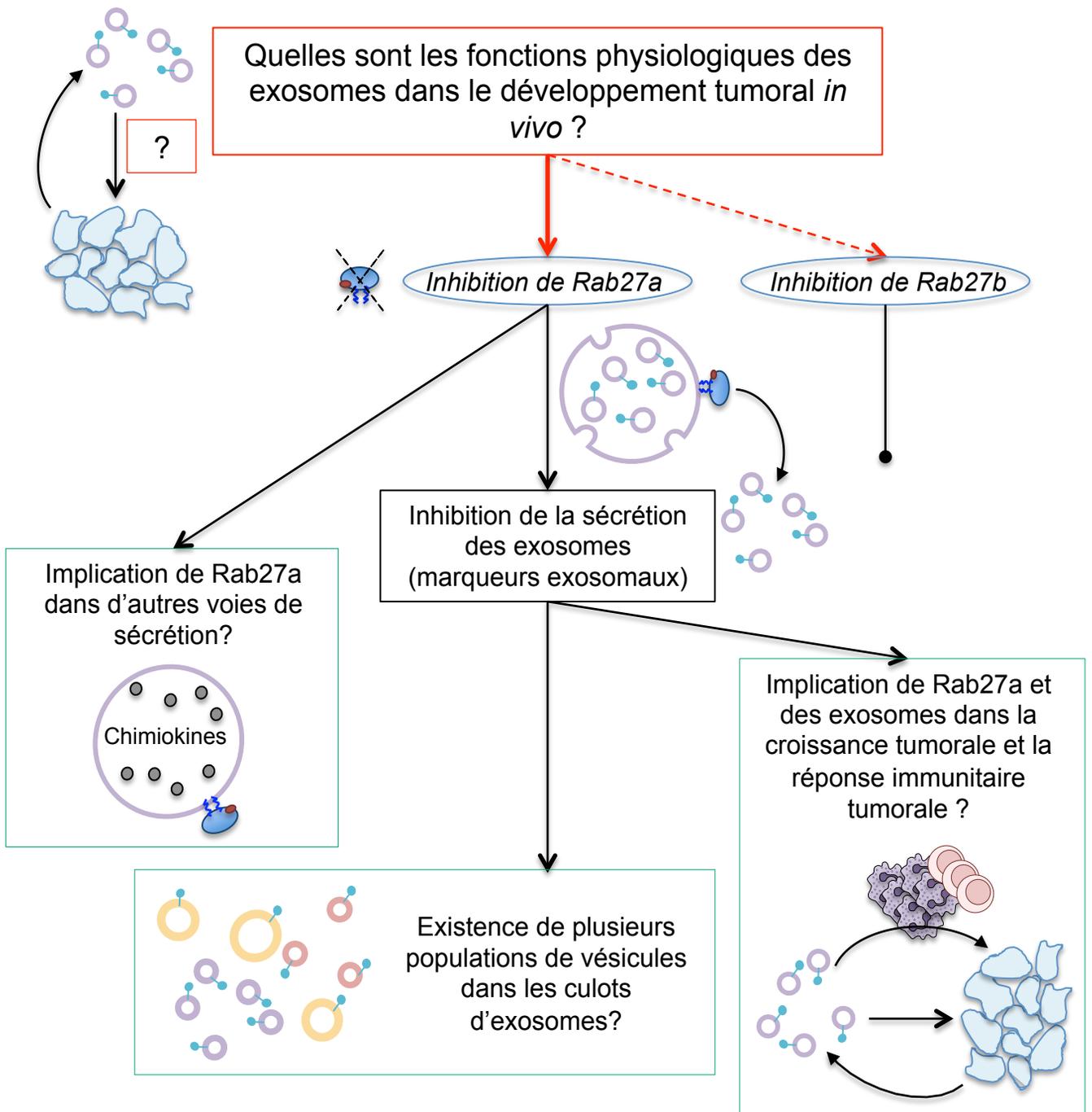


Figure 1.24 : Schéma des questions étudiées au cours de ces travaux de thèse.

La question principale était de savoir quels étaient les fonctions des exosomes produits par les tumeurs *in vivo* dans la croissance et la réponse immunitaire tumorales. Pour cela, nous avons inhibé l'expression de Rab27a et de Rab27b. La sécrétion des exosomes est mesurée par la quantification des marqueurs exosomaux dans les culots d'exosomes. Les résultats obtenus ont confirmé une diminution de la sécrétion des exosomes par l'inhibition de Rab27a, mais pas par l'inhibition de Rab27b. Nous n'avons donc continué nos travaux qu'avec Rab27a. Les quantifications ont aussi révélé des discordances dans le comportement des différents marqueurs, nous conduisant à nous poser la question de l'existence de différentes populations de vésicules dans les culots d'exosomes. Par ailleurs, nous avons étudié l'implication de Rab27a dans d'autres voies de sécrétion que celle des exosomes. Enfin, nous avons étudié le développement des tumeurs n'exprimant pas Rab27a et la réponse immunitaire qu'elles induisent.

D- OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de cette thèse est d'étudier le rôle joué par les exosomes sécrétés *in vivo* par les cellules tumorales, dans la croissance tumorale et plus particulièrement dans la réponse immunitaire tumorale (**Figure 1.24**). Etant donné le rôle spécifique joué par les protéines RAB27 dans la sécrétion des exosomes par les cellules tumorales humaines HeLa-B6H4, nous avons choisi d'inhiber l'expression de Rab27a et Rab27b dans différentes lignées tumorales murines afin d'empêcher la sécrétion des exosomes par ces tumeurs *in vitro* et *in vivo*. Après avoir pu inhiber cette sécrétion d'exosomes, nous avons été amenés à étudier plus particulièrement les populations ou plutôt les sous-populations d'exosomes produites par les cellules contrôles et les cellules n'exprimant pas Rab27. D'autre part, nous avons suivi la croissance de ces tumeurs sécrétant moins d'exosomes en la comparant à la croissance des tumeurs contrôles. Etant donné les rôles de modulation du système immunitaire attribués aux exosomes par de nombreux travaux, nous avons choisi d'étudier la réponse immunitaire systémique et locale afin de déterminer si la présence ou l'absence des exosomes entraînait une modification de la réponse immunitaire induite par la tumeur.

Nous allons présenter les résultats obtenus au cours de ce doctorat en trois parties :

- A- Existence de sous-populations d'exosomes
- B- Les exosomes et la réponse immunitaire tumorale : modèles de carcinomes mammaires murins
- C- Les exosomes et la réponse immunitaire tumorale : résultats annexes dans d'autres modèles tumoraux

II. RESULTATS

A- EXISTENCE DE SOUS-POPULATIONS D'« EXOSOMES » (Article 1)

Résumé

Dans le but d'inhiber la sécrétion des exosomes, nous avons réprimé l'expression de Rab27a dans plusieurs lignées tumorales murines. Ceci nous a amené à étudier une problématique que nous n'avions pas envisagée pour ces travaux de thèse, à savoir : existe-t-il différentes populations d'exosomes ? Nous avons ainsi caractérisé par microscopie électronique à transmission, par western blot et par séparation sur gradient de sucrose les vésicules présentes dans les culots d'exosomes. Au moins deux populations de vésicules sont produites par les cellules et co-centrifugées à 100.000xg. Ces populations peuvent être distinguées par leur taille (30-50 nm versus 50-150 nm), par leur composition protéique (CD9, Mfge8 versus marqueurs endosomaux, CD9 et Mge8) et aussi par leur mode de sécrétion (indépendant de Rab27a versus dépendant de Rab27a).

a) Introduction

Les exosomes sont purifiés à partir de milieu conditionné par des cellules en culture ou de liquides biologiques, selon des protocoles d'ultracentrifugations différentielles (Thery et al., 2006), qui ont été définis à partir des premières études réalisées par les groupes de Stahl et Johnstone (Harding et al., 1984; Johnstone et al., 1987). La purification consiste dans un premier temps à éliminer les cellules mortes (300xg ; 10 min), les corps apoptotiques et débris cellulaires (2000xg, 10 min), ainsi que les plus grosses vésicules aussi appelées « microvésicules » (10.000xg, 30 min). Le surnageant de cette étape de centrifugation à 10.000xg est ultracentrifugé à 100.000xg pendant 70 minutes afin d'obtenir un culot contenant les exosomes ainsi que des protéines co-centrifugées et probablement quelques autres vésicules. Un lavage en PBS suivi d'une dernière ultracentrifugation à 100.000xg pendant 70 minutes permettra d'éliminer en grande partie les protéines contaminantes. Les culots d'exosomes concentrés ainsi obtenus sont caractérisés de différentes façons : (1) étude de leur taille

et éventuellement de certains marqueurs protéiques par microscopie électronique à transmission, (2) étude de plusieurs marqueurs protéiques spécifiquement enrichis ou absents dans les exosomes par western blot, (3) flottation sur gradient de sucrose. Une meilleure purification des exosomes peut d'ailleurs être obtenue en récoltant des fractions de vésicules séparées en fonction de leur densité après flottation sur un gradient de sucrose, ou séparées en fonction de leur taille sur des colonnes chromatographie de filtration sur gel. Cependant, ces techniques ne permettent pas de séparer des populations de vésicules de tailles différentes lorsque celles-ci sont comprises entre 30 et 100 nm, ou d'isoler différentes populations de vésicules qui auraient la même taille, ni des vésicules de densités variables mais proches. Ainsi, lorsque les culots d'exosomes sont analysés en microscopie électronique à transmission, une hétérogénéité dans la taille des vésicules est clairement observée et ce dans plusieurs types cellulaires : LB infectés par le virus EBV (Raposo et al., 1996), cellules dendritiques murines (Thery et al., 1999; Zitvogel et al., 1998), cellules tumorales *in vitro* (Wolfers et al., 2001) ou *in vivo* (effusions tumorales) (Andre et al., 2002b). La recherche de certains marqueurs sur les vésicules du culot d'exosomes séparées sur un gradient de sucrose montre que différentes populations, plus ou moins enrichies dans les différents marqueurs, semblent exister (Escola et al., 1998). Différentes populations de vésicules présentant des tailles, des densités, mais aussi des compositions protéiques variables, composeraient donc les culots d'exosomes.

Nous allons dans cette partie présenter les résultats que nous avons obtenus concernant les différentes populations de vésicules présentes dans les culots d'exosomes, par comparaison des exosomes sécrétés par les cellules 4T1 exprimant ou non la protéine Rab27a.

b) Résultats et discussion

Les protéines Rab27a et Rab27b sont impliquées dans la voie de sécrétion des exosomes par les cellules humaines HeLa (Ostrowski et al., 2010). Dans cette partie de notre étude, nous avons utilisé l'inhibition de l'expression de Rab27a afin d'interférer avec la sécrétion des exosomes par une lignée de cellules tumorales murines, les cellules 4T1. Des lentivirus contenant une séquence codant un shRNA (short-hairpin RNA) ciblant spécifiquement l'ARNm *Rab27a* ont été utilisés pour inhiber l'expression de

Rab27a. Les cellules utilisées comme contrôle sont infectées avec des lentivirus contenant la séquence mélangée du shRNA spécifique de l'ARNm codant la GFP (ainsi, le shRNA formé ne cible aucune protéine murine). Un seul des cinq shRNA que nous avons testés afin d'inhiber l'expression de Rab27a nous a permis d'obtenir, dans les cellules 4T1, une diminution spécifique de la quantité d'ARNm *Rab27a* sans modification de la quantité d'ARNm *Rab27b* (Article 1, figure 1A). L'inhibition de l'expression de Rab27a au niveau de la protéine a pu être confirmée par western blot (Article 1, figure 1B).

Les exosomes sécrétés par les cellules contrôles (4T1-Scr) et les cellules n'exprimant pas Rab27a (4T1-sh27a) sont purifiés par ultracentrifugations différentielles. Les culots obtenus après les centrifugations de 10.000xg (grosses vésicules) et de 100.000xg (exosomes) sont analysés par western blot afin de détecter les différents marqueurs exosomaux (Article 1, figure 2). Comme cela a été décrit dans de nombreuses études, nous confirmons l'enrichissement de CD9, Mfge8, CD63, Tsg101 et moins fortement de Hsc70 dans les exosomes (Article 1, figure 2 et **figure 2.2**). L'inhibition d'expression de Rab27a dans les cellules 4T1 induit une diminution de la sécrétion de vésicules portant quatre de ces marqueurs : CD63, Alix, Hsc70 et Tsg101. Ces résultats corrélerent avec ce qui a été observé dans la lignée cellulaire humaine HeLa. Ces quatre protéines sont classiquement localisées au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires. Les vésicules qu'elles caractérisent semblent donc avoir une origine endosomale, ce qui correspond à la définition des exosomes. En revanche, la quantité des marqueurs CD9 et Mfge8 n'est pas diminuée dans les culots d'exosomes après l'inhibition de Rab27a. Or il faut noter que ces deux marqueurs ne sont pas caractéristiques de la voie d'endocytose comme le sont les précédents marqueurs cités. En effet, Mfge8 est une protéine présente dans le cytoplasme, qui peut être associée à la membrane plasmique ou sécrétée dans le milieu extracellulaire et capable de s'associer aux phosphatidylsérines exposées à la surface des membranes cellulaires ou vésiculaires. L'étude par immunofluorescence de la localisation de CD9 dans les cellules 4T1 montre qu'il est faiblement présent dans les compartiments intracellulaires et est plutôt localisé au sein de domaines spécifiques de la membrane plasmique (Article 1, figure 6). Cette observation s'oppose au marquage très majoritairement intracellulaire de CD63. Ainsi, CD9 et Mfge8 semblent pouvoir s'associer à d'autres vésicules en plus des exosomes, et plus particulièrement à des vésicules qui se formeraient par bourgeonnement de la membrane plasmique. Cette hypothèse est renforcée par le fait

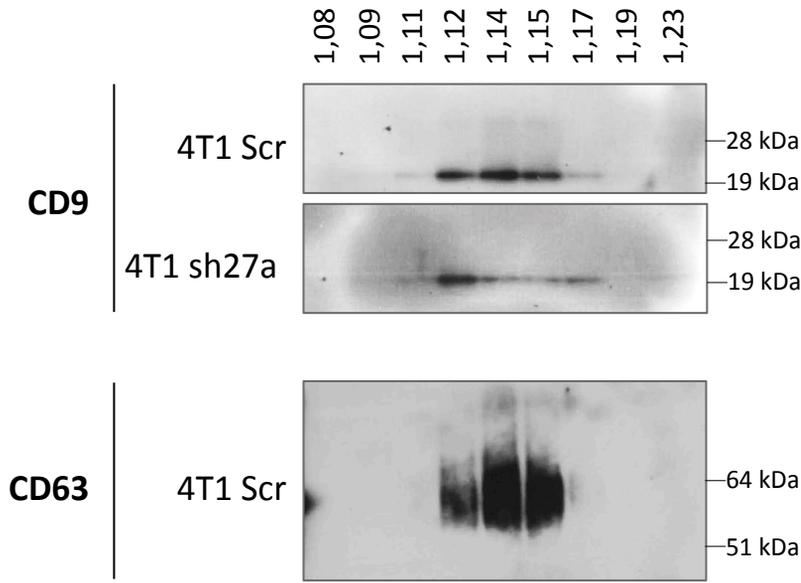


Figure 2.1 : Caractérisation des exosomes sécrétés par les cellules 4T1 Scr et 4T1 sh27a après flottation sur un gradient de sucrose pendant 62 heures.

20 µg d'exosomes produits par les cellules 4T1 exprimant (Scr) ou non (sh27a) Rab27a ont été mis à flotter sur un gradient de sucrose par ultracentrifugation pendant 62 heures. Le marqueur CD9 a pu être mis en évidence dans les culots d'exosomes provenant des deux types cellulaires, mais CD63 n'a pu être visualisé que dans les exosomes sécrétés par les cellules 4T1 Scr.

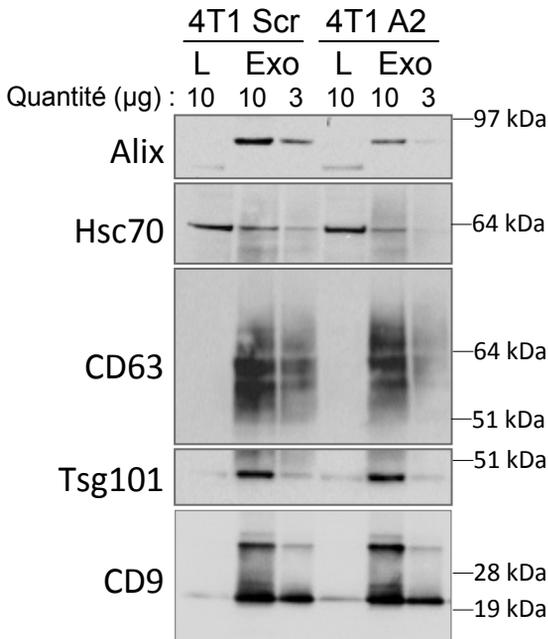


Figure 2.2 : Caractérisation des exosomes sécrétés par les cellules 4T1 Scr et 4T1 sh27a par western blot.

10 µg et 3 µg d'exosomes produits par les cellules 4T1 exprimant (Scr) ou non (sh27a) Rab27a ont analysés par western blot afin de vérifier la présence des différents marqueurs d'exosomes : Alix, Hsc70, CD63, Tsg101 et CD9. 10 µg de lysats de chaque type cellulaire ont aussi été analysés afin de mettre en évidence l'enrichissement des différents marqueurs dans les exosomes.

que ces deux marqueurs sont aussi très enrichis dans les plus grosses vésicules du culot de centrifugation de 10.000xg, classiquement appelées microvésicules et provenant de la membrane plasmique (Article 1, figure 5). La quantification des microvésicules sécrétées par les cellules exprimant ou non Rab27a montre que Rab27a n'est pas impliquée dans leur sécrétion (Article 1, figure 5).

L'étude de la répartition des marqueurs CD9, CD63 et Mfge8 après flottation des culots d'exosomes sur un gradient de sucrose met en évidence l'enrichissement différentiel de ces trois marqueurs dans des vésicules de densités différentes (Article 1, figure 3). L'inhibition de l'expression de Rab27a n'induit pas une diminution généralisée de l'ensemble des vésicules sécrétées, mais inhibe plus particulièrement celles enrichies en Mfge8, CD63 et CD9 flottant à une densité de 1,14 g/mL ainsi que les vésicules enrichies en CD63 ayant une densité apparente élevée (1,26 à 1,29 g/mL). Les vésicules riches en CD9 présentant elles aussi une densité apparente élevée sont en revanche peu affectées. Il a été montré par le groupe de W. Stoorvogel que le matériel (riche en CD9) présent après une ultracentrifugation de 16 heures dans les fractions de sucrose de densités élevées correspondaient en réalité à des vésicules flottant à une densité de 1,15 g/mL après une ultracentrifugation de 62 heures (Aalberts et al., 2012). Nous avons donc fait flotter 20 µg d'exosomes de 4T1 Scr et 4T1 sh27a dans un gradient de sucrose pendant 62 heures (**figure 2.1**). Les marqueurs CD9 et CD63 ne sont alors plus détectés dans les fractions les plus denses, pour finalement n'être présents que dans les fractions d'une densité de 1,11g/mL à 1,17 g/mL pour CD9, et de 1,12 à 1,17 g/mL pour CD63. A nouveau, nous pouvons constater que l'inhibition de Rab27a conduit à une diminution de la sécrétion des vésicules flottant à une densité de 1,14 et 1,15 g/mL. Or, ces deux fractions sont les plus riches en CD63. Ainsi, les cellules 4T1 sh27a ne sécrètent plus les vésicules flottant à une densité de 1,14-1,15 g/mL enrichies en CD63 et en CD9, mais sécrètent toujours les vésicules d'une densité de 1,11 et 1,17 g/mL pauvres en CD63 et riches en CD9. Ces résultats corrélerent avec les différences de comportement des marqueurs CD9 et CD63 observées lors des expériences de quantification de sécrétion par western blot (Article 1, figure 2). Le marqueur CD63 n'a pu être détecté dans les exosomes sécrétés par les cellules 4T1 sh27a lors de cette expérience de flottation sur gradient de sucrose. Lorsque 10 µg et 3 µg d'exosomes sécrétés par les cellules 4T1 Scr et les cellules 4T1 sh27a ont été analysés par western blot, nous avons pu révéler la présence des marqueurs CD63 et CD9, mais aussi Alix, Hsc70, et Tsg101 dans les deux

cas et en quantités comparables (**figure 2.2**). Ainsi, la plus faible détection des marqueurs endosomaux observée dans les expériences de quantification de sécrétion par western blot (dépôt de la quantité d'exosomes sécrétée par $15 \cdot 10^6$ cellules) ou dans les expériences de flottation sur gradient de sucrose, n'est pas due à un défaut d'incorporation de ces protéines dans les exosomes, mais bien à une diminution de la sécrétion des vésicules enrichies en ces différents marqueurs.

Enfin, par microscopie électronique, nous avons mis en évidence le rôle de Rab27a dans la sécrétion des vésicules d'un diamètre supérieur à 50 nm (et inférieur à 200 nm) mais pas dans la sécrétion des plus petites vésicules (Article 1, figure 4). Ainsi les vésicules de petite taille (30-50 nm) sont sécrétées selon un mécanisme indépendant de Rab27a. D'autre part, le nombre de molécules de CD9 détectées par vésicule n'est pas dépendant de leur taille, indiquant que les plus petites vésicules pourraient être proportionnellement plus riches en CD9.

Les conclusions de ce travail sont les suivantes :

(1) Il existe différentes populations de vésicules co-purifiées par le protocole classiquement utilisé d'ultracentrifugations. Certaines de ces vésicules sont sécrétées selon un mécanisme dépendant de Rab27a et semblent correspondre à la définition des exosomes : densité 1,14-1,15 g/mL, 50 à 100 nm de diamètre, enrichissement en CD63, CD9, Tg101, Alix, Mfge8 et plus faiblement en Hsc70. En revanche d'autres vésicules co-purifiées avec les exosomes sont produites selon un mécanisme indépendant de Rab27a et présentent les caractéristiques suivantes : densité 1,11 et 1,17 g/mL (centrifugation de 62 heures sur le gradient de sucrose), taille comprise entre 30 et 50 nm de diamètre, enrichissement faible en CD63 mais fort en CD9 et Mfge8. Ces dernières pourraient ainsi provenir d'une sécrétion par bourgeonnement depuis la membrane plasmique ou bien d'un autre type de compartiments intracellulaires.

(2) Les marqueurs CD9 et Mfge8 sont nettement enrichis dans des vésicules très hétérogènes et autres que les exosomes, dont les microvésicules de plus grosses tailles qui précipitent lors de l'ultracentrifugation de 10.000xg. Ils ne peuvent donc pas être considérés comme des bons marqueurs d'exosomes.

Ces résultats sont décrits en détails dans l'**article 1** « Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosomes preparations obtained by differential ultracentrifugation » publié dans *Journal of extracellular vesicles* ci-après.

B- LES EXOSOMES DANS LA REPONSE IMMUNITAIRE TUMORALE : modèles de carcinomes mammaires murins (Article 2)

Résumé

Ayant confirmé le rôle de la protéine Rab27a dans la sécrétion de vésicules correspondant aux exosomes dans un modèle murin, nous avons choisi d'utiliser l'inhibition de Rab27a comme outil pour affecter la production des exosomes par les tumeurs *in vivo* afin d'étudier leurs fonctions dans le développement tumoral. Nous avons toutefois observé que Rab27a n'était pas spécifiquement impliquée dans la voie sécrétion des exosomes, mais participait aussi à la sécrétion régulée de certains facteurs solubles. Des expériences complémentaires ont donc dû être réalisées pour distinguer les fonctions des exosomes et des cytokines. Nous avons montré que les tumeurs n'exprimant pas Rab27a ont une croissance ralentie, ont une capacité métastatique réduite et induisent une réponse immunitaire différente de celle induite par les tumeurs sauvages. Les résultats obtenus *in vitro* nous ont amenés à poser l'hypothèse que les exosomes, en coordination avec les facteurs solubles libérés par la tumeur, participaient à la modulation de la réponse immunitaire tumorale. Le rôle pro-tumoral des exosomes produits de façon dépendante de Rab27a n'a pas été retrouvé dans un autre modèle tumoral, probablement en raison de différences de sécrétion à la fois des facteurs solubles et des exosomes. Ce résultat montre que le rôle pro-tumoral de Rab27a ne peut pas être généralisé à toutes les tumeurs et souligne les différentes stratégies mises en place par les tumeurs pour se développer. Allant dans ce sens, les données d'expression de RAB27A chez l'Homme, dans des biopsies de cancer du sein, montrent une surexpression de cette protéine plus particulièrement dans certains types de tumeurs.

a) Introduction

Comme nous en avons discuté en introduction de cette thèse, les exosomes tumoraux purifiés à partir de milieux de culture ou de liquides biologiques peuvent porter différentes protéines ou peptides qui leur permettent de moduler les réponses immunitaires *in vitro* et *in vivo*. Cependant, le rôle que jouent les exosomes lorsqu'ils sont sécrétés *in vivo*, c'est à dire lorsqu'ils sont présents à une concentration physiologique et avec une composition particulière pouvant éventuellement évoluer au

cours du temps, n'est pas connu. Quels rôles jouent les exosomes produits par les tumeurs *in vivo* dans la croissance tumorale et la réponse immunitaire tumorale ? Afin de répondre à ces questions nous avons inhibé leur sécrétion dans deux lignées tumorales murines, les carcinomes mammaires 4T1 et TS/A, en bloquant l'expression des protéines Rab27a et Rab27b. En réalité, seule Rab27a est impliquée dans la sécrétion des exosomes par les lignées tumorales murines. Nous avons comparé la croissance et la capacité métastatique des tumeurs sécrétant ou ne sécrétant pas d'exosomes (exprimant ou n'exprimant pas Rab27a respectivement) *in vivo* dans souris Balb/c. La réponse immunitaire tumorale induite a aussi été analysée. Nous allons dans cette partie décrire ces résultats, discuter de la spécificité de Rab27a pour la voie de sécrétion des exosomes, et enfin nous allons donner quelques éléments sur le mécanisme par lequel Rab27a et les exosomes jouent un rôle pro-tumoral dans les tumeurs 4T1 mais pas dans les tumeurs TS/A.

b) Résultats et discussion

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression des gènes *Rab27a* et *Rab27b* dans différentes lignées tumorales murines (Article 2, figure 1A et B). Nous avons constaté, comme cela était décrit dans la littérature, différents profils d'expression en fonction du type cellulaire considéré. Par exemple, les cellules de mélanome B16F10 expriment Rab27a en très grande quantité (ARNm et protéine) mais n'expriment pas Rab27b, ce qui corrèle avec le rôle essentiel de Rab27a pour le fonctionnement des mélanocytes. Deux carcinomes mammaires, 4T1 et TS/A, expriment des niveaux équivalents et relativement élevés de chacune des deux isoformes. Dans les cellules du fibrosarcome MCA, les quantités d'ARNm de *Rab27a* et *Rab27b* sont aussi similaires mais plus faibles que dans les carcinomes mammaires. Enfin la lignée de tumeur de vessie MB49, exprime plus fortement *Rab27b* que *Rab27a*. Le profil d'expression obtenu dans 4T1 et TS/A étant le plus proche de celui observé dans les cellules HeLa utilisées pour démontrer le rôle de ces deux protéines dans la sécrétion des exosomes, nous avons décidé de continuer l'étude avec ces deux lignées cellulaires.

Cinq shRNA ont été testés pour inhiber l'expression des gènes *Rab27a* et *Rab27b*, et un seul à chaque fois nous a permis d'obtenir une inhibition spécifique de l'expression de l'isoforme considérée sans modification de l'expression de l'autre isoforme dans les

cellules 4T1 et TS/A (Article 2, figure 1C et D). Nous avons évalué la sécrétion des exosomes par les cellules TS/A ou 4T1 exprimant un shRNA contrôle (Scr), un shRNA spécifique de Rab27a (sh27a) ou un shRNA spécifique de Rab27b (sh27b). Après purification des exosomes, nous avons quantifié les protéines exosomales totales ainsi que les différents marqueurs exosomaux CD63, Hsc70, Tsg101 et Alix (Article 2, figure 2). Nous avons mis en évidence une diminution de 50 à 70% de la sécrétion des exosomes par les cellules 4T1 et TS/A n'exprimant pas Rab27a. En revanche, l'inhibition de l'expression de Rab27b n'a affecté de façon reproductible la sécrétion des exosomes dans aucune des deux lignées. Par ailleurs, nous pouvons remarquer ici que les cellules TS/A produisent deux fois moins d'exosomes que les cellules 4T1, soit autant que les cellules 4T1-sh27a (Article 2, figure 2A).

Nous avons alors étudié la croissance des tumeurs 4T1 et TS/A exprimant ou non la protéine Rab27a. Aucune différence de croissance n'a été observée suite à l'inhibition de l'expression de Rab27a dans les tumeurs TS/A (Article 2, figure 3A). En revanche, les tumeurs 4T1-sh27a ont une croissance très ralentie par rapport aux tumeurs contrôles 4T1-Scr (Article 2, figure 3B). Ceci n'est pas dû à un défaut de prolifération causé par l'inhibition de l'expression de Rab27a puisque les cellules 4T1-Scr et 4T1-sh27a prolifèrent à la même vitesse *in vitro* (Article 2, figure S2). La capacité des cellules 4T1-sh27a à former des métastases dans les poumons, que ce soit depuis la tumeur primaire ou après injection intraveineuse est elle aussi diminuée. Il semble donc que Rab27a confère aux tumeurs 4T1 un avantage nécessaire à leur croissance et à leur capacité métastatique, ce qui n'est pas le cas pour les tumeurs TS/A.

La réponse immunitaire tumorale induite par les deux types de tumeurs a été étudiée, au niveau systémique (rate) et local (dans la tumeur) (Article 2, figure 4). Nous avons constaté que les tumeurs 4T1, mais pas les tumeurs TS/A, induisent une accumulation très importante des cellules myéloïdes exprimant les marqueurs CD11b, Ly6G et Ly6C, marqueurs caractéristiques des neutrophiles et des cellules myéloïdes suppressives. Cette accumulation est très importante au sein même des tumeurs : ces cellules représentent environ 70% des cellules immunitaires intra-tumorales (Article 2, figure 4B), mais elle est aussi visible dans la rate et le sang (Article 2, figure 4D). Ces cellules CD11b+/Ly6G+/Ly6C+ ne s'accumulent pas dans les tumeurs TS/A (environ 10% des cellules immunitaires infiltrant la tumeur), et on y retrouve plus de LT CD4+, LT CD8+, lymphocytes NK et des macrophages (Ly6C+/Ly6G-) (Article 2, figure 4C). Les

tumeurs 4T1 n'exprimant pas Rab27a induisent une accumulation significativement plus faible des cellules CD11b+/Ly6G+/C+ (20% des cellules immunitaires intra-tumorales). Ceci ne peut être expliqué simplement par la différence de taille entre les tumeurs 4T1-Scr et les tumeurs 4T1-sh27a, puisque si l'on compare des tumeurs 4T1-Scr et 4T1-sh27a de mêmes tailles, la différence d'accumulation des cellules CD11b+/Ly6G+/C+ reste vraie (Article 2, figure 4B, graphique de droite). Aucune différence d'infiltrat immunitaire n'a pu être mise en évidence entre les tumeurs TS/A qui expriment ou n'expriment pas Rab27a. Il semble donc que les tumeurs 4T1 induisent un microenvironnement immunitaire différent de celui des tumeurs TS/A, dans lequel l'accumulation de la population CD11b+/Ly6G+/C+ participerait à la croissance et à la capacité métastatique de ces tumeurs. Le recrutement de ces cellules par les tumeurs 4T1 serait alors dépendant de l'expression de Rab27a. Les tumeurs 4T1 sont décrites comme étant peu immunogènes alors que les tumeurs TS/A sont immunogènes (Rakhmievich et al., 2000). Le recrutement des neutrophiles/cellules myéloïdes suppressives pourrait ainsi participer à la faible immunogénicité des tumeurs 4T1 en favorisant un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Les tumeurs TS/A développent certainement d'autres mécanismes de croissance ne passant pas par une diminution de leur immunogénicité.

Les fonctions des exosomes de 4T1 et de TS/A ont été testées dans plusieurs études auparavant, *in vitro* et *in vivo*, à partir des culots d'exosomes purifiés et concentrés (Liu et al., 2006). Aucune différence fonctionnelle n'avait été mise en évidence. Ainsi, le fait que seule la croissance des tumeurs 4T1 soit modifiée, alors que la sécrétion des exosomes est bien inhibée dans les deux types cellulaires, semble indiquer qu'un mécanisme indépendant des exosomes pourrait être impliqué ici. Nous avons donc supposé que d'autres types de sécrétions pouvaient avoir été affectés par l'inhibition de l'expression de Rab27a et être à l'origine des discordances entre les deux modèles. Afin de vérifier cela, nous avons évalué la sécrétion de 144 protéines différentes par les cellules 4T1 et TS/A exprimant ou non Rab27a. Nous avons détecté la sécrétion de 23 protéines par les cellules 4T1 et/ou TS/A. La première observation est que les deux types cellulaires ne produisent pas les mêmes facteurs solubles ou pas dans les mêmes quantités (Article 2, figure 5A). Ainsi, les cellules 4T1 sécrètent le G-CSF (Csf3), MIP3 α (Ccl20) et Cxcl16 en très grandes quantités, alors que les cellules TS/A n'en produisent presque pas. Les deux types cellulaires produisent MCP1 (Ccl2) dans

des quantités similaires. Enfin, RANTES (Ccl5) et KC (Cxcl1) sont fortement secrétées par les cellules des TS/A et sont produits en moindres quantités par les 4T1. Ces protéines secrétées ne sont pas contenues dans les exosomes (Article 2, figure 5B). L'inhibition de l'expression de Rab27a dans les cellules 4T1 et TS/A a induit une modification de la sécrétion de plusieurs de ces facteurs solubles. De façon intéressante, cela a eu pour conséquence d'augmenter et non de diminuer la sécrétion de G-CSF, KC, MIP3 α et MCP1. Seule la sécrétion de RANTES est diminuée en l'absence de Rab27a et celle de Cxcl16 n'est pas affectée. Rab27a est donc aussi impliquée dans les voies de sécrétion de certaines cytokines et facteurs de croissance. Etant donné les rôles connus de Rab27a dans les sécrétions régulées, nous pouvons supposer que Rab27a participe à la sécrétion régulée de certaines chimiokines par les cellules tumorales en inhibant la fusion des vésicules contenant ces protéines (dans l'attente d'un signal de sécrétion).

Certaines des cytokines secrétées sont connues pour jouer un rôle dans la prolifération, la différenciation et/ou l'activation des neutrophiles et des cellules myéloïdes suppressives : KC, G-CSF et MCP1. Nous avons ainsi voulu vérifier si seules ces cytokines étaient responsables des modulations immunologiques observées lors de l'inhibition de l'expression de Rab27a ou si les exosomes y participaient aussi. Pour cela, nous avons mis en culture les cellules de moelle osseuse de souris en présence (1) des milieux conditionnés complets par des cellules 4T1 et TS/A, exprimant ou non Rab27a, ou (2) des milieux conditionnés déplétés d'exosomes. Les milieux conditionnés par les cellules 4T1 promeuvent la survie et/ou la prolifération des cellules myéloïdes, ce que ne font presque pas milieux conditionnés par les cellules TS/A (Article 2, figure 6A). Cela semble correspondre à l'effet connu du G-CSF, facteur de croissance des granulocytes, produit en très grande quantité par les cellules 4T1 mais pas par les TS/A. D'autre part, les cellules exprimant les marqueurs CD11b, Ly6G et Ly6C sont présentes en plus forte proportion dans les cultures incubées pendant 7 jours avec les surnageants 4T1-Scr que dans les cultures incubées avec les surnageants TS/A (Article 2, figure 6B). Du point de vue des marqueurs exprimés, cette population est semblable à celle observée *in vivo* dans les souris portant les tumeurs 4T1-Scr. L'inhibition de Rab27a dans les cellules 4T1 réduit la capacité de ces cellules à promouvoir la population CD11b+/Ly6G+/Ly6C+ *in vitro* (Article 2, figure 6B et C). Ceci corrèle à nouveau avec les résultats obtenus *in vivo*. De plus, la déplétion des exosomes des milieux conditionnés de cellules 4T1-Scr inhibe la promotion des cellules CD11b+/Ly6G+/Ly6C+, et l'effet peut être restauré par

complémentation de ces milieux déplétés avec des exosomes de 4T1-Scr. Ainsi, les cytokines sécrétées par les cellules 4T1 ont un effet sur la survie et/ou la multiplication des cellules immunes en culture, et la présence des exosomes semble être nécessaire à une induction augmentée (survie et/ou différenciation) des cellules de type neutrophiles ou myéloïdes suppressives. Les exosomes sécrétés par les cellules 4T1 participent donc à la modulation des populations immunitaires *in vitro*, et nous supposons qu'ils pourraient aussi participer à la modulation du microenvironnement tumoral immunitaire *in vivo*, favorisant l'accumulation de neutrophiles/cellules myéloïdes suppressives jouant un rôle pro-tumoral. Nous supposons que les milieux conditionnés par les cellules TS/A n'ont pas le même effet sur la survie et différenciation des cellules de la moelle osseuse car : (1) les cytokines produites sont différentes (et notamment, ces cellules produisent très peu de G-CSF) et (2) les TS/A produisent deux fois moins d'exosomes que les 4T1-Scr et autant que les 4T1-sh27a qui n'ont plus la capacité des 4T1-Scr à induire les neutrophiles/MDSCs.

Afin de savoir si les protéines RAB27A et RAB27B pouvaient être impliquées dans le développement des cancers chez l'Homme, nous avons analysé l'expression des gènes *RAB27A* et *RAB27B* à l'aide de puces Affymetrix dans des biopsies de cancers du sein réalisées à l'Institut Curie, et à partir d'une banque publique de données d'expression. Les résultats montrent une expression augmentée de *RAB27A* dans les tumeurs par rapport aux tissus sains, et cette surexpression est encore plus marquée dans les tumeurs aux stades les plus avancés (grades 2 et 3 de Elston-Ellis). De même, les tumeurs négatives pour l'expression du récepteur muté à l'EGF (HER2) et du récepteur aux estrogènes (ER), qui correspondent pour beaucoup à des tumeurs d'un stade avancé, sont celles exprimant le plus fortement *RAB27A*. Si l'expression de *RAB27B* est aussi augmentée dans certaines tumeurs par rapport aux tissus sains, elle semble l'être principalement dans les tumeurs de plus faible grade (grade 1 de Elston-Ellis) et exprimant au moins l'un des deux types de récepteurs HER2 ou ER.

L'ensemble de ces résultats est détaillé dans l'article « The small GTPase Rab27a can promote tumor progression by modifying the tumor microenvironment », actuellement en révision pour *Cancer Research*.

Les conclusions de ce travail sont les suivantes :

(1) Rab27a mais pas Rab27b est impliquée dans la voie de sécrétion des exosomes par les cellules tumorales murines. Ce rôle n'est cependant pas spécifique des exosomes,

l'inhibition de l'expression de Rab27a induisant des modifications dans la sécrétion de plusieurs facteurs solubles.

(2) Rab27a peut jouer un rôle pro-tumoral dans certains types de tumeurs, et notamment ici dans le modèle de carcinome mammaire 4T1 mais pas dans le modèle TS/A. Ces deux modèles se développent dans un microenvironnement tumoral différent, au moins du point de vue immunitaire. Les tumeurs TS/A sont immunogènes, alors que les tumeurs 4T1 ne le sont que faiblement (Rakhmievich et al., 2000) et dans nos mains, les tumeurs 4T1 métastatiques semblaient plus « agressives » que les tumeurs TS/A qui sont incapables d'induire des métastases (données non présentées). Il n'est donc pas surprenant qu'elles n'utilisent pas les mêmes mécanismes pour permettre leur développement. Cette dernière observation corrèlerait avec ce que nous avons observé chez l'Homme par analyse de l'expression de *RAB27A* dans les cancers du sein : le gène *RAB27A* est le plus fortement surexprimé dans les cancers des grades les plus avancés et de plus mauvais pronostic (ER- HER2-). Il semble que chez l'Homme, comme chez la souris, Rab27a puisse jouer un rôle pro-tumoral dans certaines tumeurs mais pas (ou moins) dans d'autres.

(3) L'expression de Rab27a par les cellules 4T1 semble être nécessaire à la modulation de la réponse immunitaire tumorale, et plus particulièrement à l'accumulation systémique et locale de neutrophiles/cellules myéloïdes suppressives. Il se pourrait que ce soit par cette action sur le système immunitaire que Rab27a exerce son rôle pro-tumoral de promotion de la croissance et de la dissémination métastatique.

(4) À la fois les cytokines et les exosomes sécrétés selon un mécanisme dépendant de Rab27a participent à l'effet pro-tumoral joué par Rab27a dans le modèle 4T1. En effet, la présence des facteurs solubles et des exosomes est nécessaire *in vitro* à l'augmentation en nombre et en proportion des cellules CD11b+/Ly6G+/Ly6C+. Les cytokines, et notamment le G-CSF, favoriseraient la survie et/ou la prolifération des cellules, et les exosomes seraient responsables de la surreprésentation des populations de neutrophiles ou de cellules myéloïdes suppressives *in vitro* et peut-être aussi *in vivo*. Les cellules TS/A produisent peu d'exosomes et nous supposons que la quantité d'exosomes sécrétée est trop faible pour avoir un quelconque effet physiologique, ce qui expliquerait pourquoi l'inhibition de l'expression de Rab27a n'a aucun effet sur la croissance des tumeurs TS/A.

C- LES EXOSOMES DANS LA REPOSE IMMUNITAIRE TUMORALE : **résultats annexes**

1/ Modèle de fibrosarcome murin exprimant un antigène sur les **exosomes : MCA OVA-C1C2**

a) Introduction

Les exosomes purifiés des surnageants de culture ou d'effusions tumorales de patients atteints d'un cancer portent des antigènes tumoraux et peuvent servir de source d'antigènes pour l'induction d'une réponse immunitaire *in vivo* (Wolfers et al., 2001). Afin de savoir si les exosomes sécrétés dans l'organisme par les tumeurs peuvent servir de source d'antigènes conduisant à une réponse immunitaire anti-tumorale *in vivo* sans passer par des étapes de purification, trois lignées cellulaires ont été produites dans le laboratoire à partir de la lignée MCA 101 (Zeelenberg et al., 2008) (**Figure 2.3**) :

(1) une lignée stablement transfectée avec un plasmide codant la protéine ovalbumine fusionnée à la séquence signal de la protéine Mfge8, cette lignée « MCA-OVA » sécrète donc de l'ovalbumine soluble dans le milieu extracellulaire

(2) une lignée stablement transfectée avec un plasmide codant la protéine ovalbumine fusionnée à la séquence signal et au domaine C1C2 de la protéine Mfge8, cette lignée « MCA-OVA-C1C2 » sécrète donc de l'ovalbumine associée aux vésicules qui exposent la phosphatidylsérine à leur surface (exosomes et autres vésicules)

(3) une lignée stablement transfectée avec un plasmide vide (sans l'ovalbumine), la lignée MCA mock.

Avec ces trois lignées, il a été montré que la sécrétion d'une protéine exogène, l'ovalbumine, en association avec les vésicules induit un retard de croissance par rapport aux tumeurs sécrétant l'antigène sous forme soluble ou n'exprimant pas du tout l'antigène. Ce retard de croissance est dépendant des lymphocytes T. D'autre part, lorsque des LT CD8⁺ spécifiques de l'ovalbumine (OT-I) sont injectés dans les souris portant les différentes tumeurs, ils sont capables d'induire le rejet des tumeurs MCA-OVA-C1C2 mais pas des tumeurs MCA-OVA. L'analyse par FACS de ces LT dans les ganglions drainants des souris montre qu'ils sont plus fortement activés dans les souris portant une tumeur MCA-OVA-C1C2 sécrétant l'ovalbumine sur les vésicules que dans les souris portant une tumeur MCA-OVA sécrétant l'ovalbumine sous forme soluble. Par

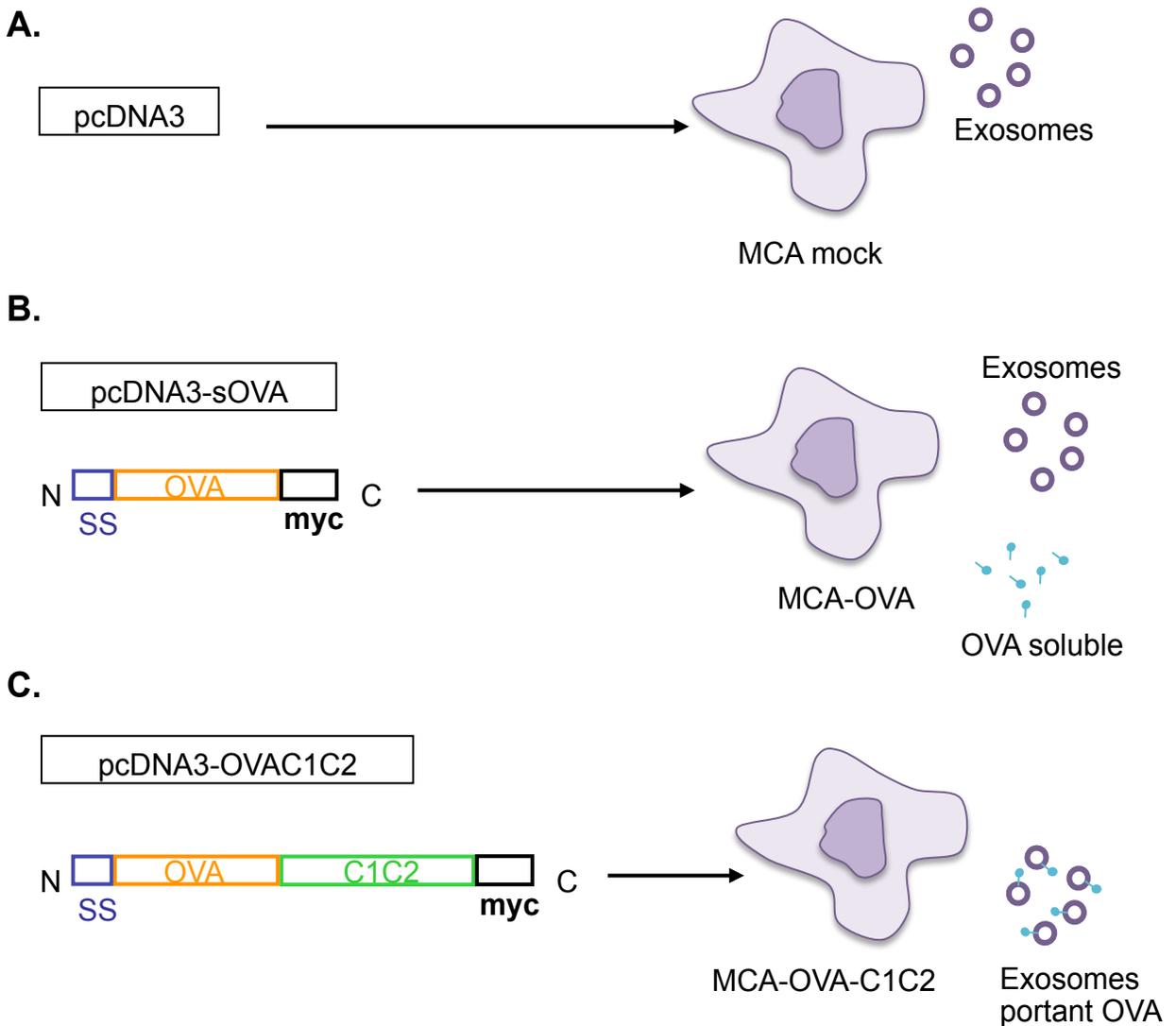


Figure 2.3 : Les trois configurations cellulaires utilisées dans l'étude de Zeelenberg, I. et al (Cancer Research 2008).

A. Les cellules contrôles sont transfectées avec le plasmide pcDNA3 vide : elles n'expriment pas d'antigène et produisent des exosomes normalement. **B.** Certaines cellules sont transfectées avec un plasmique contenant la séquence codant l'ovalbumine, avec une séquence signal. Ces cellules sécrètent donc l'antigène ovalbumine sous forme soluble et produisent des exosomes ne contenant pas OVA. **C.** La troisième construction plasmidique contient une séquence contenant l'ovalbumine fusionnée à la séquence C1C2 de la protéine Mfge8, connue pour se fixer aux phosphatidylsérines exposées à la surface des vésicules extracellulaires dont les exosomes. Les cellules qui expriment cette construction ne produisent pas l'antigène sous forme soluble (ou très peu), mais majoritairement associé aux vésicules extracellulaires. Les exosomes produits par ces cellules portent ainsi l'antigène OVA.

ailleurs, l'induction de l'expression de la protéine OVA-C1C2 *in vivo* par vaccination ADN protège plus efficacement les souris contre le développement d'une tumeur exprimant l'ovalbumine que la vaccination avec un ADN codant l'ovalbumine soluble.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence le bénéfice de la sécrétion d'un antigène exogène en association avec des vésicules lipidiques par rapport à la sécrétion sous forme soluble. Cependant, l'association de l'antigène aux vésicules se fait par l'interaction entre le domaine C1C2 fusionné à l'ovalbumine et la phosphatidylsérine qui est exposée à la surface des exosomes, mais aussi de toutes les autres microvésicules, corps apoptotiques et cellules mortes. Afin d'étudier plus spécifiquement le rôle des exosomes dans l'induction de cette réponse immunitaire, nous avons inhibé leur sécrétion en interférant avec l'expression de Rab27a dans les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2. Nous avons ensuite étudié la croissance de ces différentes tumeurs exprimant ou non Rab27a, en présence ou en absence des LT CD8+ spécifiques OT-I.

b) Matériels et méthodes

Cellules et souris

La lignée cellulaire MCA-101 est un fibrosarcome de fond génétique C57Bl/6. La lignée MCA-OVA a été obtenue par transfection des cellules avec le plasmide pcDNA3-OVAs et les cellules MCA-OVA-C1C2 avec le plasmide pcDNA3-OVAC1C2. Ces deux plasmides contiennent le gène de résistance à l'hygromycine. Nous travaillons avec les clones MCA-OVA-17 et MCA-OVA-C1C2-7 sélectionnés et décrits dans les travaux précédents (Zeelenberg et al., 2008). Ces clones sont cultivés en milieu DMEM (Dubelcco 's modified Eagle's medium) contenant 4,5g/L de glucose, 10% de SVF (sérum de veau foetal), 2mM de glutamine et de pénicilline/streptomycine, ainsi que 1mg/mL d'hygromycine B. Afin d'inhiber l'expression de Rab27a et Rab27b, les cellules sont infectées avec des lentivirus contenant les séquences codant les shRNA (contrôles ou dirigés contre *Rab27a* et *Rab27b*) ainsi que le gène de résistance à la puromycine. Les séquences de shRNA utilisées sont les suivantes :

sh27a :CCGGCGAAACTGGATAAGCCAGCTACTCGAGTAGCTGGCTTATCCAGTTTCGTTTTTTG ;

sh27b1 :CCGGCCTGAGACAATGTCAAACCATCTCGAGATGGTTTGACATTGTCTCAGTTTTTTG ;

sh27b2 :CCGGCGGGAAGACAACATTTCTCTACTCGAGTAGAGAAATGTTGTCTTCCCCTTTTTG ;

sh27b3 :CCGGGCATACCATACTTCGAAACAACTCGAGTTGTTTCGAAGTATGGTATGCTTTTTG ;

sh27b4 :CCGGGCTTCTGGACTTAATCATGAACTCGAGTTCATGATTAAGTCCAGAAGCTTTTT ;

sh27b5 : CCGGCTCTATAGATACACAGACAATCTCGAGATTGTCT GTGTAT CTATAGAGTTTTTG.

Les lentivirus sont produits et utilisés pour infecter les cellules selon les protocoles décrits par Moffat J. en 2006 (Moffat et al., 2006). Les cellules après infection sont cultivées en présence de puromycine à 5 µg/mL. L'hygromycine et la puromycine ne sont pas ajoutées dans le milieu au moment des purifications d'exosomes et la veille des injections aux souris.

Les lymphocytes T OT-I (dont le TCR reconnaît spécifiquement le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ associé aux molécules du CMH de classe I H2-K^b) sont obtenus par dissociation des ganglions lymphatiques provenant de souris transgéniques (sur fond C57Bl/6 sauvage ou RAG2^{-/-}) ne produisant que des lymphocytes T OT-I. Si les souris transgéniques sont sur un fond C57Bl/6 sauvage, une étape supplémentaire de purification négative des OT-I à l'aide d'un kit de déplétion (Myltenyi Biotec) est réalisée.

Les souris C57Bl/6 proviennent de la compagnie Charles Rivers. Les souris C57Bl/6 CD45.1 et les souris OT-I CD45.2 sauvages ou RAG2^{-/-} proviennent d'élevages à l'animalerie de l'Institut Curie (dans des conditions particulières d'absence de pathogènes spécifiques).

Croissance des tumeurs MCA in vivo

Les cellules MCA-OVA Scr, MCA-OVA sh27a, MCA-OVA-C1C2 Scr et MCA-OVA-C1C2 sh27a sont injectées en sous-cutané à des souris C57Bl/6 CD45.1 à raison de 200.000 cellules par souris dans un volume de 100 µL. La taille des tumeurs est mesurée tous les deux ou trois jours avec un pied à coulisse (Caliper), et le volume des tumeurs est calculé selon la formule : largeur x longueur x [(largeur + longueur)/2]. Les souris sont sacrifiées lorsque les tumeurs atteignent un volume de 1500 mm³.

Etude de l'activation des lymphocytes T CD8+ OT-I in vivo

Six à huit jours après l'injection des cellules tumorales, les souris reçoivent une injection de 3.10⁶ lymphocytes OT-I CD45.2 dans 100 µL de PBS par voie intraveineuse. Ces lymphocytes sont au préalable marqués au CFSE. Pour cela, 5 µM de CFSE sont ajoutés à une suspension d'OT-I d'une concentration de 10.10⁶ cellules/mL dans du PBS 0,1% BSA. Après une incubation de 10 minutes à 37°C les cellules sont lavées trois fois en PBS 0,5% BSA, comptées et mises en suspension dans du PBS à une concentration de 30.10⁶

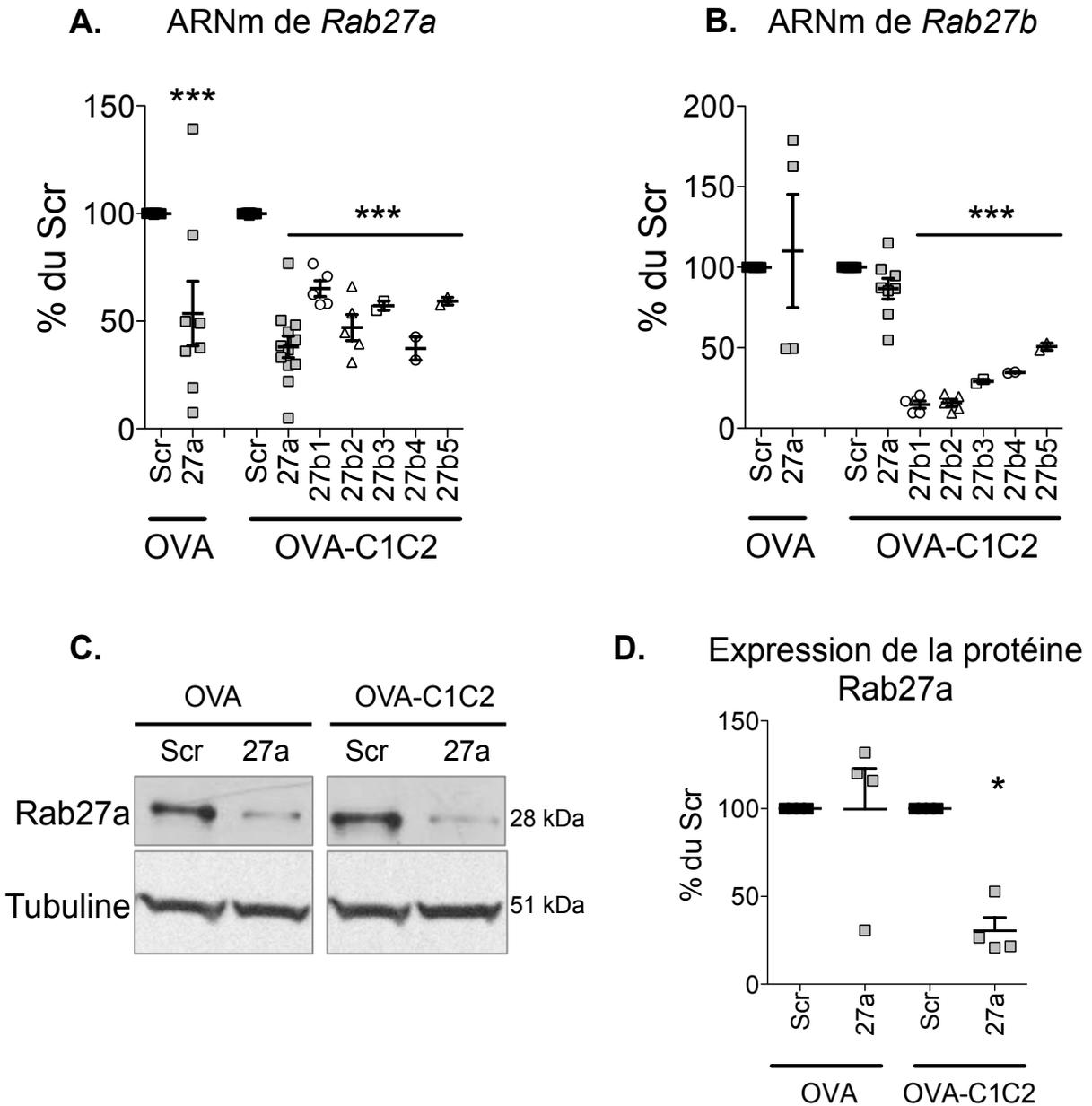


Figure 2.4 : Inhibition de l'expression de Rab27a et de Rab27b dans les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2.

Plusieurs shARN ont été utilisés afin d'inhiber l'expression de Rab27a et de Rab27b, dans les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2. **A et B.** Quantification de l'expression de *Rab27a* (A.) et de *Rab27b* (B.) par qRT-PCR dans les cellules exprimant un shARN spécifique de *Rab27a* ou l'un des cinq shARN spécifiques de *Rab27b*. n=8 pour OVA et n=12 pour OVA-C1C2, One-way ANOVA, post-test de Dunnett, *** p<0,001. **C.** Le niveau d'expression de la protéine Rab27a est vérifié par western blot. La tubuline est utilisée comme contrôle de charge. **D.** Le signal correspondant à la protéine Rab27a est quantifié et rapporté au signal de la tubuline, et le résultat est présenté en pourcentage d'expression par rapport au Scr. n=4 expériences indépendantes. Analyse statistique : One-way ANOVA, post-test de Bonferroni. * p<0,05.

La moyenne et l'écart type sont représentés sur chaque graphique et chaque point représente une expérience indépendante.

cellules/mL. Une partie des souris sont sacrifiées le lendemain et l'autre partie six jours après l'injection des OT-I afin d'analyser l'activation précoce et tardive. Les ganglions axillaires drainants les tumeurs ou provenant de souris ne portant pas de tumeurs sont prélevés, écrasés et filtrés afin d'obtenir une suspension cellulaire sur laquelle sont effectués les marquages avec les anticorps fluorescents suivants (BD Pharmingen) : CD8-APC, CD8-Pacific blue, CD45.2 PerCP-Cy5.5, CD69-PE (jour 1), CD44-PE ou IFN γ -PE (jour 6). Les marquages de surface sont réalisés en PBS 0,5% BSA 2mM EDTA. Pour les marquages intracellulaires, les cellules préalablement marquées en surface sont fixées en PBS 2% formaldéhyde, et perméabilisées par une solution de PermWash (BD Biosciences). L'anticorps anti-IFN γ -PE est dilué dans cette même solution de perméabilisation afin de réaliser le marquage intracellulaire. Le FACS (fluorescence-activated cell sorter) MacsQuant (Myltenyi Biotec) est utilisé pour mesurer la fluorescence et l'analyse est effectuée à l'aide du logiciel FlowJo.

Quantification des protéines exosomales

La quantité totale de protéines dans les culots d'exosomes et dans les lysats cellulaires est quantifiée par le test de Bradford (BioRad).

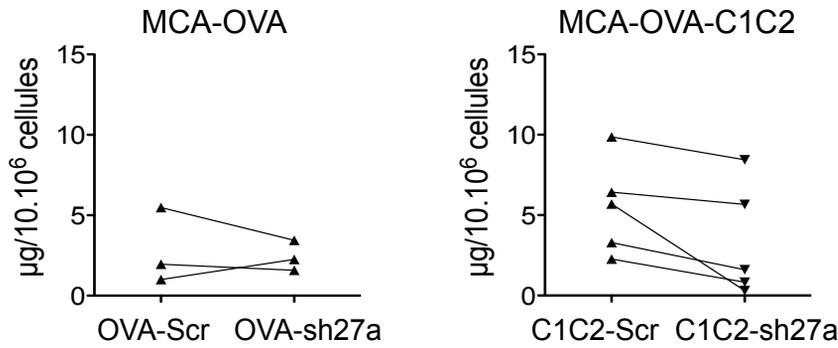
Les protocoles suivants sont identiques à ceux décrits dans l'article « The small GTPase Rab27a can promote tumor progression by modifying the tumor microenvironment » :

Analyse de l'expression de Rab27a par RT-PCR quantitative et western blot ; Purification et caractérisation des exosomes ; Réactifs.

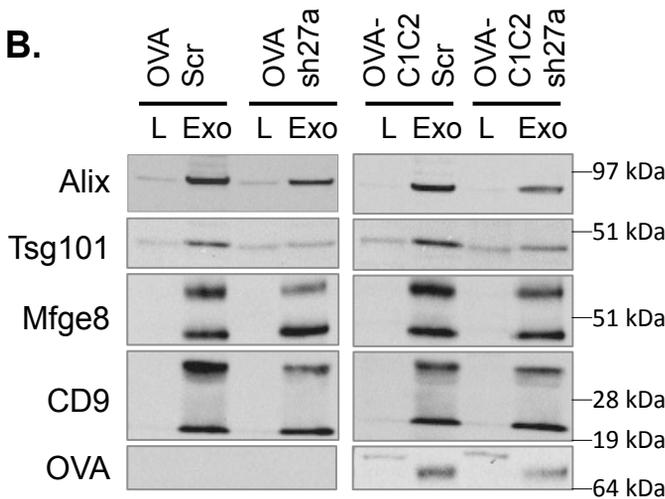
c) Résultats

Nous avons inhibé l'expression de Rab27a dans les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2, avec le même shRNA que celui utilisé précédemment avec les lignées 4T1 et TS/A. Une diminution de 50% de l'ARNm *Rab27a* est mesurée dans les deux clones cellulaires, sans modification significative de la quantité d'ARNm *Rab27b* (même si celle-ci est très variable dans les cellules MCA-OVA) (**figure 2.4 A et B**). Les cinq shRNA utilisés pour inhiber l'expression de Rab27b entraînent une diminution de 60 à 80% de la quantité d'ARNm de *Rab27b* dans les cellules, mais cette action n'est pas spécifique puisqu'ils induisent aussi une diminution d'au moins 40% de l'expression de *Rab27a* au

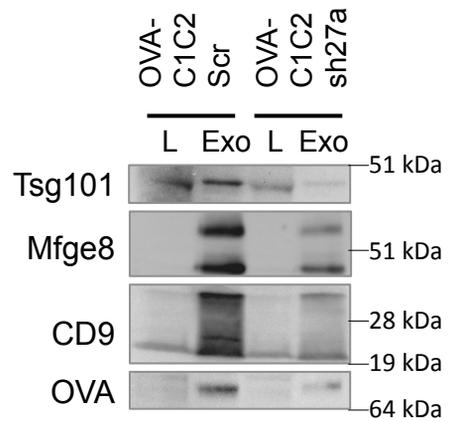
A. Quantité de protéines dans les culots d'exosomes



B.



C.



D.

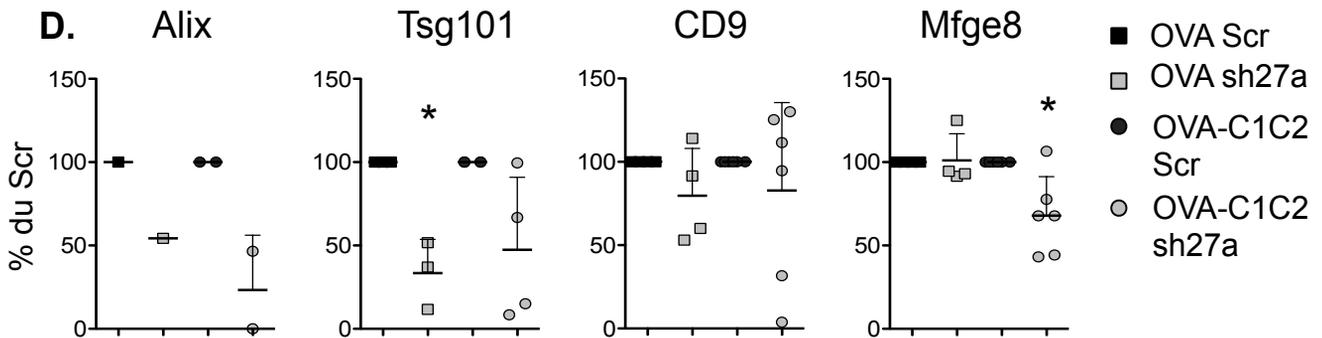


Figure 2.5 : La sécrétion des exosomes est inhibée dans les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2 n'exprimant pas Rab27a.

A. Quantification de la quantité de protéines exosomales sécrétées par les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2 exprimant (Scr) ou non (sh27a) Rab27a. **B.** Quantification des exosomes sécrétés par 15.10⁶ cellules MCA-OVA Scr et sh27a, MCA-OVA-C1C2 Scr et sh27a par détection des marqueurs Alix, Tsg101, Mfge8, CD9 et de l'ovalbumine (OVA). 30µg de lysat de chaque type de cellules ont été analysés en comparaison. **C.** Deuxième exemple de quantification des exosomes sécrétés par les cellules MCA-OVA-C1C2 Scr et sh27a dans laquelle les marqueurs CD9 et Mfge8 sont diminués dans les culots des cellules sh27a. **D.** Quantification des signaux obtenus pour chaque marqueur, Alix (n=1 ou 2), Tsg101 (n=3), CD9 (n=4 ou 6), Mfge8 (n=4 ou 6). Les histogrammes présentent la moyenne et l'écart type des résultats. Analyse statistique : Test t de Student apparié, * p>0,05.

niveau de l'ARNm. Nous n'allons donc présenter que l'inhibition de Rab27a dans les modèles MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2, d'autant plus que seule Rab27a était impliquée dans la sécrétion des exosomes dans les cellules TS/A et 4T1. La diminution d'expression de Rab27a dans les cellules MCA-OVA-C1C2 exprimant le shRNA spécifique a été confirmée au niveau de la protéine (**figure 2.4 C et D**). En revanche une bonne diminution de la quantité de protéine Rab27a dans les cellules MCA-OVA sh27a n'a pu être mise en évidence dans une expérience sur quatre.

Nous avons quantifié la sécrétion des exosomes par les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2 exprimant ou non Rab27a. Les exosomes ont été purifiés à partir des surnageants de culture par ultracentrifugations différentielles. La quantité totale de protéines dans les culots d'exosomes a été mesurée mais aucune différence significative n'a été observée entre les cellules exprimant ou non Rab27a (**figure 2.5 A**). La sécrétion a ensuite été quantifiée par western blot : les marqueurs d'exosomes (CD9, Mfge8, Alix et Tsg101) ont été quantifiés sur les exosomes sécrétés par $15 \cdot 10^6$ cellules (**figure 2.5 B-D**). Nous avons ainsi observé une diminution des marqueurs Alix et Tsg101 dans les culots d'exosomes des cellules MCA-OVA sh27a et MCA-OVA-C1C2 sh27a (exprimant le shRNA spécifique de Rab27a). Des résultats variables ont été obtenus concernant les marqueurs Mfge8 et CD9 dont la sécrétion avec les exosomes est parfois diminuée (**figure 2.5 C**), et parfois non ou très peu (**figure 2.5 B**). Ainsi, la quantification de ces marqueurs sur plusieurs expériences ne montre pas de diminution de CD9 suite à l'inhibition de Rab27a et une diminution pouvant être significative mais faible de Mfge8 (**figure 2.5 D**). Au moment où nous avons réalisé cette étude avec le modèle MCA, nous n'utilisons pas les marqueurs CD63 et Hsc70, deux marqueurs diminués par l'inhibition de Rab27a dans les modèles 4T1 et TS/A. Les différences de diminution des marqueurs Tsg101 et Alix d'une part, CD9 et Mfge8 d'autre part, induites par l'inhibition d'expression de Rab27a, correspondent à ce que nous avons obtenu dans les lignées 4T1 et TS/A. Rab27a est donc impliquée dans la sécrétion des exosomes portant Tsg101 et Alix par les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2. Nous avons aussi détecté la présence de l'ovalbumine, l'antigène étudié avec ce modèle, sur les exosomes dans les deux expériences présentées sur la (**figure 2.5 B et C**). Nous pouvons constater que la protéine OVA-C1C2 (66 kDa) est présente dans les culots d'exosomes sécrétés par les cellules MCA-OVA-C1C2 et absente de ceux sécrétés par les cellules MCA-OVA. Cela n'apparaît pas sur la figure présentée ici, mais aucune bande n'apparaît non plus à la

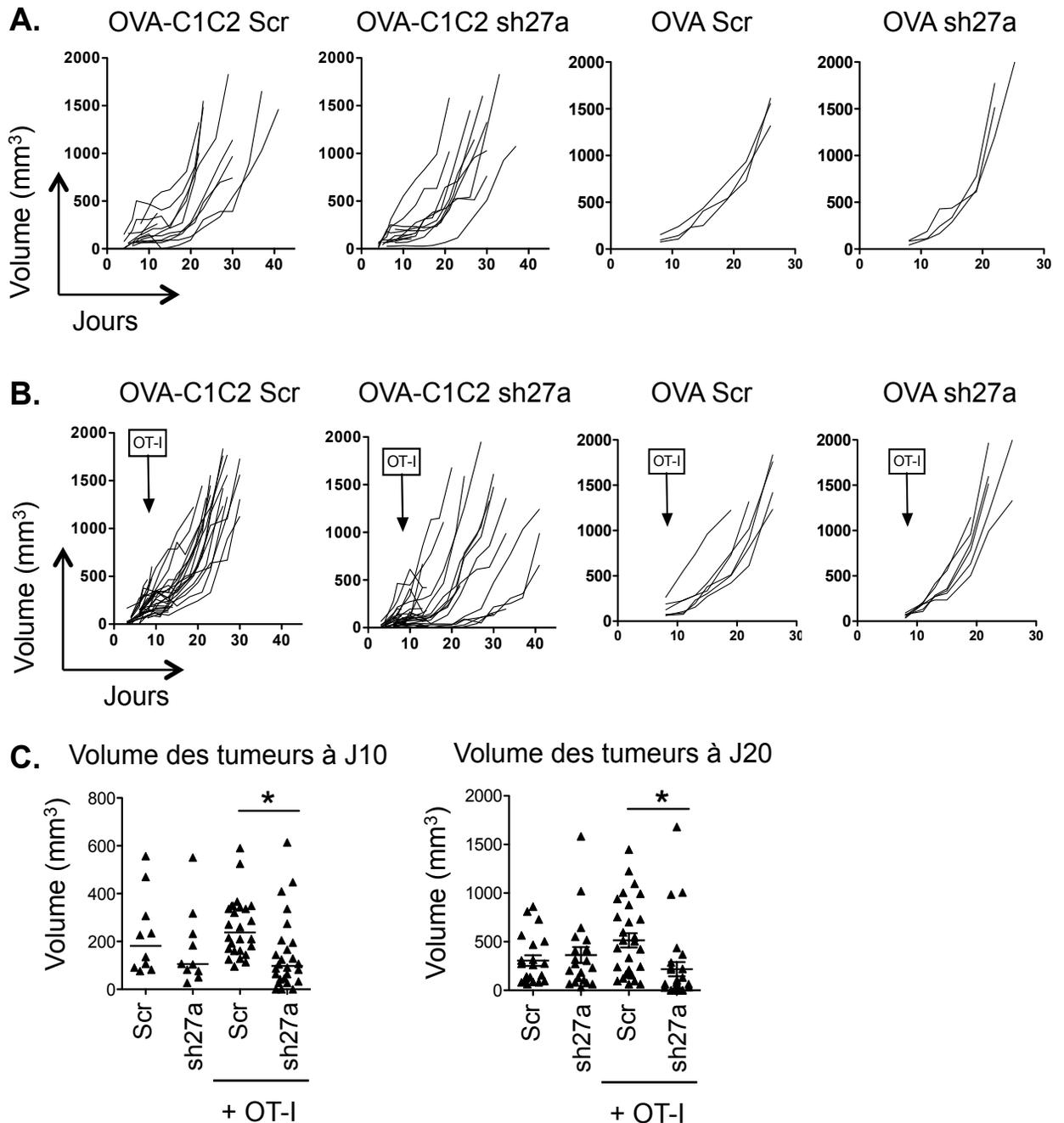


Figure 2.6 : Les tumeurs n'exprimant pas Rab27a ont une croissance ralentie après injection de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'ovalbumine (OT-I).

A. Croissance des tumeurs MCA-OVA-C1C2 et MCA-OVA exprimant un shARN contrôle (Scr) ou un shARN spécifique de Rab27a (sh27a) après injection de 200.000 cellules en sous-cutané. Chaque ligne représente une souris individuelle. n=13 souris pour MCA-OVA-C1C2 et n=3 souris pour MCA-OVA. **B.** Croissance des tumeurs dans des souris recevant une injection en intraveineuse à jour 6 ou 8 de 3.10⁶ lymphocytes OT-I spécifiques de l'ovalbumine. n=34 souris pour MCA-OVA-C1C2 et n=6 souris pour MCA-OVA. **C.** Représentation de la taille des tumeurs MCA-OVA-C1C2 Scr et sh27a, en présence ou non de lymphocytes OT-I, à jour 10 et à jour 20. Barre horizontale : médiane. Analyse statistique : One-Way ANOVA, post-test de Bonferroni, * p<0,05.

taille de 51 kDa, c'est à dire à la taille de l'ovalbumine soluble, indiquant que celle-ci n'est pas co-centrifugée avec les exosomes des cellules MCA-OVA et est donc bien absente de la fraction exosomale. La quantité d'ovalbumine sécrétée dans les culots d'exosomes des cellules MCA-OVA-C1C2 sh27a est diminuée dans ces deux expériences. Ainsi, l'inhibition de Rab27a entraîne une diminution de la sécrétion de la population d'exosomes portant la protéine ovalbumine.

Nous avons suivi la croissance des cellules MCA-OVA Scr/sh27a et des cellules MCA-OVA-C1C2 Scr/sh27a après injection en sous-cutané à des souris C57Bl/6. Aucune différence de croissance n'est observée entre les quatre types cellulaires (**figure 2.6 A**). Comme nous le disions en introduction, l'injection de lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'ovalbumine (OT-I) entraîne le rejet des tumeurs MCA-OVA-C1C2 mais pas des tumeurs MCA-OVA. Nous avons donc étudié la croissance des tumeurs exprimant ou non Rab27a dans des souris recevant une injection de ces lymphocytes OT-I en intraveineuse au moment où les tumeurs apparaissent (jours 6-8). Un ralentissement voire un léger rejet des tumeurs MCA-OVA-C1C2 Scr est observé après l'injection des OT-I, puis, à partir du jour 12, les tumeurs reprennent une croissance progressive (**figure 2.6 B**). Les OT-I induisent un ralentissement beaucoup plus important de la croissance des tumeurs MCA-OVA-C1C2 sh27a qui sont même, pour la plupart, à peine détectables jusqu'aux jours 15-20. Ainsi, en présence des lymphocytes OT-I, la taille des tumeurs MCA-OVA-C1C2 sh27a mesurée 10 ou 20 jours après leur injection est statistiquement différente de celle des tumeurs MCA-OVA-C1C2 Scr (**figure 2.6 C**). La croissance des tumeurs MCA-OVA sh27a est la même que celle des tumeurs MCA-OVA Scr (**figure 2.6 A**), et l'injection des OT-I n'a aucun effet sur la croissance ni dans un cas ni dans l'autre (**figure 2.6 B**). Nous observons donc ici que l'expression de Rab27a permet croissance plus importante des tumeurs MCA-OVA-C1C2 en présence des lymphocytes T CD8+ spécifiques. Les exosomes sécrétés de façon dépendante de Rab27a pourraient donc participer à la résistance de ces tumeurs vis à vis de la réponse immunitaire adaptative. Ce phénomène semble dépendant de la présence de l'antigène sur les exosomes, étant donné que la croissance des tumeurs MCA-OVA n'est pas modifiée suite à la diminution d'expression de Rab27a.

Nous avons étudié l'activation des lymphocytes T dans les souris portant les tumeurs MCA-OVA-C1C2 Scr ou MCA-OVA-C1C2 sh27a. Pour cela, nous avons prélevé les ganglions axillaires drainants la tumeur de ces souris (Scr et sh27a) et les ganglions

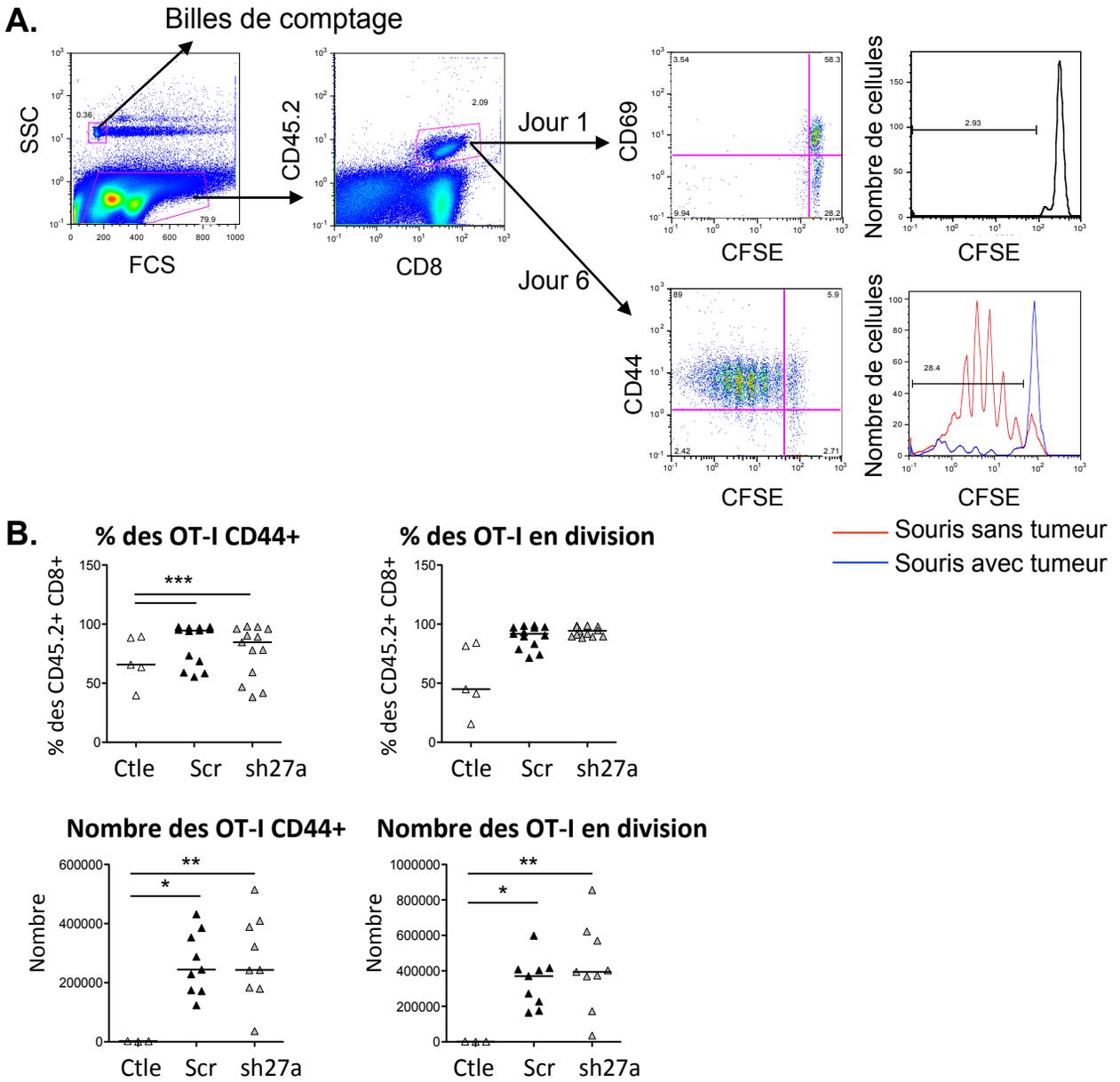


Figure 2.7 Les lymphocytes OT-I sont activés de façon identique dans les souris portant une tumeur MCA-OVA-C1C2 exprimant ou non Rab27a.

A. Etude de l'activation des OT-I, porteurs du marqueur CD45.2 et marqués au CFSE, dans les ganglions drainants la tumeur, 1 jour ou 6 jours après leur injection en intraveineuse dans les souris ($3 \cdot 10^6$ par souris). La prolifération des OT-I est étudiée par la dilution du CFSE et leur activation par l'expression des marqueurs CD69 à J1 et CD44 à J6. L'histogramme à J6 présente la prolifération des OT-I dans une souris portant une tumeur (rouge) superposée à l'absence de prolifération dans une souris sans tumeur (bleu). Des billes de comptage sont ajoutées pour calculer les nombres absolus de cellules. **B.** Analyse de l'activation et de la prolifération des OT-I, 6 jours après leur injection dans des souris portant des tumeurs MCA-OVA-C1C2 Scr, sh27a, ou des souris sans tumeurs (Ctle). Les résultats sont présentés en pourcentage des OT-I et en nombres absolus. 3 expériences ont été réalisées avec un total de 5 souris contrôles, et 13 souris portant des tumeurs exprimant ou non Rab27a. Barre horizontale : moyenne. Analyse statistique : One-way ANOVA, post-test de Bonferroni, * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

axillaires de souris ne portant pas de tumeurs (Ctle), un jour ou six jours après l'injection des OT-I (**figure 2.7 A**). Les lymphocytes T injectés aux souris peuvent être détectés par l'expression du marqueur congénique CD45.2, les souris receveuses exprimant CD45.1. Avant leur injection, les OT-I sont marqués avec le colorant CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) afin de suivre la prolifération des lymphocytes injectés. L'activation des OT-I est étudiée le lendemain de leur injection par l'expression du marqueur d'activation précoce CD69. Six jours après leur injection, en plus de l'étude de leur prolifération, l'activation des OT-I est étudiée par l'expression du marqueur d'activation CD44. Des billes de comptage sont ajoutées aux suspensions de ganglions afin de calculer les nombres absolus de cellules. Le lendemain de leur injection, les lymphocytes OT-I n'ont pas proliféré, et 60% d'entre eux expriment le marqueur CD69, qu'ils proviennent de ganglions de souris portant une tumeur contrôle (Scr) ou de souris portant une tumeur inhibée pour l'expression de Rab27a (résultats non montrés). Six jours après leur injection, les OT-I sont activés (plus de 90% expriment le marqueur CD44) et prolifèrent de façon intensive dans les souris portant une tumeur MCA-OVA-C1C2, mais à nouveau, aucune différence n'est observée en fonction de l'expression (Scr) ou non (sh27a) de Rab27a dans les tumeurs (**figure 2.7 B**). Dans les souris contrôles ne portant pas de tumeur, il n'y a pas d'activation des OT-I comme cela est mis en évidence par le très faible nombre d'OT-I exprimant CD44 ou en prolifération dans ces souris (environ 2000 cellules comptées en comparaison des $2 \cdot 10^6$ d'OT-I dans les souris portant une tumeur) (**figure 2.7 B, graphiques du bas**). L'activation des OT-I six jours après l'injection a aussi été étudiée par un marquage intracellulaire de l'IFN γ . Ce paramètre n'est pas non plus influencé par l'expression ou non de Rab27a dans les tumeurs se développant dans les souris (résultats non montrés). Ainsi, l'injection des lymphocytes OT-I est nécessaire pour induire un retard de croissance des tumeurs n'exprimant pas Rab27a par rapport aux tumeurs contrôles, mais cette modification de la croissance ne peut être attribuée à une modulation de l'activation des OT-I.

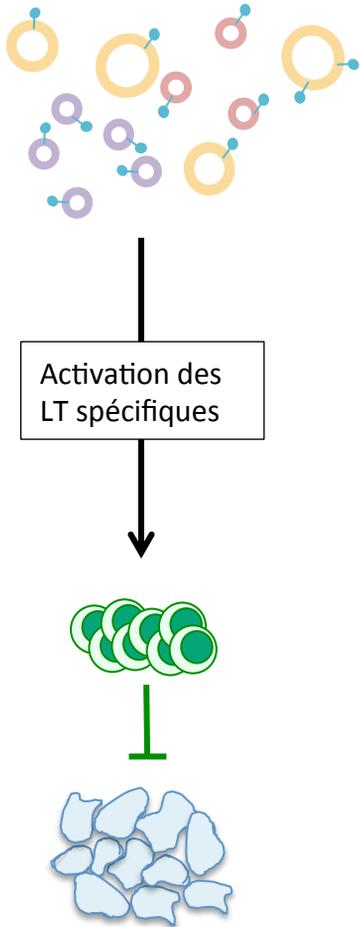
d) Discussion

Nous avons inhibé l'expression de Rab27a dans les cellules MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2 et avons confirmé le rôle de cette protéine dans la sécrétion des exosomes par ces cellules de fibrosarcome murin, tout comme nous l'avons montré dans les

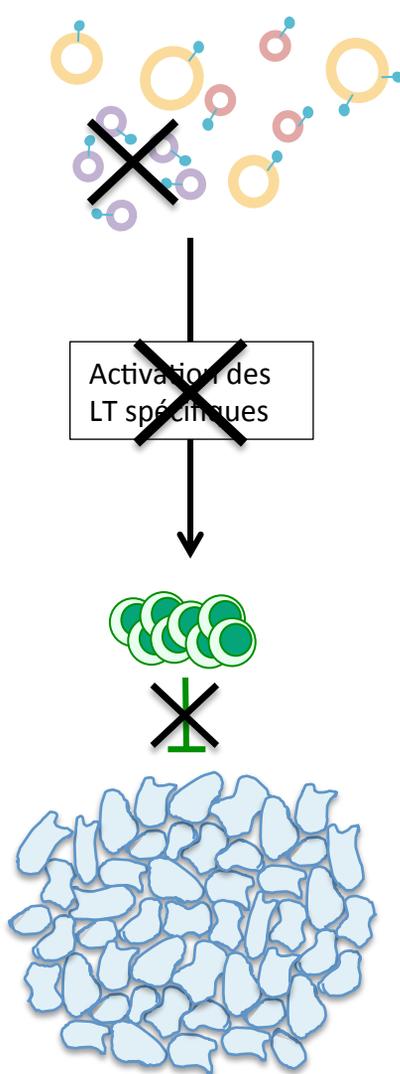
carcinomes mammaires 4T1 et TS/A. La quantification des marqueurs Tsg101 et Alix d'une part, CD9 et Mfge8 d'autre part dans les culots d'exosomes des cellules MCA exprimant ou non Rab27a nous ont donné des résultats en accord avec ceux obtenus dans les modèles 4T1 et TS/A : Rab27a contrôlerait la sécrétion d'une population d'exosomes enrichis en marqueurs endosomaux, mais pas la sécrétion d'une autre population de vésicules portant majoritairement CD9 et Mfge8. Ceci pourrait être renforcé par la quantification des marqueurs CD63 et Hsc70. La sécrétion d'ovalbumine associée aux exosomes (OVA-C1C2) semble elle aussi être diminuée par l'inhibition de l'expression de Rab27a. Dans le modèle 4T1, nous avons de plus mis en évidence un enrichissement aussi important de Mfge8 dans les exosomes que dans les plus grosses vésicules du culot de 10.000xg, ce que nous n'avons pas vérifié dans le modèle MCA. La protéine OVA-C1C2 étant composée d'une fusion entre l'ovalbumine et le domaine C1C2 de Mfge8, nous pouvons nous attendre à ce que cette protéine de fusion suive le même profil de localisation que Mfge8 et soit donc très enrichie sur les microvésicules. Il serait donc nécessaire de quantifier la proportion de la protéine OVA-C1C2 sécrétée en association avec les exosomes et avec les microvésicules dans les conditions contrôles et dans les conditions d'inhibition de l'expression de Rab27a. Etant donné que Rab27a n'est pas impliquée dans la sécrétion des microvésicules par les cellules 4T1 et TS/A, nous pensons qu'il en serait de même dans la lignée MCA, mais il faudrait le confirmer. Si c'est le cas, l'inhibition de l'expression de Rab27a permettrait donc de diminuer spécifiquement la quantité d'antigène sécrété via les exosomes sans diminuer la quantité d'antigène sécrété sur les microvésicules. Cet outil nous permettrait ainsi de déterminer si les exosomes jouent un rôle distinct des microvésicules dans l'activation du système immunitaire spécifiquement contre l'antigène qu'ils portent. Il resterait tout de même à contrôler la sécrétion des facteurs solubles par la voie classique après inhibition de l'expression de Rab27a, afin d'évaluer la spécificité d'action de Rab27a dans la voie de sécrétion des exosomes par les cellules MCA. L'hypothèse la plus probable est que la protéine Rab27a, en plus d'être nécessaire à la sécrétion des exosomes, participe aussi à la sécrétion de facteurs solubles par la voie classique comme nous l'avons montré dans les lignées 4T1 et TS/A. Une analyse complète des travaux réalisés avec les cellules MCA-OVA Scr/sh27a et MCA-OVA-C1C2 Scr/sh27a nécessiterait donc une quantification précise (par ELISA par exemple) de la quantité d'ovalbumine sécrétée en association avec les exosomes, avec les microvésicules et sous forme soluble.



A. Modèle proposé par Zeelenberg, I. (2008)



B. Hypothèse : Rab27a contrôle la sécrétion des exosomes activateurs



C. Hypothèse suite aux résultats obtenus

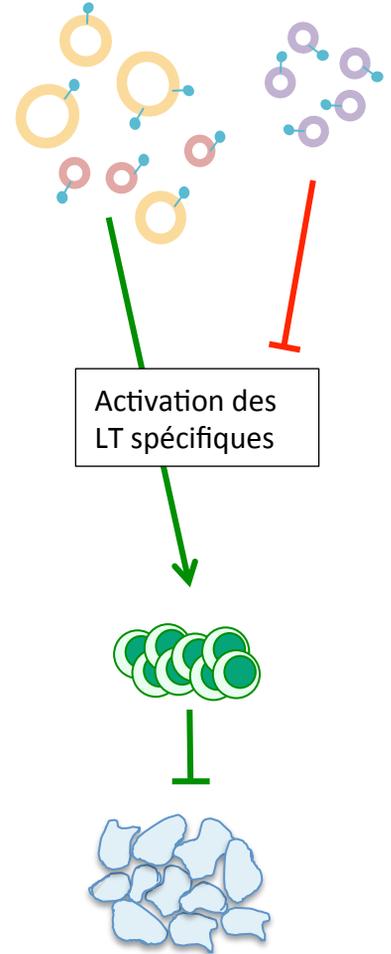


Figure 2.8 : Rôles hypothétiques des vésicules extracellulaires dans la croissance des tumeurs MCA-OVA-C1C2.

A. L'étude réalisée dans le laboratoire par Zeelenberg, I. a montré que les vésicules portant un antigène exogène pouvaient induire l'activation des LT spécifiques de cet antigène et le rejet de la tumeur. **B.** Si les exosomes sont les vésicules responsables de l'activation des LT, alors leur inhibition par blocage de l'expression de Rab27a devrait induire une meilleure croissance des tumeurs, en raison d'un défaut d'activation des LT. **C.** Nous avons à l'inverse montré que l'inhibition de Rab27a permettait un meilleur rejet des tumeurs. Nous supposons donc que les exosomes sécrétés par la voie Rab27a ont un effet inhibiteur sur l'activation des LT, qui serait elle-même induite par une autre population de vésicules portant l'antigène.

Lorsque nous avons étudié la croissance des tumeurs MCA-OVA et MCA-OVA-C1C2 dans lesquelles l'expression de Rab27a et donc la sécrétion des exosomes avaient été inhibées, nous n'avons pas observé de différence de croissance. Nous avons suivi pour ces expériences les protocoles décrits dans la publication de Zeelenberg, I. *et al.* (2008) et avons donc injecté 200.000 cellules par souris. Or, les différences de croissance observées dans le modèle 4T1 ne l'ont été qu'après injection d'un faible nombre de cellules, soit 50.000 cellules par souris. Il serait donc nécessaire de tester la croissance des cellules MCA après injection d'un faible nombre de cellules afin de savoir s'il n'y a réellement pas de ralentissement de la croissance dû à l'inhibition de l'expression de Rab27a. Il a été montré que les tumeurs MCA-OVA-C1C2 qui sécrètent l'OVA sur les vésicules sont rejetées après l'injection des OT-I alors que les tumeurs MCA-OVA qui sécrètent l'OVA soluble ne le sont pas. Au moins certaines des vésicules portant l'antigène jouent donc un rôle anti-tumoral par activation de la réponse T (**figure 2.8 A**). Si les exosomes sécrétés de façon dépendante de Rab27a sont responsables de l'activation des LT, l'inhibition de leur sécrétion devrait faciliter la croissance tumorale (**figure 2.8 B**). Nous avons donc inhibé l'expression de Rab27a dans les cellules MCA-OVA-C1C2, mais au lieu de voir une accélération de la croissance tumorale, nous avons à l'inverse observé un rejet plus efficace des tumeurs n'exprimant pas Rab27a par les lymphocytes T OT-I. Ainsi, dans le modèle MCA-OVA-C1C2, les exosomes joueraient un rôle pro-tumoral en limitant l'efficacité de la réponse adaptative T spécifique, et ce sont d'autres vésicules qui à l'inverse stimuleraient cette réponse anti-tumorale (**figure 2.8 C**).

2/ Modèle de cancer du sein humain : MDA-MB-231

a) Introduction

À la suite des résultats obtenus avec les cellules de carcinome mammaire murin 4T1, et de l'analyse de l'expression de RAB27 dans les biopsies humaines de cancer du sein, nous avons voulu étudier de rôle de RAB27A dans la sécrétion des exosomes et la croissance tumorale dans un modèle humain de cellules de cancer du sein. Les données des puces Affymetrix ont mis en évidence une plus forte surexpression de *RAB27A* dans les biopsies humaines de tumeurs n'exprimant ni le récepteur aux estrogènes (ER) ni le récepteur muté de l'EGF (HER2). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de

l'expression de *RAB27A* par Affymetrix dans différentes lignées tumorales humaines en culture (Article 2, figure 7). Nous avons choisi d'utiliser la lignée tumorale MDA-MB-231, lignée négative pour l'expression des récepteurs ER et HER2, et qui co-exprime les deux isoformes *RAB27A* et *RAB27B*.

Dans cette lignée, nous avons inhibé l'expression de *RAB27A* à l'aide d'un shRNA spécifique pour l'inhibition de l'expression du gène *RAB27A* humain. Nous avons ensuite quantifié et caractérisé les exosomes sécrétés par les cellules exprimant (Scr) ou non (sh27a) *RAB27A*. Enfin, nous nous sommes demandés si *RAB27A* jouait un rôle pro-tumoral dans la lignée MDA-MB-231 comme c'est le cas dans la lignée 4T1 et nous avons donc suivi la croissance des tumeurs MDA-MB-231 Scr et MDA-MB-231 sh27a dans des souris immunodéficientes. Les populations myéloïdes infiltrant ces tumeurs ont aussi été analysées afin d'établir une comparaison avec les résultats du modèle murin 4T1.

b) Matériels et méthodes

Cellules et souris

Les cellules MDA-MB-231 sont cultivées en milieu DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) contenant 4,5g/L de glucose, 10% de SVF (sérum de veau fœtal), 2mM de glutamine et de pénicilline/streptomycine. Les lentivirus sont produits et utilisés pour infecter les cellules selon les protocoles décrits par Moffat J. en 2006(Moffat et al., 2006). Les séquences des shRNA utilisées sont les suivantes :

sh27a1 :CCGGCCTGTGCATTTGAATTGTATACTCGAGTATACAATTCAAATGCACAGGTTTTT ;

sh27a2 :CCGGCCAGTGTACTTTACCAATATACTCGAGTATATTGGTAAAGTACACTGGTTTTT ;

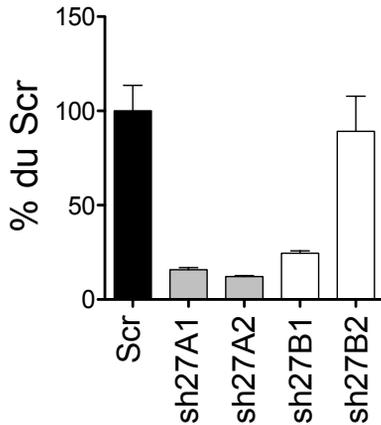
sh27b1 :CCGGCCCAAATTCATCACTACAGTACTCGAGTACTGTAGTGATGAATTTGGGTTTTTTG ;

sh27b2 : CCGGGATACTGTCAATGGTGGAAATCTCGAGATTTCCACCATTGACAGTATCTTTTTG.

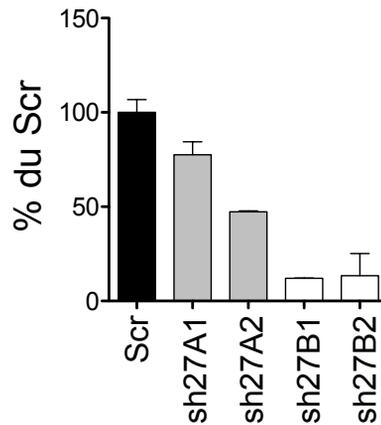
Après introduction des séquences codant les shRNA (par infection avec les lentivirus), les cellules sont cultivées en présence de puromycine à 5 µg/mL, excepté pendant les expériences de purification des exosomes et 24 heures avant les injections aux souris.

Les souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) sur un fond Balb/c NOD (Non-Obese Diabetic) proviennent de la compagnie Charles Rivers. Ces souris n'ont pas de lymphocytes T, B ni NK.

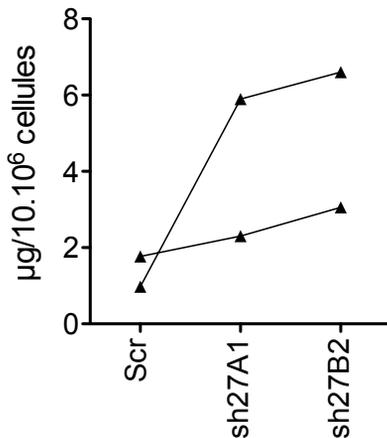
A. ARNm de *RAB27A*



B. ARNm de *RAB27B*



C. Quantité de protéines dans les culots d'exosomes



D.

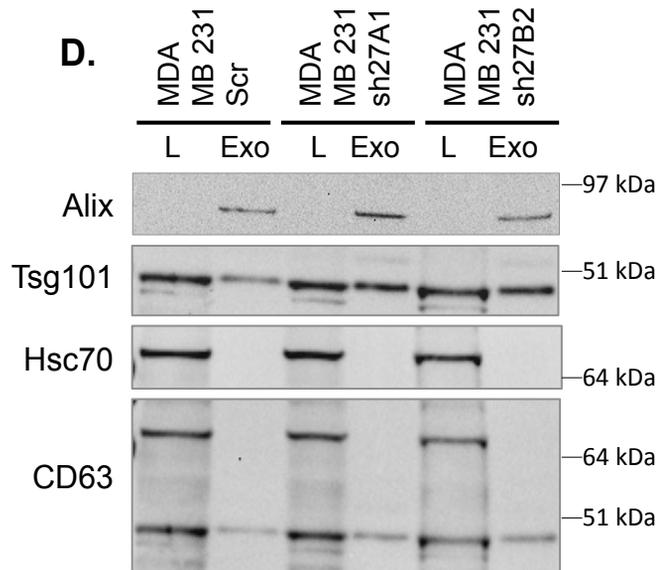


Figure 2.9 : Inhibition de l'expression de *RAB27A* et de *RAB27B* dans les cellules MDA-MB-231, et influence sur la sécrétion des exosomes.

A. Quantification par qRT-PCR de l'expression de *RAB27A* dans les cellules MDA-MB-231 exprimant un shARN contrôle (Scr), un shARN spécifique de *RAB27A* (2 shARN testés : sh27A1 et sh27A2), un shARN spécifique de *RAB27B* (2 shARN testés : sh27B1 et sh27B2). n=1 (en triplicats). L'histogramme présente la moyenne et l'écart type des résultats. **B.** Quantification par qRT-PCR de l'expression de *RAB27B* dans ces mêmes cellules. n=1 (en triplicats). **C.** Quantification de la quantité de protéines exosomales sécrétées par les cellules MDA-MB-231 Scr, sh27A1 et sh27B2. Le résultat est présenté en µg par 10.10⁶ cellules. **D.** Caractérisation et quantification des exosomes sécrétés par 15.10⁶ cellules MDA-MB-231 exprimant les shARN Scr, sh27A1 ou sh27B2. 30 µg de lysats de chaque cellule ont aussi été analysés. Seuls les marqueurs Alix et Tsg101 ont pu être détectés dans les exosomes, Hsc70 ne semble être présent que dans les lysats et CD63 n'est observé ni dans les lysats ni dans les exosomes.

Croissance des tumeurs MDA-MB-231 in vitro

Les cellules MDA-MB-231 Scr ou sh27A ont été mises en culture en plaques 96 puits à fond plat. La quantité de cellules par puit est mesurée par ajout d'un substrat, la résazurine (3 µL de AlamarBlue®, Invitrogen, dans 100 µL de milieu de culture pour chaque puits), qui change d'absorbance après avoir été réduit dans les cellules vivantes. L'absorbance à 570 nm est mesurée 2 heures après l'ajout du substrat à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque, et est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes dans chaque puits. La mesure est effectuée le jour de la mise en plaque puis tous les jours jusqu'au jour 4 (les cellules sont confluentes dès le jour 3).

Croissance des tumeurs MDA-MB-231 in vivo

Les cellules tumorales humaines MDA-MB-231 exprimant (Scr) ou non (sh27A) RAB27A sont injectées en sous-cutané à raison de 1.10^6 cellules par souris. Le volume des tumeurs est mesuré tous les deux ou trois jours à l'aide d'un pied à coulisse (Caliper).

Purification et caractérisation des exosomes

Les exosomes sont purifiés selon le protocole d'ultracentrifugations différentielles classique (Thery et al., 2006). Les exosomes sécrétés par 15.10^6 cellules et 30 µg de lysats de ces cellules sont analysés par western blot. Les anticorps utilisés sont : Hsc70 (Stressgen Biotech), Tsg101 (Genetex, clone 4A10), Alix/AIP1 (49/AIP1, BD Biosciences) et CD63 (BD Biosciences, clone H5C6).

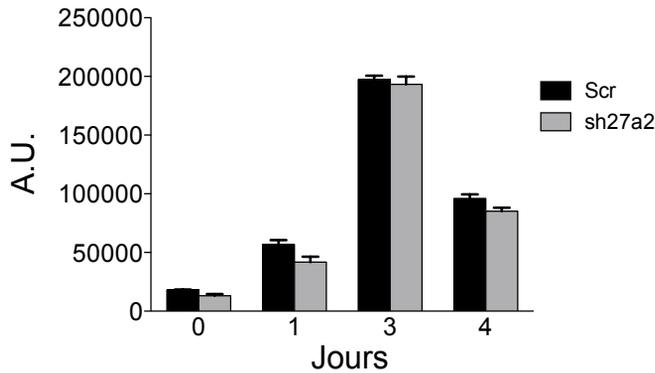
Les protocoles suivants sont identiques à ceux décrits dans l'article « The small GTPase Rab27a can promote tumor progression by modifying the tumor microenvironment » :

Analyse de l'expression de Rab27a par qRT-PCR ; Analyse des populations immunitaires ; Réactifs

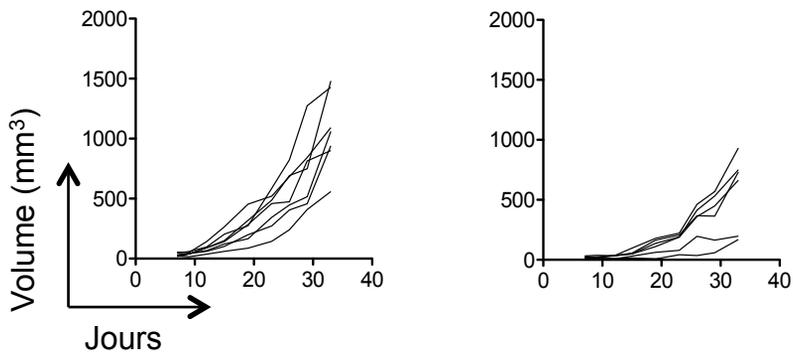
c) Résultats

Nous avons utilisé deux séquences de shRNA différentes afin d'inhiber l'expression de RAB27A, deux autres pour inhiber l'expression de RAB27B et une séquence ne ciblant aucun gène (Scr). Nous avons ensuite évalué l'inhibition de l'expression de ces deux gènes dans les cellules MDA-MB-231 par qRT-PCR. Les shRNA

**A. Croissance des cellules MDA-MB-231
Scr et sh27A *in vitro***



B. MDA-MB-231 Scr MDA-MB-231 sh27A1



C. Volume des tumeurs à J15 Volume des tumeurs à J30

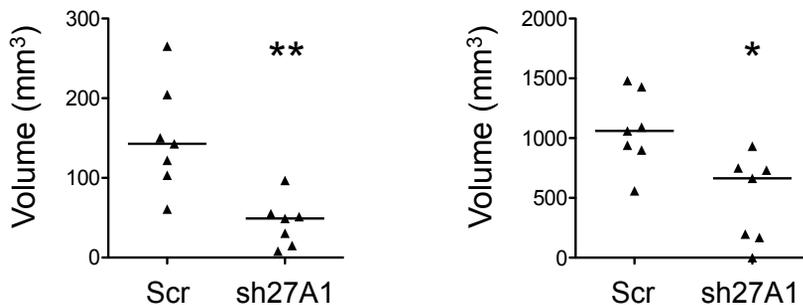


Figure 2.10 : Les tumeurs MDA-MB-231 n'exprimant pas RAB27A ont une croissance ralentie *in vivo* par rapport aux tumeurs contrôles.

A. Croissance des cellules MDA-MB-231 *in vitro*. La quantité de cellules est mesurée à l'aide d'un substrat qui devient fluorescent après avoir été métabolisé dans les cellules (Alamar blue). Le résultat est présente en unités arbitraires (A.U.) pour une expérience. La quantification est effectuée le jour de la mise en culture puis tous les jours jusqu'à confluence (J4). **B.** Croissance des tumeurs MDA-MB-231 Scr et MDA-MB-231 sh27A1 après injection de 1.10^6 de ces cellules en sous-cutané à des souris Balb/c NOD SCID. Chaque ligne représente une souris individuelle. Une expérience avec 7 souris est représentée. **C.** Volume des tumeurs MDA-MB-231 Scr et MDA-MB-231 sh27A1 aux jours 15 et 30. La barre horizontale représente la médiane. Analyse statistique : Test t de Student non paramétrique, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

sh27A1 et sh27A2 permettent de réduire de 80% la quantité d'ARNm *RAB27A*, mais elles entraînent aussi une diminution de 30% et 50% respectivement de la quantité d'ARNm *RAB27B* (**figure 2.9 A et B**). Les shRNA utilisés afin d'inhiber l'expression de *RAB27B* diminuent l'expression de ce gène de 80%, mais le sh27B1 diminue aussi de 80% l'expression de *RAB27A*. Bien qu'ils ne soient pas parfaits, nous avons utilisé les shRNA sh27A1 et sh27B2 pour la suite de l'étude.

Les exosomes des cellules MDA-MB-231 exprimant les shRNA contrôle (Scr), sh27A1 ou sh27B2 ont été purifiés par ultracentrifugations. La quantité totale de protéines exosomales sécrétées ne montre pas de diminution de la sécrétion des exosomes par les cellules n'exprimant pas *RAB27A* ou *RAB27B* (**figure 2.9 C**). Au contraire, s'il y a une différence, celle-ci serait plutôt dans le sens d'une augmentation de la sécrétion par rapport aux cellules contrôles. Lorsque nous avons recherché la présence des marqueurs sur les exosomes sécrétés par 15.10^6 cellules exprimant les shRNA Scr, sh27A1 et sh27B2, nous n'avons pu détecter que Alix et Tsg101 (**figure 2.9 D**). Hsc70 et CD63 n'ont pas été détectés, et nous n'avons pas d'anticorps reconnaissant la protéine CD9 humaine. Les deux marqueurs Alix et Tsg101 sont augmentés dans les culots d'exosomes produits par les cellules MDA-MB-231 sh27A1 et sh27B2 par rapport aux MDA-MB-231 Scr. Ainsi, si *RAB27A* et *RAB27B* sont impliquées dans la voie de sécrétion des exosomes par ces cellules, elles le sont selon un mécanisme différent de celui existant dans les modèles murins que nous avons étudiés et dans le modèle humain HeLa. Si nous confirmons par la suite que l'inhibition de l'expression de *RAB27A* ou de *RAB27B* induit une augmentation de la sécrétion des exosomes, alors, dans cette lignée cellulaire, les protéines *RAB27* pourraient avoir comme rôle d'inhiber la fusion des MVBs avec la membrane plasmique.

Après avoir vérifié que les cellules MDA-MB-231 exprimant ou non *RAB27A* proliféraient à la même vitesse *in vitro* (**figure 2.10 A**), nous avons étudié la croissance de ces tumeurs dans des souris immunodéficientes, les souris Balb/c NOD SCID. Pour cela, nous avons injecté 1.10^6 cellules en sous-cutané et avons suivi la croissance sur un environ 30 jours (**figure 2.10 B**) : les tumeurs n'exprimant pas *RAB27A* poussent plus lentement que les tumeurs contrôles. La différence de taille entre les deux types de tumeurs est significative aussi bien au milieu de la croissance au jour 15, qu'au jour 30 peu avant le sacrifice des souris (**figure 2.10 C**). *RAB27A* semble donc jouer un rôle pro-tumoral dans le modèle MDA-MB-231 tout comme nous l'avons observé dans le modèle

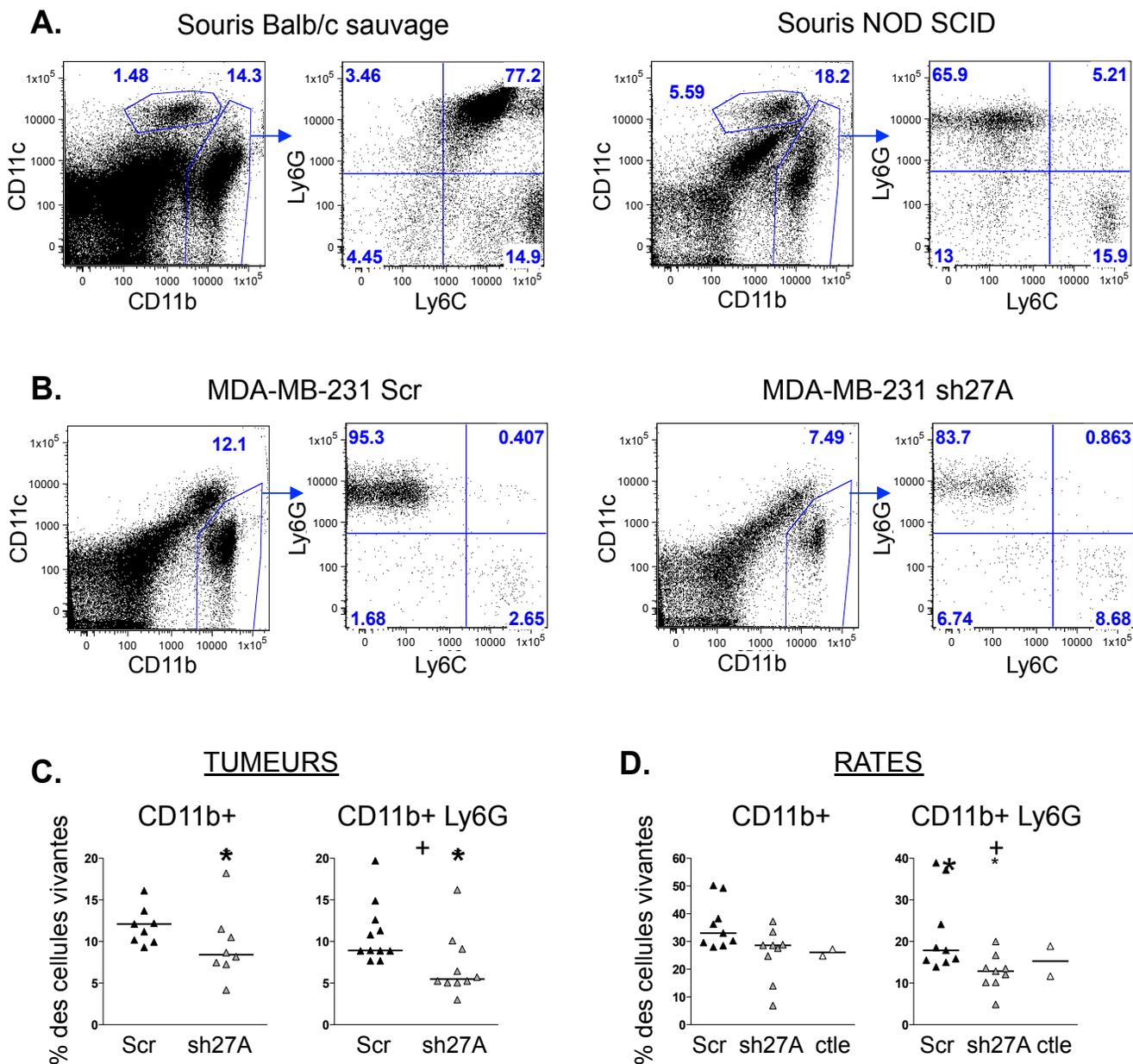


Figure 2.11 :Analyse des populations myéloïdes infiltrant les tumeurs et présentes dans les rates des souris portant une tumeur MDA-MB-231 Scr ou sh27A.

A. Comparaison de l'expression des marqueurs Ly6G et Ly6C par les cellules CD11b+ provenant de la rate d'une souris Balb/c sauvage (gauche) ou d'une souris Balb/c NOD SCID (droite). **B.** Exemples représentatifs des marquages CD11b, CD11c, Ly6G et Ly6C sur les cellules vivantes présentes dans les tumeurs MDA-MB-231 Scr et sh27A. **C.** Quantification des populations CD11b+ et CD11b+/Ly6G+ infiltrant les tumeurs à jour 33 (pourcentage parmi les cellules vivantes). **D.** Quantification des populations CD11b+ et CD11b+/Ly6G+ dans la rate de souris portant une tumeur (Scr et sh27A) ou de souris sans tumeur à jour 33 (pourcentage parmi les cellules vivantes). n=2 expériences indépendantes, avec 8 souris portant les tumeurs MDA-MB-231 Scr (Scr), 8 souris portant les tumeurs MDA-MB-231 sh27A (sh27A) et deux souris contrôles sans tumeur (ctle). La barre horizontale représente la médiane. Analyse statistique test t de student non paramétrique (Mann Whitney) pour les tumeurs et One-way ANOVA non paramétrique (Kruskal-Wallis), post test de Dunn pour les rates. * p<0,05.

4T1. En revanche, les mécanismes impliqués seront très certainement différents si nous confirmons que l'inhibition de RAB27A n'induit pas de diminution de la sécrétion des exosomes dans le modèle MDA.

Les populations immunitaires myéloïdes infiltrant les tumeurs MDA-MB-231 ont été analysées par FACS (les populations lymphoïdes sont absentes des souris NOD SCID dans lesquelles poussent les tumeurs et n'ont donc pas été recherchées) (**figure 2.11**). Les populations myéloïdes présentes dans les souris NOD SCID ne sont pas les mêmes que dans les souris sauvages : le marquage en FACS ne permet pas de mettre en évidence une population de neutrophiles exprimant à la fois Ly6C et Ly6G parmi les cellules exprimant le marqueur CD11b comme c'est le cas dans les souris sauvages (exemples de marquages sur les rates : **figure 2.11 A**). A l'inverse, une population CD11b+/Ly6G+/Ly6C- absente dans les souris sauvages, représente une population quantitativement importante parmi les cellules myéloïdes des souris NOD SCID. Nous pouvons supposer que cette population correspond ou tout du moins contient les neutrophiles, mais nous ne l'avons pas vérifié. Nous avons comparé les populations myéloïdes infiltrant les tumeurs MDA-MB-231 Scr et MDA-MB-231 sh27A, et avons pu montrer que la proportion de cellules CD11b+ infiltrant les tumeurs contrôles est significativement plus élevée que dans les tumeurs n'exprimant pas RAB27A. Tout comme dans le modèle 4T1 mais de façon moins flagrante, les tumeurs MDA-MB-231 dans lesquelles l'expression de RAB27A a été inhibée recrutent moins de cellules CD11b+ et plus particulièrement moins de celles exprimant le marqueur Ly6G (**figure 2.11 C**). Cette même population est aussi significativement augmentée dans la rate des souris portant une tumeur MDA-MB-231 contrôle mais pas dans la rate des souris portant une tumeur n'exprimant pas RAB27A (**figure 2.11 D**). Ainsi, l'inhibition de l'expression de RAB27A dans les cellules tumorales semble empêcher l'accumulation de cellules myéloïdes exprimant le marqueur Ly6G, comme nous l'avons mis en évidence dans le modèle 4T1. RAB27A pourrait donc dans ce modèle humain de cancer du sein, comme dans le modèle murin 4T1, jouer un rôle pro-tumoral en agissant sur le microenvironnement tumoral et plus particulièrement en influençant le recrutement de certaines populations myéloïdes.

d) Discussion

Les expériences préliminaires présentées dans cette partie avaient pour but d'étudier le rôle de RAB27A et RAB27B dans la sécrétion des exosomes par une lignée tumorale humaine et dans la croissance de ces cellules tumorales *in vivo*. Seule l'inhibition de l'expression de RAB27A a pu être réalisée de façon relativement spécifique (avec tout de même une diminution de 30% de l'expression de RAB27B). Cependant, l'analyse de l'expression des gènes RAB27A et RAB27B par qRT-PCR n'a été effectuée qu'à un seul temps après introduction des shRNA et dans une seule expérience seulement. Il faudra donc réévaluer l'effet des shRNA sur l'expression de RAB27A et de RAB27B afin de s'assurer de leur spécificité.

L'inhibition de l'expression de RAB27A n'a pas diminué, voire a augmenté, la sécrétion des exosomes par les cellules MDA-MB-231. Cependant, dans les deux expériences que nous avons réalisées, la quantité d'exosomes sécrétée par les cellules MDA-MB-231 Scr est étonnamment basse, et nous préfèrerions confirmer les résultats obtenus avant de conclure quant au rôle (ou à l'absence de rôle) joué par RAB27A dans la sécrétion des exosomes par les cellules humaines MDA-MB-231.

Afin de pouvoir étudier la croissance de ces cellules humaines *in vivo*, nous les avons injectées dans des souris immunodéficientes, les souris Balb/c NOD SCID. Nous avons observé un net ralentissement de la croissance des tumeurs MDA-MB-231 n'exprimant pas la protéine RAB27A par rapport aux tumeurs contrôles. RAB27A semble donc jouer un rôle pro-tumoral dans ce modèle. D'autre part, les populations myéloïdes infiltrant les tumeurs semblent être modulées de façon similaire à ce que nous avons observé dans les tumeurs 4T1 en fonction de l'expression de RAB27A. En effet, des cellules myéloïdes exprimant les marqueurs CD11b et Ly6G s'accumulent dans les tumeurs MDA-MB-231 Scr et dans la rate des souris portant ces tumeurs. Cette accumulation semble être dépendante de l'expression de RAB27A par les cellules tumorales puisqu'elle n'est plus induite dans les souris portant une tumeur MDA-MB-231 sh27A. Cependant, dans le modèle 4T1, nous avons montré que les exosomes sécrétés de façon dépendante de Rab27a et associés à des facteurs solubles sont nécessaires à la modulation des populations immunitaires myéloïdes et à l'augmentation de la proportion de cellules de type granulocytes neutrophiles. Or ici, nous n'avons pu mettre en évidence de réduction de la sécrétion des exosomes suite à l'inhibition de l'expression de RAB27A, favorisant l'hypothèse d'un mécanisme

indépendant des exosomes et donc différent de celui discuté dans le modèle 4T1. Nous n'avons pas encore évalué le rôle de RAB27A dans la sécrétion de facteurs solubles par les cellules MDA-MB-231, et il sera important de le faire par la suite. De plus, C. Recchi travaillant dans le laboratoire de M. Seabra travaille sur l'effet de l'inhibition de RAB27A sur les capacités migratoires ces cellules MDA-MB-231. Les résultats qu'elle obtient montrent que les cellules MDA-MB-231 dans lesquelles l'expression de RAB27A est inhibée sécrètent moins de la métalloprotéase MTA-MMP, de façon semble-t-il indépendante des exosomes. Ces cellules présentent alors des capacités réduites de migration en matrigel. Ainsi, nous ne pouvons pas négliger dans ce modèle, comme précédemment dans les modèles 4T1 et TS/A, le rôle de RAB27A dans les voies de sécrétion classiques.

Concernant la réponse immunitaire induite par les tumeurs MDA-MB-231 exprimant ou non RAB27A, deux aspects principaux compliquent l'élaboration d'un mécanisme et la comparaison avec ce que nous avons montré dans le modèle 4T1 : (1) Nous utilisons ici un modèle de souris immunodéficientes (souris NOD SCID) afin d'éviter le rejet des cellules MDA-MB-231 uniquement pour la raison qu'elles sont d'origine humaine. Ainsi, la croissance des cellules MDA-MB-231 est volontairement étudiée dans un contexte où la réponse immunitaire adaptative est absente. Nous ne pouvons donc pas analyser la réponse immunitaire tumorale dans sa globalité comme nous l'avons fait avec les tumeurs 4T1. Il est tout de même possible d'étudier la réponse immunitaire innée et notamment les populations myéloïdes qui nous ont intéressés dans le modèle 4T1, mais dans des conditions qui restent différentes de celles existant dans une souris sauvage avec un système immunitaire complet. La différence de croissance entre les tumeurs 4T1-Scr et les tumeurs 4T1-sh27A avait tout de même été mise en évidence aussi bien dans les souris immunodéficientes $RAG\gamma c^{-/-}$ que dans les souris sauvages. Ainsi, si le même type de mécanisme de modulation du système immunitaire existe dans le modèle MDA-MB-231, il devrait pouvoir être mis en évidence dans les souris NOD SCID. Mais l'inconvénient de ces souris est que, en plus de l'absence des populations lymphoïdes LT, LB et NK, les populations myéloïdes ne semblent pas être les mêmes que celles observées dans les souris sauvages. En effet, dans les souris NOD SCID nous n'avons pas pu mettre en évidence une population de neutrophiles exprimant les deux marqueurs Ly6G et Ly6C. En revanche, nous avons vu une population exprimant uniquement le marqueur Ly6G, qui n'existe pas dans les souris

sauvages et qui pourrait éventuellement correspondre aux neutrophiles, mais avec un phénotype différent et donc peut-être une fonctionnalité différente. (2) Nous travaillons avec un modèle de tumeur humaine dans un hôte murin. Les facteurs solubles et vésiculaires produits par les cellules tumorales sont donc des facteurs humains, mais les molécules qui pourraient servir de récepteurs à ces facteurs sont des protéines murines. De nombreuses voies de communication et de signalisation existant entre la tumeur et son hôte via la sécrétion de facteurs solubles et vésiculaires ne pourront certainement pas se mettre en place correctement entre une tumeur humaine et un hôte murin. Etant donné que nous avons tout de même constaté un effet de l'inhibition de l'expression de RAB27A sur la croissance tumorale, il pourrait être intéressant de chercher les facteurs sécrétés (probablement sous forme soluble) potentiellement impliqués ici. Nous pouvons supposer que ces facteurs humains possèdent la capacité d'agir chez la souris, ce qui pourrait éventuellement restreindre l'éventail de possibilités.

Ainsi, si RAB27A semble jouer un rôle pro-tumoral dans le modèle MDA-MB-231, et si le mécanisme immunitaire impliqué ici ressemble à celui observé dans le modèle 4T1, des expériences complémentaires doivent être mises en place afin de vérifier ces premiers résultats et de mettre en évidence les mécanismes cellulaires et moléculaires.

III. DISCUSSION

A- RESUME DES RESULTATS

Les travaux effectués au cours de ma thèse m'ont permis d'étudier divers aspects de la biologie cellulaire et de l'immunologie des tumeurs, en lien avec les exosomes. Dans le but d'étudier le rôle des exosomes dans la croissance tumorale, nous avons inhibé leur sécrétion en interférant avec l'expression de Rab27a dans des cellules tumorales murines. Cela nous a finalement menés vers trois angles d'étude (**Figure 1.24**) :

(1) Caractérisation des populations d'exosomes sécrétées en présence et en absence de Rab27a.

(2) Evaluation de l'implication de Rab27a dans la sécrétion d'autres types de vésicules et dans les voies de sécrétion des facteurs solubles.

(3) Etude du comportement des tumeurs n'exprimant pas Rab27a *in vivo*, par rapport aux tumeurs contrôles, du point de vue de la vitesse de croissance, de la dissémination métastatique et de la réponse immunitaire tumorale.

Nous avons dans un premier temps constaté que Rab27a était impliquée dans la sécrétion d'une population de vésicules présentes dans le culot d'ultracentrifugation à 100.000xg, mais d'autres populations dans ce culot sont sécrétées par une voie indépendante de Rab27a. Les populations de vésicules présentes dans le culot d'exosomes sont hétérogènes en taille, en densité et en composition protéique. Nous proposons que cette hétérogénéité pourrait être expliquée par différents mécanismes de biogenèse et de sécrétion des vésicules.

Dans un second temps, nous avons étudié la spécificité d'action de la protéine Rab27a dans la voie de sécrétion des exosomes. Pour cela, nous avons quantifié d'une part la sécrétion des plus grosses vésicules ou « microvésicules » (culot de 10.000xg) et d'autre part la sécrétion de différents facteurs solubles. Nous avons confirmé que Rab27a n'était pas impliquée dans la régulation de la sécrétion des vésicules plus grosses que les ILVs des MVBs et donc renforçant l'hypothèse qu'elles se forment par bourgeonnement de la membrane plasmique. En revanche, l'inhibition de Rab27a module la sécrétion de certains des facteurs solubles produits et libérés dans les milieux

de culture par les cellules. La plupart du temps cette sécrétion est augmentée par l'inhibition de Rab27a comme c'est le cas pour G-CSF (Csf3), KC (Cxcl1), MIP3 α (Ccl20) et MCP-1 (Ccl2). Il semble ainsi que Rab27a soit impliquée dans la voie de sécrétion régulée de plusieurs facteurs solubles : nous proposons qu'elle participerait à empêcher la sécrétion en absence de stimulus, l'inhibition de l'expression de Rab27a entraînerait ainsi une augmentation de sécrétion qui pourrait alors se produire indépendamment de la réception d'un signal par la cellule (sécrétion constitutive).

Enfin, le but de ce travail de thèse était d'étudier le rôle des exosomes sécrétés *in vivo* dans la croissance tumorale et dans la réponse immunitaire tumorale. Dans le modèle de carcinome mammaire peu immunogène et métastatique 4T1, nous avons montré que Rab27a jouait un rôle pro-tumoral, favorisant la croissance des tumeurs et la dissémination métastatique. En revanche, dans le modèle TS/A, Rab27a ne participe pas à la croissance tumorale. Des cellules de type neutrophiles ou myéloïdes suppressives sont recrutées par les tumeurs 4T1 de façon dépendante de l'expression de Rab27a. Cette population immunitaire ne s'accumule pas dans les tumeurs TS/A, montrant que ces tumeurs se comportent très différemment vis-à-vis du système immunitaire. Nous avons donc supposé que l'effet pro-tumoral de Rab27a dans le modèle 4T1 était dû à son rôle dans le recrutement de cellules immunitaires pouvant induire un environnement favorable à la croissance de la tumeur. Ce serait par son implication dans diverses voies de sécrétion que Rab27a permettrait le recrutement de cette population immunitaire. Par des expériences réalisées *in vitro* nous avons pu mettre en évidence l'action conjointe des facteurs solubles libérés par les tumeurs mais aussi des exosomes sécrétés de façon dépendante de Rab27a dans l'induction de la population de cellules neutrophiles/MDSCs, dans le modèle 4T1. Les données d'expression de *RAB27A* dans des biopsies de cancer du sein (de patientes de l'Hôpital Curie et à partir d'une banque publique de données) ont montré une surexpression de *RAB27A* dans les tumeurs humaines par rapport au tissu sain et plus particulièrement dans les tumeurs de stade avancé et de plus mauvais pronostic (ER- HER2-). Ceci corrèlerait avec un éventuel rôle pro-tumoral de *RAB27A* chez l'Homme, mais pas nécessairement dans tous les types de tumeurs, tout comme nous l'avons vu chez la souris.

Nous allons dans cette dernière partie du manuscrit discuter les limites de nos études et en comparer nos résultats avec les données de la littérature. Enfin, nous

exposerons les perspectives de ces travaux dans le but de répondre aux questions qui restent encore en suspens.

B- LES POPULATIONS DE VESICULES ET SOUS-POPULATIONS D'EXOSOMES

1/ Les limites du travail

Nous avons dans cette partie de mon projet de thèse étudié les différentes populations de vésicules sécrétées par les cellules, et co-purifiées dans le culot d'exosomes. Ce travail met en avant, comme d'autres l'ont fait avant, l'importance d'établir une définition précise des exosomes qui soit adoptée par l'ensemble de la communauté travaillant sur ces vésicules. Actuellement, aucune définition n'est admise de façon consensuelle. Selon nous, le principal critère permettant de définir une vésicule comme étant un « exosome » est son origine endosomale : les exosomes sont le résultat de la sécrétion des vésicules intraluminales contenues dans les MVBs. Les critères complémentaires sont la densité, la taille et la composition en protéines et lipides (et certainement bientôt acides nucléiques), qui sont le reflet des caractéristiques des ILVs.

Les exosomes sont des structures relativement difficiles à étudier : ces vésicules de l'ordre du nanomètre ne sont pas visibles en microscopie optique à fluorescence, ni directement par FACS (tout du moins pas par ceux qui sont à notre disposition dans le laboratoire) : ils sont trop petits par rapport à la résolution et aux capacités de détection de ces appareils. Ils ne peuvent être observés que par microscopie électronique à transmission, qui est une technique efficace, mais lourde à mettre en œuvre. Le nombre de protéines pouvant être co-marquées sur un même échantillon est limité et certains anticorps ne fonctionnent d'ailleurs pas après les traitements subis par les échantillons. Nous n'avons ainsi pu étudier que la localisation de CD9 de façon fiable, alors que nous aurions voulu comparer ce marquage au moins à celui de CD63.

Nous avons voulu étudier les différentes populations de vésicules présentes dans les culots d'exosomes, mais il n'existe pas de techniques permettant de séparer de façon satisfaisante les vésicules dont la taille peut varier entre 30 et 150 nm de diamètre, ce qui est le cas des exosomes. Pour cette raison, il est difficile d'étudier ces populations de

vésicules individuellement et de les comparer entre elles. La flottaison des vésicules sur un gradient de sucrose semble être l'une des meilleures façons de séparer au moins quelques unes de ces sous-populations. Cependant, il n'y a pas eu d'étude réalisée afin d'évaluer les différentes possibilités de séparation des populations de vésicules, et de définir le meilleur protocole à utiliser dans ce but (temps de centrifugation, paliers de densité des fractions du gradient). Il faudra donc caractériser les populations de vésicules obtenues en fonction des divers protocoles de séparation et évaluer ce que l'on considère comme des sous-populations distinctes ou non et si toutes sont des exosomes ou non. Un inconvénient technique des gradients de sucrose est qu'il est plus difficile de détecter certains marqueurs : le matériel étant réparti entre plusieurs fractions, seules les protéines très enrichies ou contre lesquelles il existe de bons anticorps (bonne affinité et spécificité) seront détectables sur les fractions des gradients de sucrose. Nous n'avons ainsi dans notre étude pas pu mettre en évidence la localisation des marqueurs Tsg101, Alix, et Hsc70, et parfois même de Mfge8 dans les fractions des gradients de sucrose.

Enfin, une limite de notre étude, qui est vraie pour l'ensemble des résultats que nous avons présentés est le fait que nous n'avons utilisé qu'un seul shRNA afin d'inhiber l'expression de Rab27a ou de Rab27b. Nous avons pensé que les effets non spécifiques des shRNA, s'il y en avait, consisteraient principalement à inhiber l'expression de l'autre isoforme : l'ARNm le plus proche de *Rab27a* étant celui de *Rab27b* et vice versa. Nous avons en effet observé que la plupart des shRNA testés modulait l'expression des deux isoformes. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous n'avons pu utiliser qu'un seul shRNA pour inhiber spécifiquement l'expression de Rab27a ou de Rab27b. De plus, l'absence d'anticorps reconnaissant très spécifiquement Rab27a et de Rab27b a rendu difficile la vérification de l'expression au niveau de la protéine. Si nous avons finalement pu en obtenir un pour Rab27a utilisable en western blot (Mr. Seabra (Tolmachova et al., 2004)), cela n'a pas été le cas pour Rab27b et nous n'avons donc pas pu quantifier cette isoforme dans nos cellules. Le risque d'un autre effet non spécifique par le shRNA reste possible et il serait plus prudent de confirmer nos résultats en induisant l'expression d'un dominant négatif de la protéine Rab27a ou de la protéine Rab27b ou encore en réalisant des expériences de complémentation par l'introduction d'ARNm de Rab27a ou Rab27b résistants aux shRNA dans les cellules exprimant ces shRNA.

2/ Comparaison avec les données de la littérature

a) Hétérogénéité des vésicules dans les culots d'exosomes

De nombreux travaux avaient précédemment mis en évidence l'hétérogénéité des vésicules présentes dans les culots d'exosomes : les images obtenues en microscopie électronique à transmission des exosomes purifiés à partir des milieux de culture de lymphocytes B transformés par le virus EBV (Raposo et al., 1996), des cellules dendritiques (Thery et al., 1999; Zitvogel et al., 1998), des plaquettes (Heijnen et al., 1999), des cellules épithéliales intestinales (van Niel et al., 2001), des cellules tumorales (Andre et al., 2002b; Wolfers et al., 2001), des lymphocytes T (Blanchard et al., 2002), des cellules microgliales (Potalicchio et al., 2005) et neuronales (Faure et al., 2006). L'étude de la répartition de certains marqueurs après séparation des vésicules sur un gradient de sucrose montre que ceux-ci ne se répartissent pas de façon identique entre les différentes fractions. Ainsi, une étude réalisée sur les exosomes de LB montre que les molécules du CMH II sont plus fortement enrichies dans la fraction de densité 1,13 g/mL, que CD82 se répartit de façon égale dans les fractions de densité 1,12 et 1,13 g/mL et enfin, que CD81 se trouve majoritairement dans les fractions 1,13 et 1,14 g/mL (Escola et al., 1998). Une autre étude réalisée sur les exosomes du liquide séminal (appelés prostasomes) montre aussi une répartition inégale des marqueurs CD9 et PSCA (Prostate Stem Cell Antigen) entre les différentes fractions de vésicules obtenues après séparation en fonction de la taille par chromatographie d'exclusion (Aalberts et al., 2012). Plusieurs de ces fractions ont été groupées puis soumises à une séparation sur gradient de sucrose pendant 16 heures. De nouveau, les deux marqueurs ont un profil de répartition différent dans les diverses fractions: CD9 est plus enrichi dans les fractions denses de 1,23 à 1,26 g/mL, alors que PSCA, qui est aussi présent dans ces mêmes fractions, est fortement détecté dans les fractions de densité 1,12-1,14 g/mL. Cette étude montre aussi que si la flottaison dans le gradient est réalisée pendant 32 heures au lieu de 16 heures, alors, ces deux marqueurs présentent finalement un même profil de répartition en fonction de la densité, et ils sont tous les deux principalement enrichis dans les fractions 1,12-1,20 g/mL. Ainsi, les vésicules flottant à des densités élevées après seulement 16 heures de centrifugation dans le gradient n'avaient pas atteint leur équilibre et présentent un « retard de flottaison ». L'étude en microscopie électronique à transmission montre que ces vésicules se différencient aussi par leur taille : 56 ± 13 nm

de diamètre pour les vésicules de forte densité, et 105 ± 25 nm de diamètre pour celles de plus faible densité. Ainsi, au moins deux populations de prostasomes existent. Pourtant ces deux populations présentent les deux marqueurs CD9 et PSCA (même si les proportions peuvent éventuellement varier) et ont la même densité après centrifugation à l'équilibre. Mais elles sont différentes en taille, en densité apparente après une flottaison de 16 heures sur le gradient de sucrose et une analyse plus poussée de leur composition a mis en évidence la présence de certaines protéines exclusivement présentes sur l'une ou l'autre de ces populations. Enfin, une autre étude avait aussi montré la possibilité pour une même cellule de sécréter deux populations de vésicules présentant les caractéristiques des exosomes et pourtant bien distinctes (van Niel et al., 2001). Dans cette étude, les auteurs ont analysé les exosomes sécrétés par des cellules épithéliales, en distinguant et en comparant les vésicules sécrétées au niveau du pôle basal et celles produites au niveau du pôle apical. Ces deux populations de vésicules sont différentes par leur morphologie, leur taille et leur composition.

Nos résultats s'inscrivent donc dans la lignée de ces précédents travaux, et nous montrons aussi la présence de différentes populations d'exosomes sécrétés par les cellules épithéliales tumorales 4T1. L'observation qui nous a amenés à étudier la présence éventuelle de différentes populations de vésicules est la différence de comportement de certains marqueurs exosomaux après inhibition de Rab27a : alors que CD63, Hsc70 et Tsg101 sont diminués dans les culots d'exosomes des cellules n'exprimant pas Rab27a, CD9 et Mfge8 ne sont pas modifiés. Ceci n'avait pas été observé dans l'étude réalisée dans le laboratoire avec les cellules humaines HeLa (Ostrowski et al., 2010) puisque les marqueurs CD9 et Mfge8 n'avaient pas été utilisés pour quantifier la sécrétion des exosomes des cellules exprimant ou non RAB27A (faute de bons anticorps). La séparation sur gradient de sucrose (après 16 heures et 32 heures de centrifugation) ainsi que l'analyse en microscopie électronique à transmission de la taille et de la morphologie des vésicules dans les culots d'exosomes des cellules exprimant ou non Rab27a nous ont permis de mettre en évidence au moins deux populations de vésicules dans ces culots. L'observation de marqueurs spécifiquement présents dans certaines des sous-populations de vésicules identifiées dans les travaux précédents (Aalberts et al., 2012; van Niel et al., 2001) indiquait que des mécanismes de biogénèse différents pouvaient être impliqués dans la formation de ces vésicules. Nos résultats renforcent cette hypothèse en montrant que certaines vésicules nécessitent la

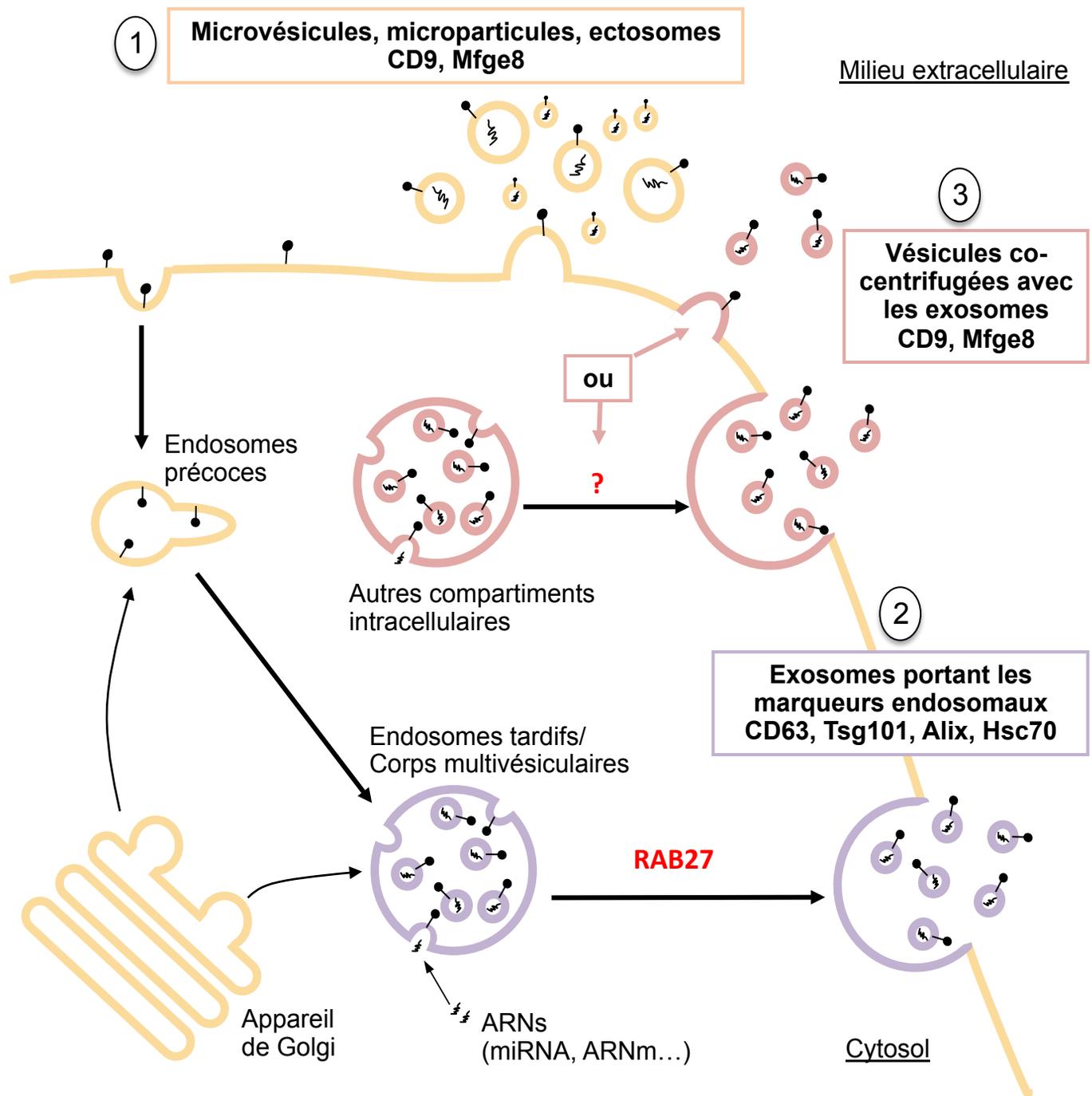


Figure 3.1 : Schématisation des voies de sécrétion des différentes populations de vésicules extracellulaires.

(1) Les cellules produisent des vésicules de taille très hétérogènes par bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique : les microvésicules, les microparticules et les ectosomes. (2) D'autre part, les cellules sécrètent des exosomes, vésicules classiquement purifiées par des ultracentrifugations successives se terminant par une centrifugation à 100.000xg. Nous avons montré qu'une partie des vésicules ainsi purifiées semblait bien correspondre à des exosomes : leur sécrétion est dépendante de Rab27a (indiquant fortement une origine endosomale) et elles portent des marqueurs d'endosomes. (3) Une autre partie de ces vésicules est cependant produite de façon indépendante de Rab27a et elles portent les marqueurs Mfge8 et CD9 mais pas les marqueurs endosomaux. Nous ne savons pas si ces vésicules se forment dans des compartiments intracellulaires ou au niveau de la membrane plasmique.

présence de Rab27a pour pouvoir être sécrétées, alors que d'autres sont libérées dans le milieu extracellulaire selon un mécanisme indépendant de Rab27a. Nous pensons que les vésicules sécrétées de façon dépendante de Rab27a correspondent le mieux à la définition des exosomes de par leur très probable origine endosomale. En revanche, nous ne savons pas si les vésicules co-centrifugées proviennent de la sécrétion d'autres compartiments intracellulaires de façon indépendante de Rab27a, ou d'un bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique, et si elles sont ou non des exosomes. Pour résumer tout ceci, j'ai représenté dans la **figure 3.1** les différents types de vésicules extracellulaires produites par les cellules, ainsi que leurs voies de sécrétion: (1) les microvésicules, microparticules et ectosomes qui bourgeonnent à la membrane plasmique, (2) les exosomes qui sont formés dans les MVBs puis libérés par fusion avec la membrane plasmique, et enfin (3) les autres vésicules co-purifiées avec les exosomes et dont l'origine n'a pas été déterminée.

b) Les marqueurs d'exosome : quelle spécificité ?

Le protocole classique de purification des exosomes indique que, après les étapes de purification par ultracentrifugation différentielle, la présence des exosomes dans les culots doit être vérifiée par microscopie électronique à transmission et par la détection de « marqueurs d'exosomes » par western blot. Les différentes protéines que nous avons utilisées comme des marqueurs d'exosomes : CD9, Mfge8, CD63, Hsc70, Alix, et Tsg101 ont été découvertes dans les exosomes lors d'études protéomiques réalisées en 1999 et 2001 (Thery et al., 2001; Thery et al., 1999). Nous avons confirmé leur enrichissement dans les exosomes des lignées tumorales murines 4T1, TS/A et MCA par rapport aux lysats cellulaires. De nombreux autres marqueurs des exosomes ont été caractérisés et sont répertoriés sur le site internet Exocarta (Mathivanan and Simpson, 2009) et bientôt sur les sites EVpedia et vesiclepedia. Cependant, nous montrons ici que certains de ces marqueurs, CD9 et Mfge8, ne sont pas spécifiques des exosomes : ils sont enrichis sur les plus petites vésicules présentes dans les culots d'exosomes et aussi sur les microvésicules qui sont purifiées après une centrifugation à 10.000xg (pendant 30 min) (**Figure 3.1**). Nous n'avons pu détecter de façon fiable la présence d'autres marqueurs sur les plus petites vésicules en microscopie électronique à transmission. En revanche nous avons pu mieux caractériser les microvésicules par western blot et

montrer que les marqueurs CD63, Alix, Hsc70 ou Tsg101 n'y sont pas (ou très peu) présents. Ces résultats permettent de rappeler que le terme « marqueur exosomal » signifie que les protéines ainsi qualifiées sont très abondantes sur les exosomes, mais cela ne signifie pas qu'elles permettent d'identifier spécifiquement les exosomes et de les distinguer des autres vésicules, contrairement à l'utilisation qu'en font de nombreuses personnes.

3/ Perspectives

Nous avons identifié différentes populations d'exosomes en fonction de : (1) leur mode de sécrétion dépendant ou non de Rab27a, (2) leur différence de comportement dans le gradient de sucrose (densité et retard de flottaison), (3) leur taille évaluée en microscopie électronique, (4) la proportion des différents marqueurs qu'elles contiennent. Pour approfondir l'étude, nous pourrions caractériser plus complètement les différentes fractions de vésicules qui sont séparées après 16 heures de centrifugation sur le gradient de sucrose (et notamment les vésicules qui n'ont pas encore atteint la densité d'équilibre par rapport à celles qui l'ont déjà atteinte). Il serait notamment intéressant d'analyser leur morphologie en microscopie électronique à transmission, et leur composition en protéines, lipides et acides nucléiques. Les fonctions des différentes populations ainsi identifiées seront ensuite étudiées. Dans un premier temps, nous nous intéresserions plus particulièrement à leurs effets sur les cellules du système immunitaire.

Nous aurions aussi souhaité séparer et caractériser d'une part les vésicules sécrétées de façon dépendante de Rab27a et d'autre part celles sécrétées de façon indépendante de Rab27a. Nous n'avons actuellement pas les outils nous permettant de faire cela. En revanche, en approfondissant la caractérisation et la comparaison entre les vésicules sécrétées par les cellules exprimant ou non Rab27a, nous pourrions éventuellement mettre en évidence des marqueurs spécifiques de chacun des deux types de vésicules. Dans les études réalisées sur les prostasomes et les cellules épithéliales des marqueurs spécifiques de chacune des populations d'exosomes ont été mis en évidence par analyse protéomique (Aalberts et al., 2012; van Niel et al., 2001) et la présence de deux d'entre elles a été confirmée par western blot : GLIPR2 (glioma pathogenesis related 2) et Annexine A1. Ces marqueurs pourraient donc être recherchés dans les

culots d'exosomes des cellules exprimant ou non Rab27a. Les marqueurs CD63, Alix, Hsc70 et Tsg101 semblent aussi de bons candidats en tant que possibles marqueurs spécifiques de la population sécrétée de façon dépendante de Rab27a, étant donnée la forte diminution de leur présence dans les culots d'exosomes après inhibition de Rab27a. Ils sont tout de même encore détectables dans ces culots, ce qui peut s'expliquer par une sécrétion résiduelle de la population de vésicules via les quelques protéines Rab27a encore produites dans ces cellules (l'inhibition par le shRNA n'est pas de 100%) ou alors par leur présence sur les autres vésicules sécrétées de façon indépendante de Rab27a. Nos données ne permettent pour le moment pas de conclure, une analyse en microscopie électronique avec de bons anticorps pourrait éventuellement nous aider à déterminer s'ils sont des marqueurs restrictifs ou non. Il pourrait aussi être intéressant de séparer avec des billes couplées à un anticorps anti-CD63 les populations exprimant ou non CD63 et de comparer ce que l'on obtient à partir des culots d'exosomes des cellules contrôles ou de cellules n'exprimant pas Rab27a. Enfin, une technique d'analyse des exosomes par cytométrie en flux (avec le cytomètre BD Influx™) est actuellement utilisée dans le laboratoire de W. Stoorvogel et elle est en train d'être perfectionnée afin de pouvoir analyser de plus en plus de paramètres. Actuellement, elle permet de distinguer des populations d'exosomes en fonction de leur taille et de leur composition (deux marqueurs peuvent être analysés en même temps) (Hoen et al., 2011). L'utilisation de cette nouvelle technique pour comparer les populations de vésicules présentes dans les culots d'exosomes des cellules exprimant ou non Rab27a pourrait nous permettre de mieux les caractériser.

Les lipides et acides nucléiques, en plus des protéines seront aussi certainement différents d'une population de vésicules à l'autre. Lorsque nous serons capables de séparer efficacement les différentes populations de vésicules, il faudra analyser leur composition en lipides et surtout en acides nucléiques. Il existe des lipides fluorescents qui marquent différentes membranes et organites de la cellule en fonction de leur composition en lipides et de leur fluidité. Les lipides fluorescents qui se concentrent dans les compartiments endosomaux se retrouvent ensuite dans les exosomes. Une étude a montré que lorsque les exosomes de certaines cellules leucémiques sont isolés en fonction de leur composition en CMH II, en CD81 et en CD63 (avec des billes couplées à des anticorps reconnaissant spécifiquement ces protéines), ils ne présentent pas le même enrichissement pour les trois différents lipides fluorescents utilisés (Laulagnier et

al., 2005). Etant donné que chacun de ces marqueurs était présent dans des compartiments distincts de la cellule, ces résultats semblent indiquer que les populations d'exosomes mises en évidence sont le résultat de différentes voies de biogenèse. Les résultats d'expériences réalisées à l'aide de marqueurs lipophiles fluorescents doivent cependant toujours être regardés avec précaution dans le sens où des agrégats de ces marqueurs peuvent être co-centrifugés avec les exosomes, et un marquage non spécifique assez important est d'ailleurs visible dans l'une des expériences de cette publication. Ces méthodes sont donc intéressantes mais doivent être utilisées avec prudence et en combinaison avec les autres techniques plus classiques (microscopie électronique, western blot, gradient de sucrose).

Pour finir, nous avons montré que des marqueurs classiques des exosomes, CD9 et Mfge8, sont aussi fortement enrichis sur les microvésicules purifiées à 10.000xg. De plus, ces deux marqueurs ne sont pas affectés par l'inhibition d'expression de Rab27a alors que les autres marqueurs sont diminués dans les culots d'exosomes. La plupart des marqueurs d'exosomes identifiés et désormais répertoriés sur le site internet Exocarta, n'ont pas été analysés sur les microvésicules et ils n'ont souvent pas non plus été analysés après séparation des vésicules sur un gradient de sucrose. Une réanalyse de la présence de ces marqueurs sur les exosomes, les microvésicules et sur les vésicules sécrétées de façon dépendante ou indépendante de Rab27a doit être réalisée par la suite afin de mieux connaître les marqueurs que nous utilisons.

C- LE ROLE DES PROTEINES RAB27 DANS LES VOIES DE SECRETION

1/ Les limites du travail

Nous avons étudié le rôle des protéines Rab27a et Rab27b dans les voies de sécrétion des exosomes, des microvésicules et des protéines solubles dans différentes lignées tumorales murines. L'expression des protéines Rab27a et Rab27b a été inhibée à l'aide de shRNA par infection lentivirale. Nous avons ensuite quantifié les exosomes (protéines totales ou marqueurs exosomaux), les microvésicules (idem) et un certain nombre de facteurs solubles (crible de 144 protéines Cytokine Antibody Microarray, ELISA, CBA/Luminex). Nous avons ainsi montré que Rab27a était nécessaire à la

sécrétion des exosomes mais pas à celle des microvésicules, et participait à la sécrétion de plusieurs facteurs solubles. Nous n'avons cependant pas étudié de façon exhaustive le rôle de Rab27a dans la sécrétion des facteurs solubles : nous avons ciblé notre étude sur les facteurs de croissance, cytokines et chimiokines, et nous n'avons mesuré de façon quantitative qu'une partie des protéines identifiées sur les membranes du crible et n'avons donc pas validé tous les résultats obtenus par le criblage. Nous avons ainsi quantifié la sécrétion de G-CSF, KC, MCP-1, MIP3 α et Cxcl16, mais les métalloprotéases MMP2 pour TS/A, MMP3 et pro-MMP9 pour 4T1 ont aussi une sécrétion qui semble être affectée par l'inhibition de Rab27a et nous ne les avons pas étudiées plus en détails.

Ce qui ressort de cette étude, est la diversité des rôles que joue la protéine Rab27a dans plusieurs voies de sécrétion. Toutefois, nous n'avons pas approfondi ces résultats avec d'autres méthodes de biologie cellulaire : étude en microscopie à fluorescence des compartiments intracellulaires arborant Rab27a (responsables de la sécrétion des exosomes ou des facteurs solubles) et leur caractérisation, analyse des mouvements de ces compartiments de sécrétion et de leur ancrage à la membrane plasmique par microscopie à ondes évanescentes par exemple. L'absence d'anticorps spécifiques de Rab27a utilisables en microscopie complique l'étude des compartiments qui recrutent cette protéine : il est alors nécessaire d'introduire dans les cellules un plasmique codant la protéine Rab27a fusionnée à une protéine fluorescente comme la GFP. Ceci conduit donc à une surexpression de Rab27a, et ne permet pas de visualiser directement la localisation de la protéine endogène, mais c'est un moyen fréquemment utilisé en biologie cellulaire pour étudier la localisation de certaines protéines.

2/ Comparaison avec les données de la littérature

a) Les protéines Rab et la sécrétion des exosomes

Nous avons mis en évidence un rôle de la protéine Rab27a dans la sécrétion des exosomes, ou d'une population d'exosomes, mais pas dans la sécrétion des microvésicules, par trois lignées tumorales murines : MCA, TS/A et 4T1. En revanche, Rab27b ne participe pas à cette voie de sécrétion contrairement à ce qui a été montré dans la lignée humaine HeLa. Dans la lignée MDA-MB-231 (humaine), aucune des deux isoformes ne semble participer à la sécrétion des exosomes, même si ces résultats restent à confirmer. Ainsi, nos données soulignent la variété des voies de sécrétion et

des acteurs moléculaires impliqués dans ces voies selon les cellules considérées : espèce, type cellulaire, modèle tumoral et caractéristiques propres à ce modèle par rapport à un autre. Comme nous l'avons vu en introduction, les données que l'on trouve dans la littérature sur les possibles mécanismes de biogenèse des vésicules intraluminales dans les MVBs pointent aussi vers une diversité des mécanismes de biogenèse des exosomes. Chaque type cellulaire pourrait donc utiliser l'un ou plusieurs de ces mécanismes, et il est probable qu'il n'y ait pas un mécanisme généralisable à tous les types cellulaires tout comme il n'existe peut-être pas non plus une voie qui soit spécifique de la sécrétion des exosomes. Dans la famille des petites GTPases Rab, Rab11 et Rab35 peuvent participer à la sécrétion des exosomes. Rab11 semble être principalement impliquée dans une voie de sécrétion régulée (et non constitutive) des exosomes dans une lignée leucémique érythrocytaire (Savina et al., 2005). Dans cette étude, les auteurs montrent d'ailleurs que ce rôle de Rab11 dépend du type cellulaire considéré et du niveau d'expression de Rab11, tout comme nous observons que Rab27a et Rab27b ne sont pas impliqués dans la sécrétion des exosomes par tous les types cellulaires. Rab35 est nécessaire à la sécrétion de vésicules portant la PLP (protéine protéolipide) par les oligodendrocytes (Hsu et al., 2010). Cependant dans cette étude, les vésicules étudiées n'ont pas été caractérisées par microscopie électronique, ni par western blot (recherche des marqueurs classiques d'exosomes). Il n'est ainsi pas connu si cette protéine est impliquée dans la sécrétion des exosomes par plusieurs types cellulaires, ou uniquement dans la sécrétion d'une population particulière de vésicules ou d'exosomes, sécrétée par les oligodendrocytes. Le criblage sur les protéines Rab réalisé au laboratoire n'avait pas permis de mettre en évidence un rôle de Rab11 et de Rab35 dans la sécrétion des exosomes par les cellules tumorales humaines HeLa.

Pour cette raison, et de par les informations données dans les articles décrivant leur rôle dans la sécrétion des exosomes, nous avons pensé que Rab11 et Rab35 participaient à la sécrétion des exosomes dans des cellules et dans des conditions particulières, et nous avons choisi pour notre projet d'interférer avec l'expression de Rab27a et Rab27b pour moduler la sécrétion des exosomes. Nous montrons finalement que Rab27a et Rab27b ne sont pas non plus impliquées dans la sécrétion des exosomes dans tous les types cellulaires, et dans ces cas-là d'autres Rab pourraient alors remplir ce rôle. En conclusion, il est important de vérifier l'effet de l'inhibition de Rab27a et

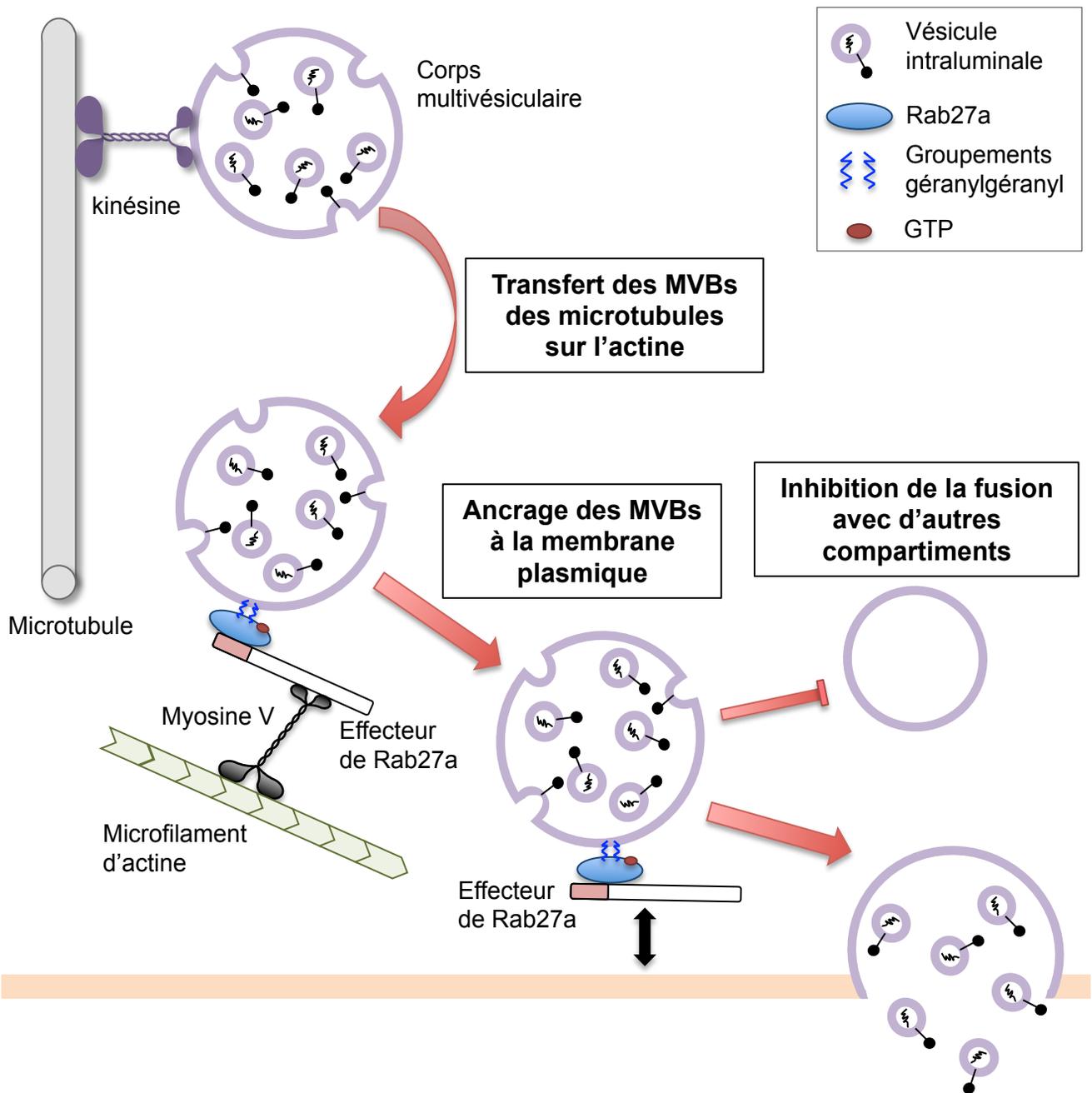


Figure 3.2 : Hypothèse sur les mécanismes moléculaires impliquant Rab27a dans la voie de sécrétion des exosomes.

Les corps multivésiculaires sont transportés dans le cytoplasme vers la périphérie cellulaire le long des microtubules par des moteurs moléculaires comme les kinésines. Rab27a pourrait participer au transfert des MVBs vers le cytosquelette d'actine sous-cortical, rôle joué par Rab27b dans les cellules HeLa. Rab27a recruterait pour cela un effecteur capable d'interagir avec la myosine, moteur moléculaire présent sur les microfilaments d'actine. Les MVBs atteignent ainsi la membrane plasmique sur laquelle ils vont s'ancrer avant de fusionner. Rab27a pourrait à ce niveau-là participer à l'ancrage en recrutant un autre effecteur capable d'interagir directement avec la bicouche lipidique (PS) ou avec des protéines associées à celle-ci (syntaxines, SNAP). Après cette étape d'ancrage suit l'étape de fusion, libérant les ILVs dans le milieu extracellulaire. D'autre part, comme il avait été proposé dans les cellules HeLa, Rab27a pourrait empêcher la fusion des MVBs entre eux ou avec d'autres compartiments intracellulaires, leur permettant de fusionner avec la membrane plasmique.

Rab27b sur la sécrétion des exosomes, et sur les autres types de sécrétion, avant de les utiliser pour étudier les fonctions physiologiques des exosomes.

b) Rab27a et la sécrétion des exosomes

Nous avons montré dans plusieurs modèles cellulaires murins que Rab27a était nécessaire à la sécrétion des exosomes. Du point de vue mécanistique, notre hypothèse est que Rab27a agirait de la même façon que dans les cellules HeLa : elle permettrait l'ancrage des MVBs à la membrane plasmique et/ou empêcherait la fusion des MVBs entre eux (leur permettant de fusionner avec la membrane cellulaire). De plus, la protéine Rab27b n'étant pas impliquée dans la sécrétion des exosomes par les lignées murines alors qu'elle l'était dans les cellules humaines, nous pouvons imaginer que dans ces cellules Rab27a jouerait aussi le rôle endossé par RAB27B dans les cellules humaines : le transfert des MVBs depuis le cytosquelette de microtubules vers le cytosquelette cortical d'actine (en plus du rôle d'ancrage) (**Figure 3.2**). Ainsi, le mécanisme de sécrétion des MVBs serait alors semblable au mécanisme de sécrétion des mélanosomes dans lesquels Rab27a est à la fois impliquée dans le transport des mélanosomes vers la périphérie de la cellule (Fukuda et al., 2002b; Wu et al., 2002), et dans l'ancrage de ces compartiments à la membrane plasmique (Kuroda and Fukuda, 2004).

c) Rab27a et la sécrétion de facteurs solubles

Nous avons montré dans les modèles TS/A et 4T1 que la protéine Rab27a, en plus de participer à la voie de sécrétion des exosomes portant des marqueurs endosomaux, participe à la sécrétion de facteurs solubles. L'inhibition de l'expression de Rab27a, lorsqu'elle module la sécrétion d'un facteur soluble, entraîne dans la majorité des cas une augmentation de cette sécrétion. Cet effet est donc opposé à celui observé sur la sécrétion des exosomes, indiquant un rôle différent de Rab27a dans le mécanisme moléculaire de chacune de ces voies de sécrétion. Tous les facteurs solubles n'ont pas la même dépendance vis-à-vis de l'expression de Rab27a : selon les résultats du crible sur membrane, la plupart des chimiokines sécrétées par les cellules 4T1 et TS/A le sont de façon indépendante de Rab27a. Notre hypothèse est donc que Rab27a serait d'une part

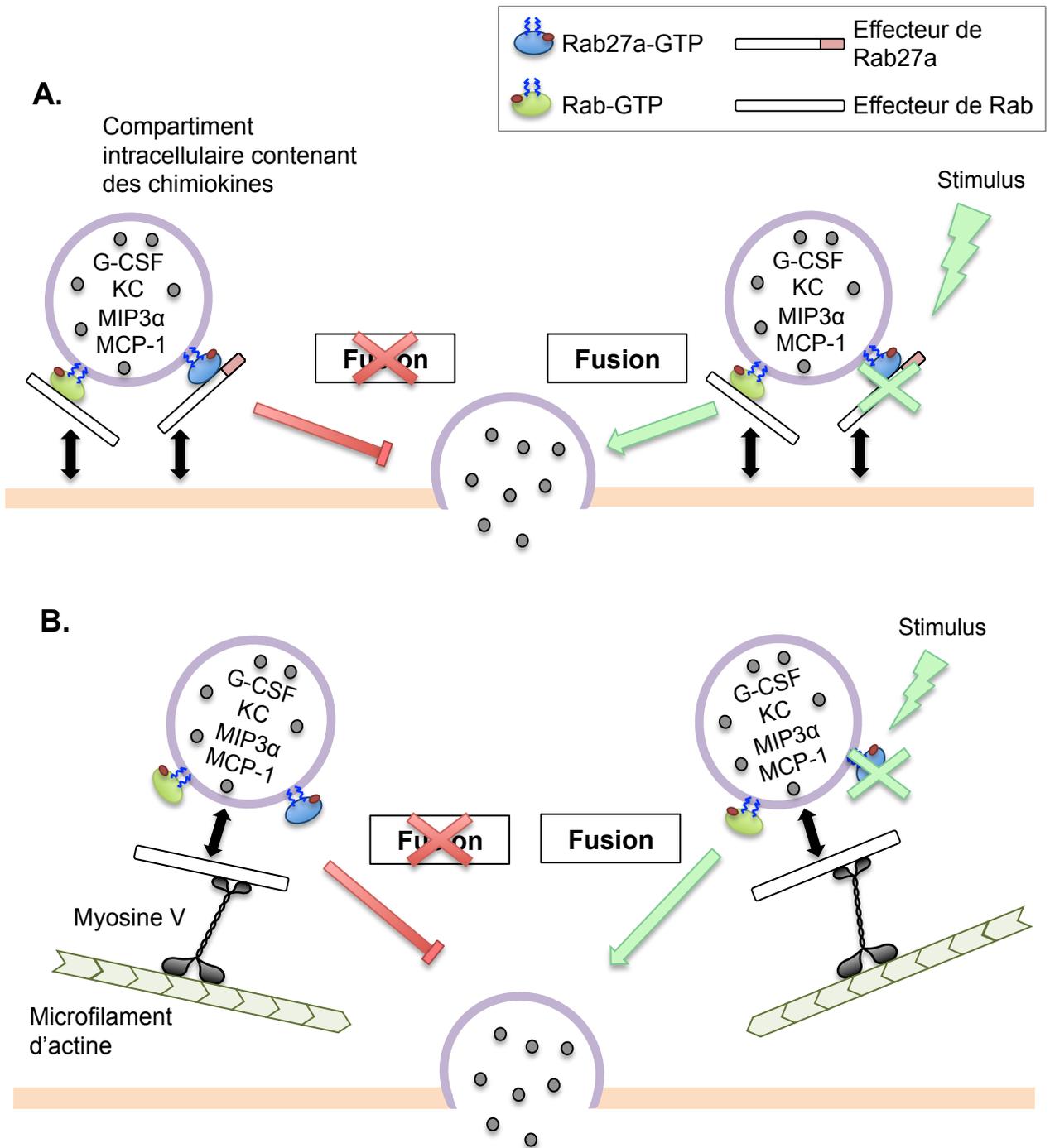


Figure 3.3 : Hypothèses sur les mécanismes moléculaires impliquant Rab27a dans la voie de sécrétion des facteurs solubles.

Nos résultats indiquent que Rab27a contrôlerait négativement la voie de sécrétion des chimiokines. Notre hypothèse est que Rab27a inhiberait l'exocytose de façon constitutive des compartiments contenant ces chimiokines. Cet effet inhibiteur serait levé dès la réception d'un stimulus, permettant l'exocytose de façon régulée. Rab27a pourrait être ainsi impliquée à deux niveaux de la voie de sécrétion : **A.** au niveau de l'ancrage à la membrane plasmique ou **B.** au niveau de l'ancrage aux microfilaments d'actine. C'est en stabilisant l'ancrage à l'un ou l'autre de ces niveaux que Rab27a empêcherait toute sécrétion en l'absence d'un stimulus.

impliquée dans la sécrétion des exosomes d'origine endosomale, et d'autre part dans la sécrétion régulée de certains facteurs solubles.

Nous supposons qu'il existerait des compartiments intracellulaires distincts des MVBs impliqués dans la sécrétion des exosomes et qui contiendraient certains facteurs solubles (parmi lesquels nous avons identifié le G-CSF, KC, MCP-1 et MIP-3 α) et dont la sécrétion serait régulée par Rab27a. Une première hypothèse pour expliquer le rôle de Rab27a dans cette voie de sécrétion serait que Rab27a, après avoir été recrutée sur ces compartiments, participerait leur ancrage à la membrane plasmique, mais sous une forme dite « inerte », en attendant l'induction de la fusion par un stimulus (**Figure 3.3 A**). Ainsi, lorsque l'expression de Rab27a est inhibée dans les cellules, la sécrétion de ces compartiments se ferait de façon constitutive, indépendamment de tout stimuli, ayant pour conséquence l'augmentation de la quantité de cytokines libérées dans le milieu de culture. Cela suppose que d'autres molécules permettraient l'ancrage des vésicules et Rab27a interviendrait pour stabiliser l'ancrage et prévenir la fusion dans l'attente d'un signal de sécrétion. L'existence de « vésicules inertes » ancrées à la membrane plasmique a déjà été mise en évidence dans les cellules β -pancréatiques et les cellules neuroendocrines. En effet, la surexpression de Slp4, un effecteur de Rab27a, dans ces cellules entraîne une augmentation des vésicules ancrées à la membrane mais une diminution de leur sécrétion de façon dépendante de Rab27a (Coppola et al., 2002; Fukuda et al., 2002a; Torii et al., 2004; Torii et al., 2002; Tsuboi and Fukuda, 2006). Pourtant la surexpression de Rab27a dans ces mêmes cellules entraîne une augmentation et non une diminution de la sécrétion, indiquant que Rab27a permet la constitution d'un pool de vésicules ancrées à la membrane plasmique, disponibles pour la fusion lorsqu'un stimulus est reçu par la cellule (Fukuda et al., 2002a; Yi et al., 2002). Rab27a peut donc jouer à la fois le rôle de régulateur positif et de régulateur négatif (via Slp4) de la sécrétion de granules spécifiques. Nos résultats s'opposent à ceux de la surexpression de Rab27a dans les cellules neuroendocrines, mais ils corréleraient avec les expériences d'inhibition ou de surexpression de Slp4, indiquant un possible rôle de Rab27a dans l'ancrage de vésicules « inertes » à la membrane plasmique des cellules épithéliales 4T1 et TS/A.

Un autre mécanisme pourrait expliquer comment l'inhibition de Rab27a induirait une augmentation de la sécrétion des facteurs solubles (**Figure 3.3 B**). En effet, il a été montré dans les cellules chromaffines des glandes médullosurrénales que Rab27a

participait à l'ancrage des vésicules au cytosquelette cortical d'actine après transfert depuis le réseau de microtubules et avant ancrage et fusion à la membrane plasmique. Une surexpression de Rab27a entraîne alors un ancrage excessif des granules de sécrétion aux microfilaments d'actine, inhibant leur interaction avec la membrane plasmique et donc la sécrétion de leur contenu (Desnos et al., 2003). Dans les cellules 4T1 et TS/A, Rab27a pourrait donc maintenir les vésicules de sécrétion ancrées sur les microfilaments d'actine en attendant un signal qui induirait la reprise du transport et la fusion. Selon ce mécanisme, l'inhibition de Rab27a induirait en effet une augmentation de la sécrétion des facteurs solubles, à condition toutefois que d'autres protéines permettent l'attachement et le transport des vésicules de sécrétion sur le cytosquelette d'actine.

Les données de la littérature soulignent la grande variété de fonctions que les protéines Rab27, et plus particulièrement Rab27a, peuvent exercer dans les voies de sécrétion de compartiments spécialisés. Nos résultats montrent que Rab27a peut jouer différents rôles dans différentes voies de sécrétion au sein d'un même type cellulaire.

3/ Perspectives

Rab27a participe aux voies de sécrétion des exosomes et de plusieurs facteurs solubles selon des mécanismes moléculaires visiblement différents, mais lesquels ? Pour répondre à cette question nous voudrions étudier les compartiments intracellulaires responsables de ces deux types de sécrétion et leur comportement en présence ou absence de Rab27a.

(1) Concernant le versant « exosomes », nous analyserons le nombre, la répartition subcellulaire et la taille des MVBs, par microscopie à fluorescence et par microscopie électronique à transmission, puis les déplacements de ces compartiments et leur ancrage à la membrane plasmique par microscopie à onde évanescente. Nous comparerons ensuite nos données avec les résultats obtenus dans les cellules humaines HeLa par Ostrowski, M. *et al.* afin de déterminer si les fonctions jouées par la protéine Rab27a murine dans les cellules 4T1 et TS/A sont les mêmes que celles des protéines humaines RAB27A et RAB27B. Le mécanisme moléculaire pourra ensuite être complété en déterminant quels effecteurs de Rab27a participent à son action dans la voie de sécrétion des exosomes.

(2) Concernant le rôle de Rab27a dans la sécrétion des facteurs solubles, il serait intéressant d'analyser par microscopie à fluorescence dans quels compartiments cellulaires se trouvent les facteurs solubles G-CSF, KC, MCP-1, MIP-3 α et RANTES et si l'on peut mettre en évidence le recrutement de Rab27a sur ces compartiments. Comme des anticorps spécifiques de Rab27a ne sont pas disponibles, il faudra induire dans les cellules l'expression de la protéine Rab27a fusionnée à la GFP. Nous pourrions alors visualiser les compartiments qui portent Rab27a à leur surface en microscopie à fluorescence mais aussi en microscopie électronique à transmission. Par marquage des cytokines d'intérêt, ou si nécessaire expression de ces cytokines fusionnées à une autre protéine fluorescente, nous étudierons le contenu en chimiokines des compartiments ayant recruté Rab27a. Ces compartiments seront ensuite caractérisés (présence ou non de marqueurs spécifiques des différents compartiments intracellulaires), puis leur localisation, leur morphologie, leurs déplacements et leur capacité d'ancrage à la membrane plasmique seront analysés en présence et en absence de Rab27a dans le but de comprendre le rôle de la petite GTPase dans la sécrétion des facteurs solubles. Enfin, nous rechercherons quels sont les effecteurs de Rab27a qui sont nécessaires à son implication dans la voie de sécrétion régulée des facteurs solubles. Nous nous demandons notamment si ce sont des effecteurs différents qui sont impliqués dans la voie de sécrétion des exosomes et dans la voie de sécrétion des facteurs solubles. L'hypothèse privilégiée serait que ce ne soit en effet pas les mêmes effecteurs qui participent à chacune des deux voies, permettant à Rab27a de jouer différentes fonctions, d'une part dans une voie de sécrétion constitutive et d'autre part dans une voie de sécrétion régulée, mais cela reste à déterminer. Enfin, il serait intéressant d'étudier le rôle de Rab27a dans la sécrétion des chimiokines par les cellules immunitaires, qui sont des cellules spécialisées dans ce type de sécrétion. La plupart des mécanismes moléculaires impliqués dans la sécrétion régulée de nombreuses cytokines par les diverses populations immunitaires ne sont pas connus et les protéines Rab27 pourraient être de bonnes candidates à étudier dans ce contexte, en plus de leurs rôles déjà connus dans la sécrétion de granules dans les lymphocytes T (Haddad et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001), neutrophiles (Herrero-Turrion et al., 2008; Johnson et al., 2010), cellules NK (Liu et al., 2010a) et plaquettes (Tiwari et al., 2003; Tolmachova et al., 2007).

Enfin, le criblage que nous avons effectué a révélé que la sécrétion de certaines métalloprotéases, MMP2 et pro-MMP9, était diminuée par l'inhibition de Rab27a. Nous nous demandons si cette diminution est due à l'incorporation de ces métalloprotéases dans les exosomes. Nous allons donc quantifier la présence de MMP2 et (pro-) MMP9 par ELISA ou western blot dans les exosomes des cellules 4T1 ou TS/A. Si les exosomes sont porteurs de ces métalloprotéases, ils pourraient favoriser la croissance tumorale et la dissémination métastatique, et ainsi jouer un rôle pro-tumoral que nous n'avons pas étudié au cours de mon projet de thèse.

D- LES EXOSOMES ET LA REPOSE IMMUNITAIRE TUMORALE

1/ Les limites du travail

Dans cette étude, le rôle des exosomes dans la réponse immunitaire tumorale, ou plus généralement dans la croissance tumorale et le développement métastatique, est difficile à montrer avec certitude pour plusieurs raisons :

(1) La première est que nous n'avons pas pu montrer le maintien de l'inhibition de l'expression de Rab27a *in vivo*, pendant et à la fin de la croissance des tumeurs. En effet, Rab27a est exprimée très fortement par plusieurs populations de cellules immunitaires, dont les neutrophiles qui envahissent les tumeurs 4T1 en très grand nombre, ce qui masque le niveau d'expression dans les cellules tumorales.

(2) Nous n'avons pas non plus pu mesurer la quantité d'exosomes sécrétés par les tumeurs dans la circulation sanguine des animaux car nous ne possédons pas de marqueurs nous permettant de distinguer les exosomes tumoraux des autres exosomes produits dans l'organisme. Nous n'avons donc pas pu confirmer le maintien de l'inhibition de la sécrétion des exosomes *in vivo*. Les tumeurs auraient pu être dissociées et remises en culture afin de quantifier la sécrétion *in vitro* après la croissance *in vivo*. Cependant, il y a beaucoup de cellules en nécrose dans les tumeurs, et les étapes de dissociation augmentent encore le nombre de cellules mortes. Les cultures seraient donc fortement contaminées par des grosses vésicules et des corps apoptotiques, ne permettant pas une quantification correcte de la sécrétion des exosomes. De plus, les tumeurs 4T1 contrôles et celles n'exprimant pas Rab27a ont des tailles très hétérogènes,

la quantité de cellules nécrotiques sera donc très différente entre les deux conditions ce qui pourrait induire un biais dans les quantifications. Ce type de culture *ex vivo* ne nous semble donc pas permettre une quantification fiable de la sécrétion des exosomes.

(3) Le rôle réellement joué par les exosomes dans notre étude a été particulièrement remis en cause par le fait que Rab27a n'agit pas spécifiquement dans leur voie de sécrétion. En inhibant Rab27a, nous modulons la sécrétion des exosomes et de chimiokines, ce qui signifie que nous modulons l'environnement tumoral de plusieurs façons. Nous avons dû réaliser des expériences complémentaires *in vitro* afin de montrer que les exosomes étaient impliqués dans la modulation des populations immunitaires, mais aussi qu'ils n'agissaient pas seuls et que les facteurs solubles étaient importants pour permettre leur action.

Nous avons identifié une population de cellules immunitaires, les neutrophiles ou les cellules myéloïdes suppressives, qui s'accumulent beaucoup dans les tumeurs 4T1 contrôles, mais très peu dans les tumeurs 4T1 n'exprimant pas Rab27a. Nous avons donc supposé que cette population recrutée de façon dépendante de Rab27a (et peut-être des exosomes) pouvait être responsable de l'effet pro-tumoral de Rab27a dans ces tumeurs. Cependant, il est difficile de savoir si la modulation du recrutement de ces neutrophiles/MDSCs est la cause ou la conséquence des différences de croissance. Nous aurions voulu montrer le rôle pro-tumoral de ces cellules immunitaires, mais :

(1) Nous n'avons pas réussi à dépléter efficacement les neutrophiles/MDSCs dans les souris ni dans les tumeurs à l'aide de l'anticorps spécifique anti-Ly6G (clone 1A8) dont l'utilisation et l'efficacité ont pourtant été montrées dans plusieurs études (Daley et al., 2008; Fridlender et al., 2009). Nous pensons que la tumeur 4T1 induit l'accumulation d'une telle quantité de neutrophiles dans la souris (rate, sang, tumeur) qu'il est presque impossible de les dépléter efficacement, même avec une grande quantité d'anticorps. Un groupe a tout de même effectué une déplétion des neutrophiles dans des souris portant des tumeurs 4T1 (Granot et al., 2011). Le protocole utilisé (injection de l'anticorps tous les jours puis deux fois par jour à partir du 14^e jour de croissance) et la faible efficacité de la déplétion dans le sang après le 10^e jour de croissance confirme la difficulté à éliminer cette population immunitaire dans le cas du modèle 4T1. De plus dans leur étude, la déplétion au sein de la tumeur elle-même n'est pas présentée, or c'est ce point qui nous intéresse tout particulièrement, et même si la déplétion dans le sang semble efficace en début de croissance, nos expériences indiquent que les neutrophiles peuvent

continuer à s'accumuler dans la tumeur. L'injection de l'anticorps directement dans la tumeur ne nous a pas non plus permis d'empêcher le recrutement de cette population.

(2) Nous aurions voulu étudier les fonctions des cellules CD11b+/Ly6C+/Ly6G+ afin de déterminer si elles avaient une fonction immunosuppressive classiquement associée aux MDSCs. Les neutrophiles et MDSCs ne peuvent être distingués ni morphologiquement ni phénotypiquement : les marqueurs présents à la surface de ces cellules et les enzymes impliquées dans les différentes fonctions exercées sont présents aussi bien dans les neutrophiles que dans les MDSCs. Malheureusement, l'activité immunosuppressive des MDSCs est moins facile à mettre en évidence lorsque l'on travaille avec des modèles d'un fond génétique autre que le fond C57Bl/6. Ceci est dû au fait que les effets immunosuppressifs spécifiques de l'antigène exercés par les MDSCs sont plus facilement détectables que les effets non spécifiques. Certaines populations de MDSCs, notamment celles présentes dans les organes périphériques (rate et ganglions drainants les tumeurs), ne semblent inhiber la réponse T que de façon spécifique de l'antigène qu'elles présentent (Gabrilovich et al., 2001; Movahedi et al., 2008; Nagaraj et al., 2007; Watanabe et al., 2008). Ceci peut être évalué dans le cas d'un fond génétique C57BL/6 par l'utilisation de LT OT-I et OT-II comme cibles des MDSCs, ces LT provenant de souris transgéniques de fond C57BL/6. Des outils de ce type sont moins disponibles lorsque l'on travaille avec des souris de fond Balb/c comme c'est le cas dans notre étude. Les MDSCs présentes au sein des tumeurs sont-elles capables d'induire une suppression de l'activation des LT dépendante et indépendante de l'antigène (Corzo et al., 2010), mais elles sont plus difficiles à purifier étant donné les nombreux agrégats qui se forment dans les suspensions de tumeurs. Les quelques expériences que nous avons essayées dans le but de mettre en évidence une activité immunosuppressive non spécifique de l'antigène (par stimulation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28) à partir de MDSCs purifiées de la rate ou des tumeurs ne nous ont pas permis de conclure, et des mises au point seront nécessaires avant d'obtenir une réponse. Nous ne connaissons donc pas encore la réelle nature de ces cellules.

Enfin, le fait que l'inhibition de l'expression de Rab27a ait un effet sur le développement tumoral dans le modèle 4T1, mais pas dans le modèle TS/A complexifie le message porté par ce travail, le rendant moins percutant. En effet, nous ne pouvons pas proposer un modèle « universel » impliquant Rab27a et les exosomes tumoraux dans le développement tumoral, modèle forcément un peu simpliste étant donné la

diversité que nous connaissons dans le monde du vivant, mais implicitement exigé par certains journaux scientifiques. Pourtant je pense que cette observation est au contraire très intéressante et ne fait que souligner la variété des mécanismes biologiques qui existent et plus particulièrement ceux mis en place par les tumeurs pour permettre leur croissance. Nous avons étudié ici deux modèles tumoraux qui proviennent du même tissu : l'épithélium mammaire. Pourtant, même si ces tumeurs poussent à la même vitesse après injection sous-cutanée, elles ont des comportements très différents : (1) j'ai pu observer que les tumeurs primaires qui se développent n'ont pas le même aspect physique, les 4T1 étant très solides et dures alors que les TS/A sont molles et se disloquent facilement ; (2) les 4T1 induisent des métastases depuis la tumeur primaire, alors que les TS/A que nous utilisons n'en induisent pas, et elles ne forment d'ailleurs pas non plus de nodules dans les poumons après injection intraveineuse contrairement aux cellules 4T1 ; (3) les tumeurs 4T1 et TS/A ne sécrètent pas les mêmes chimiokines (cytokines, facteurs de croissance) ou alors en des quantités très différentes, l'environnement tumoral n'est donc pas le même, les signaux de communication intercellulaire (à proximité comme à distance) et les conséquences qu'ils induisent ne sont pas les mêmes ; (4) les populations immunitaires qui infiltrent l'environnement tumoral ne sont pas les mêmes, la principale différence étant que 60-70% des cellules immunitaires présentes dans les tumeurs 4T1 sont des neutrophiles/MDSCs alors que cette population ne représente que 10-20% des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs TS/A. Il est d'ailleurs utile de rappeler que les tumeurs TS/A ont été décrites comme immunogènes alors que les tumeurs 4T1 le sont très peu (Rakhmilevich et al., 2000) ; (5) nous nous intéressons au rôle des exosomes sécrétés par les tumeurs dans la croissance tumorale, et nous avons remarqué que les cellules 4T1 et TS/A ne produisent pas les mêmes quantités d'exosomes avec environ deux fois moins d'exosomes sécrétés par les cellules TS/A par rapport aux cellules 4T1 *in vitro*, or une sécrétion insuffisante d'exosomes pourraient expliquer qu'ils n'aient pas d'effets physiologiques apparents. Nous sommes donc en présence de deux tumeurs qui se développent selon des mécanismes différents et qui semblent ne pas interagir de la même façon avec le système immunitaire. Certains mécanismes développés par l'une pour pouvoir croître peuvent ne pas être utiles pour l'autre, et l'implication de Rab27a dans une seule des deux tumeurs n'est finalement pas si surprenant. Ceci ne fait que refléter l'existence de

multiples mécanismes développés par les différentes cellules cancéreuses pour se développer.

2/ Comparaison avec les données de la littérature

a) Les exosomes dans la croissance tumorale : modèle 4T1

L'effet des exosomes sécrétés par les cellules tumorales sur la croissance des tumeurs et sur la réponse immunitaire tumorale a été étudié dans de nombreux travaux (Bobrie et al., 2011). Nos résultats indiquent que les exosomes produits *in vivo* par les tumeurs 4T1 pourraient participer à la modulation de la réponse immunitaire tumorale. Dans des études précédentes, il avait été montré que les exosomes de 4T1 (et de TS/A, nous y reviendrons par la suite) pouvaient promouvoir la croissance tumorale en inhibant l'activation des cellules NK ou en favorisant l'accumulation de cellules myéloïdes suppressives (cellules CD11b+ Gr1+) (Liu et al., 2006; Liu et al., 2010b; Xiang et al., 2009). Nous avons étudié la capacité d'activation des cellules NK provenant des tumeurs 4T1-Scr, 4T1-sh27a et des rates des souris portant ces tumeurs. Aucun défaut d'activation n'a pu être mis en évidence. Par ailleurs, la différence de croissance entre les tumeurs 4T1-Scr et les tumeurs 4T1-sh27a est toujours observée dans des souris RAG γ c (ne possédant pas de cellules NK) et dans les souris sauvages après déplétion des cellules NK (anti-asialoGM1). Nous en avons donc conclu que l'effet pro-tumoral de Rab27a ne passait pas par une modulation de l'activité des cellules NK. En revanche, nous avons observé une nette différence d'accumulation des cellules CD11b+/Ly6G+/Ly6C+ (donc Gr1+) induite par les tumeurs exprimant ou non Rab27a, ce qui corrèle avec les observations du groupe de H.-G. Zhang. Après injection des exosomes de 4T1 dans des souris, ce groupe a observé une splénomégalie due à l'accumulation de cellules CD11b+ Gr1+. Ces cellules infiltrent aussi les tumeurs en plus grand nombre lorsque les souris sont injectées avec des exosomes au cours de la croissance tumorale. Sachant que l'anticorps Gr1 reconnaît à la fois Ly6C et Ly6G, ceci correspond à ce que nous voyons dans les souris portant une tumeur 4T1-Scr qui présentent elles aussi une splénomégalie avec une proportion de cellules CD11b+/Ly6G+/Ly6C+ augmentée. L'infiltration de ces cellules dans les tumeurs est encore plus flagrante. *In vitro* les exosomes de 4T1 participent à l'accumulation de ces cellules myéloïdes, mais nous ne savons pas de quelle façon ils pourraient jouer ce rôle

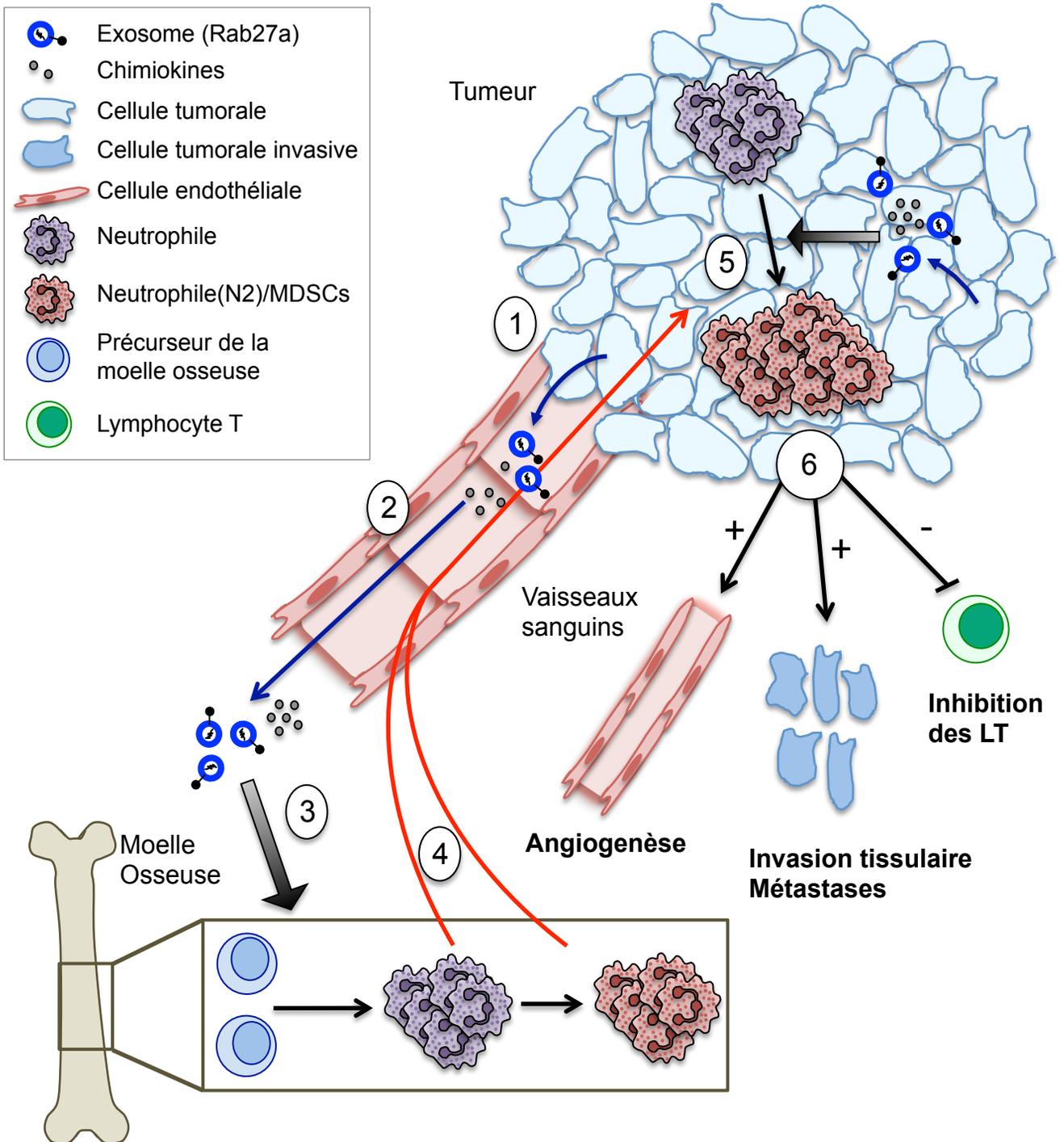


Figure 3.4 : Mécanisme hypothétique du rôle pro-tumoral des exosomes dans les tumeurs 4T1.

(1) Les cellules tumorales produisent des exosomes et des facteurs solubles, dont le G-CSF. **(2)** Les chimiokines et éventuellement les exosomes circulent dans le sang. **(3)** Ils atteignent la moelle osseuse où ils induisent la mobilisation des neutrophiles/MDSCs et éventuellement l'induction de fonctions pro-tumorales. **(4)** Ces cellules myéloïdes entrent dans la circulation sanguine et s'accumulent dans la tumeur. **(5)** Si elles ne les ont pas acquises auparavant dans la moelle osseuse, les fonctions pro-tumorales des neutrophiles/MDSCs pourraient être induites dans le microenvironnement tumoral, sous l'effet des exosomes et facteurs solubles. **(6)** La promotion de l'angiogenèse, de la capacité migratoire des cellules tumorales, ou l'inhibition de l'activation des lymphocytes T sont des fonctions que pourraient alors exercer les neutrophiles/MDSCs.

in vivo (**Figure 3.4**). Nous savons que cela se fait en coopération avec des facteurs solubles, probablement le G-CSF, ce qui pourrait éventuellement être confirmé ou infirmer en inhibant les effets du G-CSF avec des anticorps bloquants. Etant donné la forte proportion de neutrophiles/MDSCs dans le sang des souris portant une tumeur, nous supposons que le G-CSF atteint la moelle osseuse par la circulation sanguine et induit une forte mobilisation de cellules myéloïdes (immatures ou différenciées en neutrophiles), qui entrent à leur tour dans la circulation sanguine. En suivant le gradient de G-CSF elles se dirigent vers la tumeur et l'infiltrent. Les exosomes pourraient eux promouvoir un état particulier d'activation et/ou la différenciation et /ou la survie de ces cellules myéloïdes (1) au niveau de la moelle osseuse après avoir circulé dans le sang, ou bien (2) localement au sein de la tumeur. Nous n'avons cependant pas démontré si les neutrophiles/MDSCs ainsi recrutés et modulés ont réellement un effet pro-tumoral et de quelle manière. Des expériences de croissance des tumeurs dans des souris immunodéficientes (Balb/c *Rag2*^{-/-}) indiquent que le système immunitaire adaptatif ne serait pas impliqué dans la différence de croissance observée entre les tumeurs exprimant ou n'exprimant pas Rab27a. L'éventuel rôle pro-tumoral joué par les neutrophiles/MDSCs ne consisterait donc pas à inhiber la réponse T, mais plutôt à moduler d'autres propriétés du microenvironnement tumoral.

b) Les exosomes dans la croissance tumorale : modèle MCA-OVA-C1C2

Afin de rechercher le rôle des exosomes transportant un antigène tumoral *in vivo*, nous avons utilisé le modèle MCA-OVA-C1C2. Nous savons désormais que Mfge8, dont le domaine C1C2 a été utilisé pour cibler l'antigène OVA sur les exosomes, n'est en réalité pas spécifique des exosomes : elle est enrichie aussi sur les microvésicules et sur les vésicules du culot d'exosomes produits de façon indépendante de Rab27a. Il a d'abord été montré dans le laboratoire que le ciblage de l'ovalbumine sur les vésicules extracellulaires permettait d'induire une réponse immunitaire spécifique de l'ovalbumine efficace conduisant à un rejet des tumeurs (Zeelenberg et al., 2008). En revanche, lorsque nous avons inhibé la sécrétion des exosomes dépendante de Rab27a, la croissance de ces tumeurs a été plus efficacement contrôlée par les lymphocytes T spécifiques de l'antigène tumoral OVA. Nos résultats nous laissent supposer que les différents types de vésicules extracellulaires ne joueraient pas les mêmes fonctions vis-

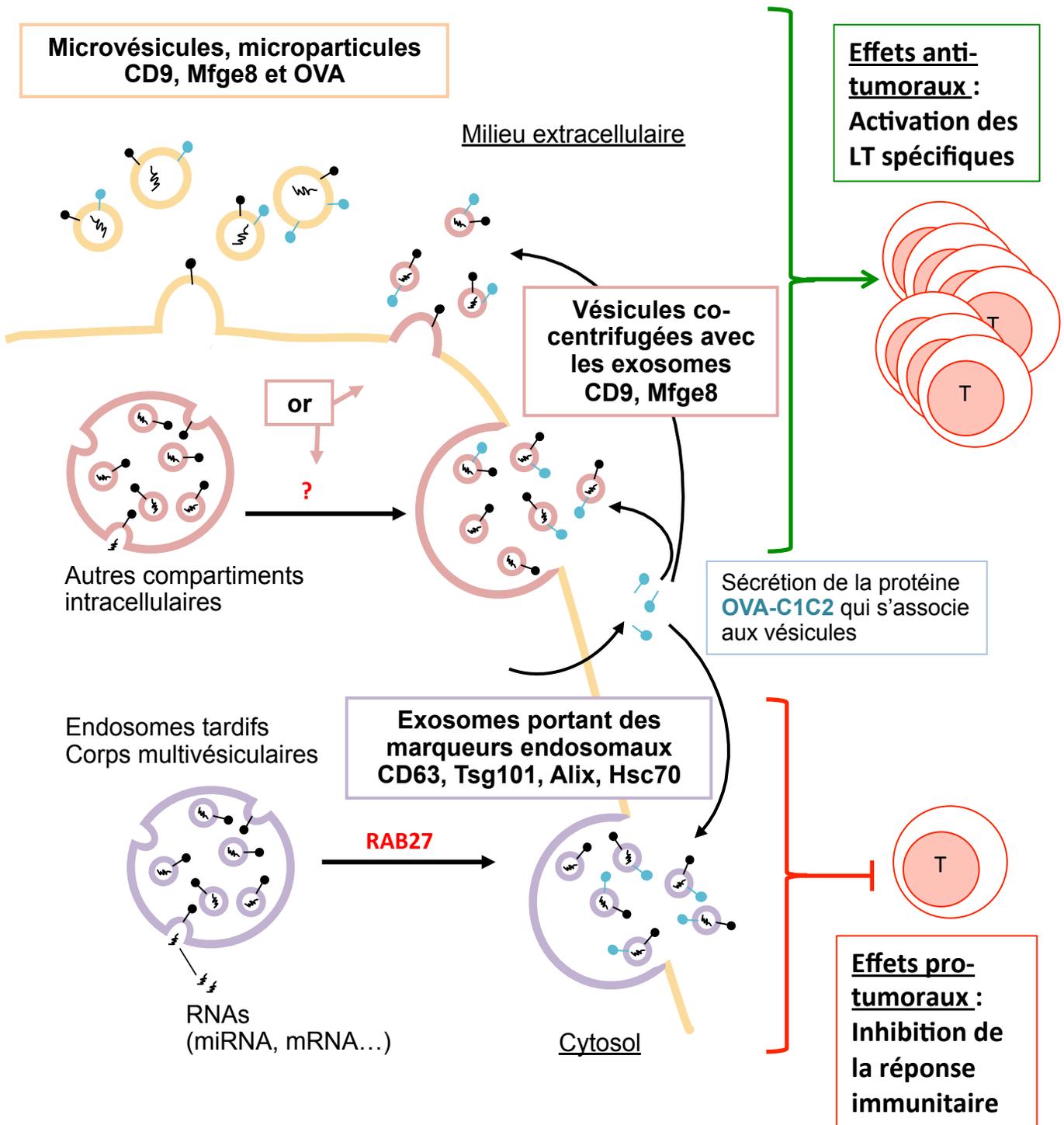


Figure 3.5 Différentes populations de vésicules et exosomes pourraient jouer des rôles opposés sur la réponse immunitaire tumorale dans le modèle MCA OVA-C1C2.

Le ciblage de l'antigène OVA sur les vésicules extracellulaires induit une réponse anti-tumorale par l'activation des LT. Cependant, les exosomes produits de façon dépendante de Rab27a jouent un rôle pro-tumoral. Nous proposons donc l'existence de (au moins) deux catégories de vésicules : (1) les microvésicules et/ou populations de vésicules co-centrifugées avec les exosomes qui participent à l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale, (2) les exosomes portant les marqueurs endosomaux qui inhiberaient cette réponse.

à-vis de la réponse T (**Figure 3. 5**): (1) les vésicules sécrétées de façon dépendante de Rab27a joueraient un rôle pro-tumoral en réduisant l'efficacité de la réponse T, pour cette raison, lorsque leur sécrétion est diminuée (inhibition de Rab27a), le rejet des tumeurs est plus efficace (2) les autres vésicules, ou certaines d'entre elles, favorisent la réponse T spécifique comme cela a été montré par Zeelenberg, I *et al.* Nous ne savons pas de quelle façon les exosomes inhibent la réponse T : action directe sur les LT comme cela a été montré par certains groupes (Andreola et al., 2002; Clayton et al., 2008; Clayton and Tabi, 2005; Huber et al., 2005; Klibi et al., 2009) ou action indirecte via le recrutement de cellules suppressives (Clayton et al., 2007; Xiang et al., 2009).

Dans le modèle 4T1, le rôle immunomodulateur des exosomes semblait être indépendant du système immunitaire adaptatif. Ici, nous sommes dans un contexte un peu différent dans le sens où la réponse T spécifique est très fortement amplifiée par l'injection d'un grand nombre de lymphocytes T spécifiques facilement activables et par la présence d'un antigène exogène exprimé par les tumeurs. Ainsi, nous pouvons émettre deux hypothèses : (1) Les exosomes des cellules MCA et des cellules 4T1 ont des propriétés différentes, et de par leur composition protéique ils sont capables d'induire des effets immunosuppresseurs n'impliquant pas les mêmes populations cellulaires. Les différentes études publiées à partir d'exosomes concentrés sécrétés par différents types de tumeurs montrent en effet que les exosomes peuvent inhiber la réponse immunitaire de différentes façons (Bobrie et al., 2011; Thery et al., 2009), tout comme cela est vrai aussi au niveau cellulaire puisque les cellules tumorales peuvent disposer de stratégies variées pour moduler la réponse immunitaire (Zitvogel et al., 2006). (2) Les deux types d'exosomes peuvent exercer les mêmes fonctions, mais nous ne les avons pas mises en évidence. En effet, d'un côté nous n'avons pas étudié les populations myéloïdes induites par les tumeurs MCA et leur possible modulation en fonction de l'expression de Rab27a et de la sécrétion des exosomes. De l'autre côté, ne pouvant augmenter artificiellement une réponse T spécifique dans le modèle 4T1 (et ne sachant pas si les exosomes de 4T1 portent des antigènes tumoraux ou non), nous ne pouvons reproduire les expériences réalisées dans le modèle MCA et mettre en évidence selon le même procédé un éventuel rôle des exosomes de 4T1 sur la réponse T.

c) Les exosomes dans la croissance tumorale : modèle TS/A

Nous n'avons pas observé d'effet de l'inhibition de l'expression de Rab27a et donc de la sécrétion des exosomes dans le modèle TS/A, indiquant que le rôle pro-tumoral existant dans le cas des tumeurs 4T1 n'existe pas dans les tumeurs TS/A. Les études réalisées sur les exosomes de 4T1 que nous avons précédemment citées présentaient aussi l'analyse des exosomes de cellules TS/A. Aucune différence fonctionnelle entre les exosomes produits par les deux types cellulaires n'a été observée *in vitro* ou *in vivo* (Liu et al., 2006; Liu et al., 2010b; Xiang et al., 2009). Notamment, les exosomes de TS/A injectés en intraveineuse, tout comme les exosomes de 4T1, induisent une splénomégalie et l'accumulation des MDSCs dans les rates. Contrairement à ces résultats, nous ne voyons pas de recrutement des MDSCs dans les rates ni dans les tumeurs TS/A. Les exosomes sécrétés *in vivo* par les tumeurs 4T1 et TS/A ne semblent donc pas avoir les mêmes propriétés que ceux produits et concentrés *in vitro*. Trois principaux facteurs pourraient expliquer les différences de comportement entre les exosomes produits *in vivo* et ceux produits *in vitro* quant à leur rôle dans l'induction des cellules CD11b+/Ly6G+/Ly6C+: (1) la quantité d'exosomes sécrétés (2) leur composition (3) l'environnement dans lequel ils sont produits.

(1) Nous ne pouvons pas mesurer de manière fiable les quantités d'exosomes produites par les tumeurs *in vivo*. Dans les études fonctionnelles réalisées par injection à des souris d'exosomes produits puis concentrés *in vitro*, nous ne savons pas si la quantité injectée reflète les quantités physiologiques libérées par les tumeurs dans l'organisme. Par ailleurs, nous avons constaté que les cellules TS/A produisent deux fois moins d'exosomes que les cellules 4T1 *in vitro*, or des quantités égales ont été injectées aux souris afin d'étudier leurs fonctions dans les études précédemment citées. Nous pouvons supposer que les tumeurs TS/A, contrairement aux tumeurs 4T1, ne produisent pas assez d'exosomes pour que ceux-ci passent efficacement dans la circulation sanguine, atteignent la moelle osseuse et modulent la différenciation, la survie et/ou la prolifération des cellules myéloïdes.

(2) La composition des exosomes : il ne serait pas étonnant que les exosomes produits *in vivo* n'aient pas la même composition que ceux produits *in vitro* étant donné les conditions environnementales très différentes dans lesquelles les cellules se trouvent : accès aux nutriments, pH, hypoxie, communication avec les cellules de l'hôte. Autant de signaux qui peuvent influencer les propriétés des cellules tumorales et des exosomes

qu'elle produisent, tant qualitativement que quantitativement. Cette possibilité de la modulation de la composition des exosomes par le microenvironnement tumoral a été récemment étudiée par Deng, Z. *et al.* Pour cela, les cellules 4T1 ont été cultivées en absence ou en présence de leucocytes purifiés à partir de tumeurs 4T1 prélevées *in vivo*. Les auteurs montrent que les exosomes produits par les cellules tumorales en co-culture, mais pas ceux produits par les cellules tumorales seules, contiennent la fibronectine qui leur permet de favoriser la migration des cellules tumorales (Deng et al., 2012). La composition des exosomes est donc modulée par la présence des leucocytes tumoraux. Cette étude laisse donc penser que la composition des exosomes produits par les tumeurs *in vivo* ne serait pas identique à celle des exosomes produits *in vitro* et que les fonctions exercées par les exosomes s'en trouvent ainsi modifiées.

(3) De nombreux signaux sont envoyés depuis les cellules tumorales vers les cellules environnantes et vice versa à courte ou longue distance. Ces interactions via des facteurs solubles et via des vésicules membranaires modulent ainsi les cellules réceptrices. C'est la somme de tous ces signaux qui définit l'évolution de la tumeur, l'établissement du microenvironnement tumoral et par exemple la réponse immunitaire tumorale. Nous pensons ainsi que les exosomes pourraient exercer certaines de leurs fonctions uniquement lorsqu'ils sont en présence d'autres facteurs qui apporteraient un signal complémentaire et nécessaire pour aboutir à une réponse des cellules réceptrices. Dans le modèle 4T1, l'environnement cytokinique particulier produit par ces tumeurs, et notamment la forte production de G-CSF, facteur de croissance des granulocytes, serait complémentaire des signaux portés par les exosomes, le tout aboutissant à l'accumulation des neutrophiles/MDSCs. Les chimiokines produites par les cellules tumorales TS/A n'étant pas les mêmes (ou en des quantités très différentes), nous supposons que les conditions ne sont pas réunies pour permettre aux exosomes d'exercer les mêmes effets que dans les tumeurs 4T1.

d) Neutrophiles ou cellules myéloïdes suppressives ?

Dans notre étude, des cellules exprimant les marqueurs CD11b, Ly6C et Ly6G s'accumulent spécifiquement dans les tumeurs 4T1 et de façon dépendante de Rab27a. Ces marqueurs caractérisent à la fois les neutrophiles et les cellules myéloïdes suppressives. Diverses activités pro-tumorales ont pu être attribuées aux deux types

cellulaires. Il est difficile de savoir si ces deux types cellulaires sont réellement distincts ou si les cellules myéloïdes suppressives de type granulocytaire représentent en réalité une catégorie de neutrophiles dont l'activité aurait été détournée par les cellules tumorales. Les deux types cellulaires présentent la même morphologie en microscopie optique après un cytopspin : cellules granuleuses avec un noyau plurilobé. Les mêmes marqueurs phénotypiques sont exprimés par les neutrophiles comme par les MDSCs granulocytiques : CD11b, Ly6C, Ly6G, CD115 et CD244 notamment. De plus, les enzymes du métabolisme impliquées dans les fonctions pro-tumorales, ou parfois anti-tumorales, sont exprimées par les deux catégories de cellules : NO synthase, myéloperoxydase, NADPH oxydase, arginase 1. Les MDSCs sont décrites comme étant différentes des neutrophiles (Gabrilovich et al., 2012) selon les critères suivants: (1) elles inhibent l'activation et la prolifération des LT, (2) elles expriment des niveaux plus forts de CD115 et CD244 et des niveaux plus bas de CXCR1 (CXC-chemokine receptor 1) et CXCR2 que les neutrophiles, (3) elles ont une faible activité de phagocytose (4) elles expriment fortement l'arginase 1 et la myéloperoxydase, et produisent de plus grandes quantités de ROS que les neutrophiles. Une analyse transcriptomique visant à comparer l'expression des gènes dans les neutrophiles de souris saines, les neutrophiles purifiés de tumeurs et les MDSCs granulocytiques a été réalisée (Fridlender et al., 2012). Les « MDSCs » analysées dans cette étude sont des cellules exprimant les marqueurs CD11b et Ly6G purifiées à partir de rates de souris portant une tumeur. Les cellules purifiées à partir des tumeurs et portant ces mêmes marqueurs sont appelées « neutrophiles » ou « TAN » (pour tumor-associated neutrophils). Il n'y a donc ici pas de distinction faite entre les TAN et les MDSCs granulocytiques dans les tumeurs contrairement à ce que font d'autres groupes (Gabrilovich et al., 2012). Les trois populations étudiées, que les auteurs nomment d'ailleurs « populations de neutrophiles », présentent des profils d'expression génique différents, mais les gènes plus spécifiques aux neutrophiles (comme ceux codant les protéines des différents granules spécifiques des neutrophiles) sont exprimés dans les trois populations, parfois même à des niveaux identiques. Ainsi, ces profils pourraient refléter des différences dans l'état de maturation et/ou d'activation de cellules appartenant toutes à la catégorie des neutrophiles, plutôt qu'à des populations distinctes, d'une part de neutrophiles, et d'autre part de MDSCs. Au début de mon projet, les revues que j'avais lues sur les MDSCs laissaient penser qu'elles constituaient une nouvelle catégorie de cellules myéloïdes immatures, bloquées dans

leur différenciation et possédant des fonctions immunosuppressives. Dorénavant et selon les auteurs il y a deux façons de considérer la nature des MDSCs :

(1) les MDSCs sont une population de cellules myéloïdes immatures, distinctes des autres cellules myéloïdes présentes dans un hôte sain. Cette population est hétérogène, avec des cellules granulocytiques et des cellules monocytiques, qui possèdent toutes des mécanismes permettant d'inhiber la réponse immunitaire. Il est aussi reconnu qu'elles peuvent promouvoir la croissance tumorale de façon indépendante de la réponse immunitaire. Selon cette définition, les cellules « MDSCs granulocytiques » qui infiltrent les tumeurs ne sont pas des neutrophiles (Gabrilovich et al., 2012; Youn and Gabrilovich, 2010).

(2) les MDSCs sont des neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques ou cellules myéloïdes immatures qui ont acquis des capacités immunosuppressives et pro-tumorales dans des conditions particulières. Ainsi, selon cette définition, les cellules CD11b+/Ly6C+/Ly6G+ présentes dans les tumeurs et qui possèdent une fonction immunosuppressive sont des neutrophiles dans un état d'activation différent de celui qu'ils ont à l'état basal (comme les neutrophiles de type N2 par exemple) et ils peuvent être qualifiés de MDSCs (Fridlender et al., 2009; Fridlender et al., 2012; Galli et al., 2011; Ueha et al., 2011).

Au cours de mes travaux de thèse, je n'ai pas pu mettre en évidence d'activité immunosuppressive de la réponse immunitaire T par les neutrophiles/MDSCs purifiés des tumeurs ou des rates de souris portant une tumeur. Cependant, les protocoles expérimentaux n'ont pas encore été optimisés et il est difficile de conclure quant à la présence ou l'absence d'une activité immunosuppressive de ces cellules. Toutefois, les expériences de croissance tumorale réalisées dans des souris immunodéficientes indiquent que le système immunitaire adaptatif ne participerait pas de façon majeure à l'inhibition de croissance des tumeurs 4T1-sh27a par rapport aux tumeurs contrôles. Nous supposons donc que le rôle pro-tumoral exercé par les neutrophiles/MDSCs serait indépendant du système immunitaire adaptatif. Il a été décrit que les neutrophiles pouvaient exercer des fonctions pro-tumorales par modulation du microenvironnement notamment en favorisant l'angiogenèse, la migration des cellules tumorales et la dissémination métastatique. De plus, les neutrophiles peuvent présenter deux états d'activation, un état N1 anti-tumoral et un état N2 pro-tumoral induit par la présence de TGF β . Il a été montré que le TGF β pouvait être présent sur les exosomes et être

responsable d'une activité immunosuppressive de ceux-ci (Clayton et al., 2007; Xiang et al., 2009). Nous pouvons donc tout à fait supposer que le TGF β serait présent sur les exosomes de 4T1 leur donnant la capacité d'induire des neutrophiles de type N2, et lorsque la sécrétion des exosomes est inhibée par le blocage de l'expression de Rab27a, les neutrophiles, alors non modulés par la présence d'exosomes-TGF β adopteraient un état d'activation de type N1 anti-tumoral conduisant à la lyse de cellules tumorales et donc à une croissance limitée des tumeurs 4T1-sh27a.

3/ Perspectives

Afin de renforcer nos résultats, il va nous falloir montrer l'implication des neutrophiles/MDSCs dans la croissance tumorale. De nouveaux protocoles de déplétion avec l'anticorps anti-Ly6G 1A8 sont actuellement testés afin d'essayer d'éliminer de façon satisfaisante ces cellules dans les souris portant une tumeur. Nous pourrions aussi réaliser la stratégie inverse, c'est à dire purifier les neutrophiles/MDSCs de souris portant une tumeur, les co-injecter en sous-cutané avec des cellules tumorales dans de nouvelles souris et regarder si elles induisent une croissance plus rapide et une dissémination métastatique plus importante, comme cela a été fait dans d'autres études (Xiang et al., 2009). Si nous montrons ainsi que ces cellules jouent un rôle pro-tumoral dans la croissance des tumeurs 4T1, il nous faudra trouver par quels mécanismes elles le font. Les fonctions immunosuppressives des neutrophiles/MDSCs seront donc analysées *in vitro* après purification de ces cellules à partir des tumeurs ou des rates de souris portant une tumeur. L'expression et l'activité des enzymes de production des ROS et du NO, l'expression de l'arginase, la capacité à inhiber l'activation et la prolifération des LT sont autant de paramètres à analyser. Dans notre modèle nous pensons que les neutrophiles/MDSCs joueraient plutôt un rôle pro-tumoral indépendant de la réponse T, par modulation du microenvironnement tumoral. La promotion de l'angiogenèse et de la dissémination métastatique sont les deux mécanismes pro-tumoraux les plus fréquemment induits par ces cellules. Nous quantifierons donc la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et de métalloprotéases (notamment de la MMP9) par les neutrophiles/MDSCs. Nous pourrions comparer l'angiogenèse dans les tumeurs par histopathologie et réaliser des tests de migration en matrigel des cellules tumorales en présence ou non des neutrophiles/MDSCs. La quantification du nombre de métastases

se développant depuis la tumeur primaire lorsque les neutrophiles/MDSCs sont injectés avec les cellules tumorales en sous-cutané nous permettrait de voir si un effet pro-métastatique existe *in vivo*. De nombreuses expériences peuvent ainsi être réalisées afin de comprendre comment ces cellules granulocytiques qui s'accumulent dans les tumeurs 4T1 pourraient participer à la croissance de la tumeur.

Afin de finaliser le rôle pro-tumoral des exosomes, il nous faudra comprendre comment ces vésicules sécrétés de façon dépendante de Rab27a participent à l'accumulation des cellules myéloïdes dans les souris portant une tumeur 4T1. La mise au point d'un système permettant de détecter les exosomes produits par les cellules tumorales *in vivo* pourrait nous aider à répondre à cette question. Nous pourrions ainsi savoir si les exosomes peuvent être transportés dans la circulation sanguine et s'ils se localisent dans certains organes en particulier (nous pensons notamment à la moelle osseuse). Nous avons par exemple pensé à exprimer la protéine de fusion CD63-GFP dans les cellules, CD63 semblant être parmi les marqueurs les plus spécifiquement enrichis dans les exosomes. Quelques résultats préliminaires nous ont permis de montrer la localisation de cette protéine dans les MVBs et dans les exosomes produits par ces cellules (données non présentées). Mais nous n'avons pas obtenu de données *in vivo*, le clone de cellules sélectionné étant rejeté par les souris. Enfin, nous voudrions trouver quelle(s) molécule(s) portée(s) par les exosomes leur permettraient d'induire les neutrophiles/MDSCs. Nous avons vu que le TGF β pourrait être un bon candidat pour ce rôle. La prostaglandine E2 (PGE2) en est un aussi puisque cette molécule est présente dans des exosomes de tumeurs et qu'elle leur permet d'induire *in vitro* l'accumulation des MDSCs (Xiang et al., 2009). Nous avons donc prévu de rechercher la présence de ces deux molécules sur les exosomes par western blot et/ou ELISA.

Enfin, la suite du projet pourra s'orienter vers une étude plus approfondie du rôle des exosomes et des neutrophiles/MDSCs dans le cancer du sein humain. Nous avons réalisé une analyse de l'expression de *RAB27A* et de *RAB27B* au niveau transcriptomique dans des biopsies de cancers du sein. Nous voudrions par la suite regarder si les différents niveaux d'expression de *RAB27A*, qui corrèlent avec des stades plus ou moins avancés des tumeurs, corrèleraient aussi avec une infiltration plus ou moins importante de granulocytes neutrophiles. Nous voulons étudier le rôle de *RAB27A* dans la sécrétion des exosomes par des lignées humaines de cancer du sein et dans la croissance des tumeurs par des expériences de xénogreffes dans des souris immunodéficientes. L'effet

des exosomes produits par ces lignées dans la promotion des neutrophiles/MDSCs à partir de la moelle osseuse de donneur sein pourrait être étudiée *in vitro* selon des protocoles similaires à ceux réalisés avec les exosomes de tumeurs murines. Des expériences préliminaires que nous avons réalisées avec la lignée tumorale MDA-MB-231 (lignée métastatique n'exprimant pas les récepteurs ER et HER2) ne nous ont pas permis de montrer un rôle de RAB27A dans la sécrétion des exosomes par cette lignée tumorale, alors qu'un retard de croissance des cellules MDA-MB-231 n'exprimant par RAB27A est constaté *in vivo*. Ces résultats doivent dans un premier temps être confirmés, et le rôle de RAB27A dans la sécrétion des exosomes par d'autres lignées de cancer du sein devra être analysé afin de savoir si cette observation est particulière ou non à la lignée MDA-MB-231. Il faudra comprendre de quelle façon RAB27A joue un rôle pro-tumoral dans les tumeurs humaines du sein. Enfin, nos données transcriptomiques montrent une surexpression de *RAB27B* dans les cancers de sein humains, mais plutôt ceux exprimant soit le récepteur ER, soit le récepteur HER2, et correspondant à des tumeurs de grade peu élevé. Ces résultats ont aussi été montrés par Hendrix, A. *et al* (Hendrix et al., 2010). Il semble donc que RAB27B soit impliquée dans la progression tumorale, mais pas dans les mêmes types de tumeurs que RAB27A. Les travaux de Hendrix, A. *et al* montrent que RAB27B contrôle la sécrétion de Hsp90, qui permet l'activation de la métalloprotéase MMP2, augmentant ainsi la migration et la dissémination métastatique des cellules tumorales MCF-7 (cellules ER+). Cette sécrétion de Hsp90 pourrait se faire de façon soluble ou via les exosomes. Nous voudrions ainsi comparer l'implication des deux isoformes de RAB27 dans la sécrétion des exosomes et des facteurs solubles, et dans le développement des différents types de cancers du sein.

E- Questions ouvertes

Les travaux menés au cours de cette thèse m'ont amenée à étudier divers aspects de la biologie cellulaire et de la biologie des tumeurs. Certaines questions concernant chacun des domaines que j'ai pu aborder restent en suspens.

Tout d'abord, nous avons été amenés à nous poser la question de l'existence de plusieurs populations d'exosomes. Nous savons qu'il existe plusieurs populations de

vésicules dans les culots d'exosomes, mais la question est de savoir si toutes sont des exosomes, et si ce n'est pas le cas, lesquelles sont des exosomes et lesquelles n'en sont pas. La société internationale des vésicules extracellulaires (ISEV) se préoccupe actuellement de trouver un consensus sur les critères permettant de définir les vésicules qui peuvent être appelées « exosomes » parmi les différentes vésicules extracellulaires. Se pose aussi la question du mécanisme exact, encore inconnu, de la biogenèse des exosomes et du recrutement des protéines et des ARN qu'ils transportent.

Les rôles physiologiques joués par les exosomes sécrétés *in vivo* doivent encore être approfondis chez la souris et chez l'Homme. Nous avons montré que les exosomes sécrétés de façon dépendante de Rab27a participaient, dans un modèle de carcinome mammaire murin, à la modulation de la réponse immunitaire tumorale, bien que nous n'ayons pas montré par quel mécanisme moléculaire ils le font. Nous avons aussi vu que ce rôle des exosomes n'était pas généralisable à toutes les tumeurs. La participation des exosomes sécrétés *in vivo* à la croissance tumorale reste donc encore une question ouverte aujourd'hui et d'autres travaux seront nécessaires pour mieux comprendre l'ensemble des fonctions qu'ils peuvent jouer, et dans quelles conditions ils sont ou ne sont pas essentiels à la croissance tumorale. Des études avec des modèles humains devront compléter ces recherches afin de savoir si les résultats des modèles murins sont transposables chez l'Homme, dans le but éventuellement d'imaginer des stratégies pour bloquer les messages pro-tumoraux transportés par ces microvésicules.

Au cours de notre étude, nous ne nous sommes intéressés qu'aux exosomes produits par les cellules tumorales, mais les fonctions des exosomes produits par les autres cellules du microenvironnement tumoral doivent elles être étudiées. De plus, les rôles que jouent les exosomes produits *in vivo* dans de nombreux autres domaines que la cancérologie restent à découvrir : immunologie (autre que tumorale : virale, auto-immunité, transplantation par exemple), neurologie, reproduction, dissémination d'agents pathogènes, parmi d'autres. Des souris dont l'expression de Rab27a pourra être inhibée de façon conditionnelle dans le temps et dans certains tissus spécifiquement sont en train d'être générées dans le laboratoire. Elles permettront très probablement de répondre à un certain nombre de questions concernant le rôle des exosomes, sécrétés de façon dépendante de Rab27a, tout en gardant à l'esprit que les autres voies de sécrétion devront être contrôlées pour chaque type cellulaire qui sera étudié.

En conclusion, les exosomes sont des vésicules membranaires qui suscitent un engouement croissant de la part des scientifiques et des industriels, comme le montre le nombre de publications qui ne cesse d'augmenter depuis le milieu des années 2000. Cependant, l'hétérogénéité des vésicules produites va obliger la communauté à approfondir la caractérisation de celles-ci afin de définir plus précisément les exosomes et les différentes vésicules extracellulaires. Comme nous l'avons vu, étudier le rôle physiologique des exosomes produits *in vivo* n'est pas aisé, puisque des outils permettant de moduler spécifiquement leur sécrétion manquent. Les recherches sur la biogenèse des exosomes doivent donc continuer afin de trouver de nouveaux outils. En attendant, inhiber Rab27a reste un bon moyen d'appréhender la fonction des exosomes, à condition d'effectuer les contrôles nécessaires. Une bonne caractérisation à la fois biochimique et fonctionnelle des exosomes est importante pour la mise en place de thérapies, notamment anti-tumorales, qui impliqueraient les exosomes. Des essais cliniques ont été réalisés par administration d'exosomes de cellules dendritiques chargés avec des peptides d'antigènes tumoraux dans le but d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale. Un essai clinique de phase II est actuellement en cours (Institut Gustave Roussy, Villejuif) dans lequel des exosomes de DC activées par l'IFN γ sont utilisés conjointement avec un traitement inhibiteur des LT régulateurs. *In vitro*, les exosomes produits par les tumeurs peuvent jouer un rôle pro-tumoral de nombreuses façons, et *in vivo*, nous confirmons leur capacité à promouvoir le développement tumoral dans certains modèles. Des thérapies anti-cancéreuses visant à inhiber leur sécrétion par les cellules tumorales, à interférer avec les molécules pro-tumorales qu'ils transportent ou encore à empêcher leur interaction avec les cellules cibles pourraient être envisagées.

BIBLIOGRAPHIE

- Aalberts, M., van Dissel-Emiliani, F.M., van Adrichem, N.P., van Wijnen, M., Wauben, M.H., Stout, T.A., and Stoorvogel, W. (2012). Identification of Distinct Populations of Prostrasomes That Differentially Express Prostate Stem Cell Antigen, Annexin A1, and GLIPR2 in Humans. *Biol Reprod* 86, 82.
- Admyre, C., Grunewald, J., Thyberg, J., Gripenback, S., Tornling, G., Eklund, A., Scheynius, A., and Gabrielsson, S. (2003). Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J* 22, 578-583.
- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filen, J.J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P., Scheynius, A., and Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 179, 1969-1978.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10, 619-624.
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222, 155-161.
- Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166, 678-689.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2011). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol*.
- Andre, F., Scharztz, N.E., Chaput, N., Flament, C., Raposo, G., Amigorena, S., Angevin, E., and Zitvogel, L. (2002a). Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 20 Suppl 4, A28-31.
- Andre, F., Scharztz, N.E., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., *et al.* (2002b). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360, 295-305.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., *et al.* (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 195, 1303-1316.
- Arita, S., Baba, E., Shibata, Y., Niuro, H., Shimoda, S., Isobe, T., Kusaba, H., Nakano, S., and Harada, M. (2008). B cell activation regulates exosomal HLA production. *Eur J Immunol* 38, 1423-1434.
- Asea, A., Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I.M., Skupski, D., and Witkin, S.S. (2008). Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol*.
- Atkins, D., Breuckmann, A., Schmahl, G.E., Binner, P., Ferrone, S., Krummenauer, F., Storkel, S., and Seliger, B. (2004). MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 109, 265-273.

- Bahadoran, P., Aberdam, E., Mantoux, F., Busca, R., Bille, K., Yalman, N., de Saint-Basile, G., Casaroli-Marano, R., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (2001). Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. *J Cell Biol* 152, 843-850.
- Bailey, C., Negus, R., Morris, A., Ziprin, P., Goldin, R., Allavena, P., Peck, D., and Darzi, A. (2007). Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 24, 121-130.
- Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.J., Pomeroy, S.L., Breakefield, X.O., and Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2, 180.
- Bard, M.P., Hegmans, J.P., Hemmes, A., Luider, T.M., Willemsen, R., Severijnen, L.A., van Meerbeeck, J.P., Burgers, S.A., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 114-121.
- Barral, D.C., Ramalho, J.S., Anders, R., Hume, A.N., Knapton, H.J., Tolmachova, T., Collinson, L.M., Goulding, D., Authi, K.S., and Seabra, M.C. (2002). Functional redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome. *J Clin Invest* 110, 247-257.
- Bellier, B., Dalba, C., Clerc, B., Desjardins, D., Drury, R., Cosset, F.L., Collins, M., and Klatzmann, D. (2006). DNA vaccines encoding retrovirus-based virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant. *Vaccine* 24, 2643-2655.
- Bellocq, A., Antoine, M., Flahault, A., Philippe, C., Crestani, B., Bernaudin, J.F., Mayaud, C., Milleron, B., Baud, L., and Cadranel, J. (1998). Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *The American journal of pathology* 152, 83-92.
- Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003129.
- Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G., and Kees, U.R. (1998). Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 160, 5729-5734.
- Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Sacconi, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., *et al.* (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107, 2112-2122.
- Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., and Hivroz, C. (2002). TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* 168, 3235-3241.
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 12, 1659-1668.
- Booth, A.M., Fang, Y., Fallon, J.K., Yang, J.M., Hildreth, J.E., and Gould, S.J. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 172, 923-935.
- Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2, 373-382.

- Bunt, S.K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer research* 67, 10019-10026.
- Burnet, F.M. (1957). Cancer-A biological approach. *British Medical Journal*, 779-786.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.
- Buschow, S.I., Liefhebber, J.M., Wubbolts, R., and Stoorvogel, W. (2005). Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells Mol Dis* 35, 398-403.
- Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N., van Niel, G., Pols, M.S., Ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J., Raposo, G., Wubbolts, R., *et al.* (2009). MHC II in Dendritic Cells is Targeted to Lysosomes or T Cell-Induced Exosomes Via Distinct Multivesicular Body Pathways. *Traffic* 10, 1528-1542.
- Caby, M.P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., and Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 17, 879-887.
- Carey, T.E., Takahashi, T., Resnick, L.A., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3278-3282.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 58-66.
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., *et al.* (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 120, 457-471.
- Chaput, N., Flament, C., Viaud, S., Taieb, J., Roux, S., Spatz, A., Andre, F., LePecq, J.B., Boussac, M., Garin, J., *et al.* (2006). Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. *J Leukoc Biol* 80, 471-478.
- Chaturvedi, A.K., Pfeiffer, R.M., Chang, L., Goedert, J.J., Biggar, R.J., and Engels, E.A. (2007). Elevated risk of lung cancer among people with AIDS. *AIDS* 21, 207-213.
- Chen, J.J., Lin, Y.C., Yao, P.L., Yuan, A., Chen, H.Y., Shun, C.T., Tsai, M.F., Chen, C.H., and Yang, P.C. (2005). Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol* 23, 953-964.
- Chen, X., Li, C., Izumi, T., Ernst, S.A., Andrews, P.C., and Williams, J.A. (2004). Rab27b localizes to zymogen granules and regulates pancreatic acinar exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 1157-1162.
- Chen, Y., Guo, X., Deng, F.M., Liang, F.X., Sun, W., Ren, M., Izumi, T., Sabatini, D.D., Sun, T.T., and Kreibich, G. (2003). Rab27b is associated with fusiform vesicles and may be involved in targeting uroplakins to urothelial apical membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14012-14017.
- Cho, J.A., Lee, Y.S., Kim, S.H., Ko, J.K., and Kim, C.W. (2009). MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models. *Cancer Lett* 275, 256-265.

Choi, D.S., Lee, J.M., Park, G.W., Lim, H.W., Bang, J.Y., Kim, Y.K., Kwon, K.H., Kwon, H.J., Kim, K.P., and Gho, Y.S. (2007). Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res* 6, 4646-4655.

Clark, W.H., Jr., Elder, D.E., Guerry, D.t., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., and Halpern, A.C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81, 1893-1904.

Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Linnane, S., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2008). Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 180, 7249-7258.

Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* 67, 7458-7466.

Clayton, A., and Tabi, Z. (2005). Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. *Blood Cells Mol Dis* 34, 206-213.

Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M.D., and Hallett, M.B. (2004). Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J* 18, 977-979.

Clemente, C.G., Mihm, M.C., Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303-1310.

Coppola, T., Frantz, C., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Hirling, H., and Regazzi, R. (2002). Pancreatic beta-cell protein granophilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis. *Mol Biol Cell* 13, 1906-1915.

Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.I., Cheng, P., Cho, H.I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., *et al.* (2010). HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of experimental medicine* 207, 2439-2453.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10, 942-949.

Dai, S., Wan, T., Wang, B., Zhou, X., Xiu, F., Chen, T., Wu, Y., and Cao, X. (2005). More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clin Cancer Res* 11, 7554-7563.

Dai, S., Wei, D., Wu, Z., Zhou, X., Wei, X., Huang, H., and Li, G. (2008). Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther* 16, 782-790.

Dai, S., Zhou, X., Wang, B., Wang, Q., Fu, Y., Chen, T., Wan, T., Yu, Y., and Cao, X. (2006). Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A*0201-restricted CEA-specific CD8(+) CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells. *J Mol Med* 84, 1067-1076.

Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., and Albina, J.E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83, 64-70.

- Dallegrì, F., Ottonello, L., Ballestrero, A., Dapino, P., Ferrando, F., Patrone, F., and Sacchetti, C. (1991). Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation* *15*, 15-30.
- De Santo, C., Arscott, R., Booth, S., Karydis, I., Jones, M., Asher, R., Salio, M., Middleton, M., and Cerundolo, V. (2010). Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol* *11*, 1039-1046.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* *16*, 91-102.
- Deng, Z., Cheng, Z., Xiang, X., Yan, J., Zhuang, X., Liu, C., Jiang, H., Ju, S., Zhang, L., Grizzle, W., *et al.* (2012). Tumor cell cross talk with tumor-associated leukocytes leads to induction of tumor exosomal fibronectin and promotes tumor progression. *Am J Pathol* *180*, 390-398.
- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M.J., Jakobson, E., de Groot, C., and Geuze, H.J. (2000). Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* *165*, 1259-1265.
- Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint Basile, G., *et al.* (2003). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol* *163*, 559-570.
- Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* *58*, 49-59.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* *1*, 447-456.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* *3*, 991-998.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Sheehan, K.C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J.D., Diamond, M.S., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., *et al.* (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* *6*, 722-729.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* *6*, 836-848.
- DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L.M., Cheung, A.F., and Jacks, T. (2012). Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* *482*, 405-409.
- Ehrlich, P. (1909). Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *NedTijdschr Geneeskd.*
- Elstak, E.D., Neeft, M., Nehme, N.T., Voortman, J., Cheung, M., Goodarzifard, M., Gerritsen, H.C., van Bergen En Henegouwen, P.M., Callebaut, I., de Saint Basile, G., *et al.* The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood* *118*, 1570-1578.

- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273, 20121-20127.
- Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., Andre, F., Caby, M.P., Novault, S., Flament, C., Leboulaire, C., Borg, C., Amigorena, S., *et al.* (2005). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* 3, 10.
- Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J.C., and Gould, S.J. (2007). Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol* 5, e158.
- Farrar, J.D., Katz, K.H., Windsor, J., Thrush, G., Scheuermann, R.H., Uhr, J.W., and Street, N.E. (1999). Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. *J Immunol* 162, 2842-2849.
- Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., *et al.* (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 31, 642-648.
- Ferradini, L., Roman-Roman, S., Azocar, J., Avril, M.F., Viel, S., Triebel, F., and Hercend, T. (1992). Analysis of T-cell receptor alpha/beta variability in lymphocytes infiltrating a melanoma metastasis. *Cancer research* 52, 4649-4654.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., and Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9683-9688.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16, 183-194.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Bayuh, R., Worthen, G.S., *et al.* (2012). Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS one* 7, e31524.
- Fu, Y.X., Watson, G., Jimenez, J.J., Wang, Y., and Lopez, D.M. (1990). Expansion of immunoregulatory macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor derived from a murine mammary tumor. *Cancer research* 50, 227-234.
- Fukuda, M., Imai, A., Nashida, T., and Shimomura, H. (2005). Slp4-a/granuphilin-a interacts with syntaxin-2/3 in a Munc18-2-dependent manner. *J Biol Chem* 280, 39175-39184.
- Fukuda, M., Kanno, E., Saegusa, C., Ogata, Y., and Kuroda, T.S. (2002a). Slp4-a/granuphilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* 277, 39673-39678.
- Fukuda, M., Kuroda, T.S., and Mikoshiba, K. (2002b). Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem* 277, 12432-12436.
- Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., and Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* 67, 425; author reply 426.

- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268.
- Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M., and Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 166, 5398-5406.
- Galli, S.J., Borregaard, N., and Wynn, T.A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 12, 1035-1044.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.
- Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M.A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J.A., and Multhoff, G. (2005). Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 65, 5238-5247.
- Gatti, J.L., Metayer, S., Belghazi, M., Dacheux, F., and Dacheux, J.L. (2005). Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol Reprod* 72, 1452-1465.
- Gatti, R.A., and Good, R.A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 28, 89-98.
- Gazzaniga, S., Bravo, A.I., Guglielmotti, A., van Rooijen, N., Maschi, F., Vecchi, A., Mantovani, A., Mordoh, J., and Wainstok, R. (2007). Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol* 127, 2031-2041.
- Geminard, C., De Gassart, A., Blanc, L., and Vidal, M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic* 5, 181-193.
- Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 11, 1143-1149.
- Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2003). The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *The Journal of experimental medicine* 198, 747-755.
- Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605-609.
- Gnjatic, S., Atanackovic, D., Jager, E., Matsuo, M., Selvakumar, A., Altorki, N.K., Maki, R.G., Dupont, B., Ritter, G., Chen, Y.T., *et al.* (2003). Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8862-8867.

- Gomi, H., Mizutani, S., Kasai, K., Itohara, S., and Izumi, T. (2005). Granophilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J Cell Biol* 171, 99-109.
- Gomi, H., Mori, K., Itohara, S., and Izumi, T. (2007). Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the delivery of secretory granules near the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 18, 4377-4386.
- Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174, 1783-1786.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E.A., King, T.A., Norton, L., and Benezra, R. (2011). Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* 20, 300-314.
- Gregory, A.D., and Houghton, A.M. (2011). Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer research* 71, 2411-2416.
- Griscelli, C., Durandy, A., Guy-Grand, D., Daguillard, F., Herzog, C., and Prunieras, M. (1978). A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am J Med* 65, 691-702.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589-601.
- Gungor, N., Knaapen, A.M., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G.R., Chiu, R.K., Godschalk, R.W., and van Schooten, F.J. (2010). Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis* 25, 149-154.
- Haddad, E.K., Wu, X., Hammer, J.A., 3rd, and Henkart, P.A. (2001). Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J Cell Biol* 152, 835-842.
- Halin, S., Rudolfsson, S.H., Van Rooijen, N., and Bergh, A. (2009). Extratumoral macrophages promote tumor and vascular growth in an orthotopic rat prostate tumor model. *Neoplasia* 11, 177-186.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182-187.
- Hao, S., Ye, Z., Li, F., Meng, Q., Qureshi, M., Yang, J., and Xiang, J. (2006). Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp Oncol* 28, 126-131.

- Harari, O., and Liao, J.K. (2004). Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des* 10, 893-898.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97, 329-339.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 35, 256-263.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62, 1180-1190.
- Hegmans, J.P., Bard, M.P., Hemmes, A., Luijck, T.M., Kleijmeer, M.J., Prins, J.B., Zitvogel, L., Burgers, S.A., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am J Pathol* 164, 1807-1815.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791-3799.
- Hendrix, A., Maynard, D., Pauwels, P., Braems, G., Denys, H., Van den Broecke, R., Lambert, J., Van Belle, S., Cocquyt, V., Gespach, C., *et al.* (2010). Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 102, 866-880.
- Herrero-Turrion, M.J., Calafat, J., Janssen, H., Fukuda, M., and Mollinedo, F. (2008). Rab27a regulates exocytosis of tertiary and specific granules in human neutrophils. *J Immunol* 181, 3793-3803.
- Hoen, E.N., van der Vlist, E.J., Aalberts, M., Mertens, H.C., Bosch, B.J., Bartelink, W., Mastrobattista, E., van Gaal, E.V., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G.J., *et al.* (2011). Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine*.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. (2006). Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 118, 684-687.
- Houghton, A.M., Rzymkiewicz, D.M., Ji, H., Gregory, A.D., Egea, E.E., Metz, H.E., Stolz, D.B., Land, S.R., Marconcini, L.A., Kliment, C.R., *et al.* (2010). Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med* 16, 219-223.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Gronborg, M., Möbius, W., Rhee, J., *et al.* (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 189, 223-232.
- Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., *et al.* (2005). Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 128, 1796-1804.
- Huet, S., Fanget, I., Jouannot, O., Meireles, P., Zeiske, T., Larochette, N., Darchen, F., and Desnos, C. (2012). Myrip couples the capture of secretory granules by the actin-rich cell cortex and their attachment to the plasma membrane. *J Neurosci* 32, 2564-2577.
- Imai, A., Yoshie, S., Nashida, T., Shimomura, H., and Fukuda, M. (2004). The small GTPase Rab27B regulates amylase release from rat parotid acinar cells. *J Cell Sci* 117, 1945-1953.

- Imai, Y., Kubota, Y., Yamamoto, S., Tsuji, K., Shimatani, M., Shibatani, N., Takamido, S., Matsushita, M., and Okazaki, K. (2005). Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: an in vitro study. *J Gastroenterol Hepatol* 20, 287-293.
- Irion, U., and St Johnston, D. (2007). bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature* 445, 554-558.
- Jager, E., Nagata, Y., Gnjatic, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P.R., Lee, S.Y., Jungbluth, A., Jager, D., *et al.* (2000). Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4760-4765.
- Jensen, H.K., Donskov, F., Marcussen, N., Nordmark, M., Lundbeck, F., and von der Maase, H. (2009). Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 27, 4709-4717.
- Johnson, J.L., Brzezinska, A.A., Tolmachova, T., Munafo, D.B., Ellis, B.A., Seabra, M.C., Hong, H., and Catz, S.D. (2010). Rab27a and Rab27b regulate neutrophil azurophilic granule exocytosis and NADPH oxidase activity by independent mechanisms. *Traffic* 11, 533-547.
- Johnson, J.L., Hong, H., Monfregola, J., Kiosses, W.B., and Catz, S.D. (2011). Munc13-4 restricts motility of Rab27a-expressing vesicles to facilitate lipopolysaccharide-induced priming of exocytosis in neutrophils. *J Biol Chem* 286, 5647-5656.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262, 9412-9420.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-252.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556-7561.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Khong, H.T., Wang, Q.J., and Rosenberg, S.A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother* 27, 184-190.
- Kim, D.W., Min, H.S., Lee, K.H., Kim, Y.J., Oh, D.Y., Jeon, Y.K., Lee, S.H., Im, S.A., Chung, D.H., Kim, Y.T., *et al.* (2008). High tumour islet macrophage infiltration correlates with improved patient survival but not with EGFR mutations, gene copy number or protein expression in resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 98, 1118-1124.
- Kirk, G.D., Merlo, C., P, O.D., Mehta, S.H., Galai, N., Vlahov, D., Samet, J., and Engels, E.A. (2007). HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. *Clin Infect Dis* 45, 103-110.
- Klein, C., Philippe, N., Le Deist, F., Fraitag, S., Prost, C., Durandy, A., Fischer, A., and Griscelli, C. (1994). Partial albinism with immunodeficiency (Griscelli syndrome). *J Pediatr* 125, 886-895.

- Klibi, J., Niki, T., Riedel, A., Pioche-Durieu, C., Souquere, S., Rubinstein, E., Le Moulec, S., Guigay, J., Hirashima, M., Guemira, F., *et al.* (2009). Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 113, 1957-1966.
- Klymkowsky, M.W., and Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American journal of pathology* 174, 1588-1593.
- Knaapen, A.M., Gungor, N., Schins, R.P., Borm, P.J., and Van Schooten, F.J. (2006). Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis* 21, 225-236.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903-907.
- Kuroda, T.S., and Fukuda, M. (2004). Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes. *Nat Cell Biol* 6, 1195-1203.
- Kusmartsev, S., and Gabrilovich, D.I. (2005). STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* 174, 4880-4891.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., and Gabrilovich, D.I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 172, 989-999.
- Kusmartsev, S.A., Li, Y., and Chen, S.H. (2000). Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J Immunol* 165, 779-785.
- Laulagnier, K., Vincent-Schneider, H., Hamdi, S., Subra, C., Lankar, D., and Record, M. (2005). Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood Cells Mol Dis* 35, 116-121.
- Leek, R.D., Talks, K.L., Pezzella, F., Turley, H., Campo, L., Brown, N.S., Bicknell, R., Taylor, M., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2002). Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer research* 62, 1326-1329.
- Li, J., Sherman-Baust, C.A., Tsai-Turton, M., Bristow, R.E., Roden, R.B., and Morin, P.J. (2009). Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC Cancer* 9, 244.
- Lima, L.G., Chammas, R., Monteiro, R.Q., Moreira, M.E., and Barcinski, M.A. (2009). Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett* 283, 168-175.
- Lin, E.Y., Li, J.F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D.A., Qian, H., Xue, X.N., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer research* 66, 11238-11246.
- Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of experimental medicine* 193, 727-740.

- Liu, C., Yu, S., Zinn, K., Wang, J., Zhang, L., Jia, Y., Kappes, J.C., Barnes, S., Kimberly, R.P., Grizzle, W.E., *et al.* (2006). Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* *176*, 1375-1385.
- Liu, D., Meckel, T., and Long, E.O. (2010a). Distinct role of rab27a in granule movement at the plasma membrane and in the cytosol of NK cells. *PLoS ONE* *5*, e12870.
- Liu, Y., Xiang, X., Zhuang, X., Zhang, S., Liu, C., Cheng, Z., Michalek, S., Grizzle, W., and Zhang, H.G. (2010b). Contribution of MyD88 to the Tumor Exosome-Mediated Induction of Myeloid Derived Suppressor Cells. *Am J Pathol*.
- Loeser, S., Loser, K., Bijker, M.S., Rangachari, M., van der Burg, S.H., Wada, T., Beissert, S., Melief, C.J., and Penninger, J.M. (2007). Spontaneous tumor rejection by cbl-b-deficient CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* *204*, 879-891.
- Mackensen, A., Ferradini, L., Carcelain, G., Triebel, F., Faure, F., Viel, S., and Hercend, T. (1993). Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer research* *53*, 3569-3573.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* *11*, 519-531.
- Mathivanan, S., Lim, J.W., Tauro, B.J., Ji, H., Moritz, R.L., and Simpson, R.J. (2010). Proteomic analysis of A33-immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics* *9*, 197-208.
- Mathivanan, S., and Simpson, R.J. (2009). ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* *9*, 4997-5000.
- Mears, R., Craven, R.A., Hanrahan, S., Totty, N., Upton, C., Young, S.L., Patel, P., Selby, P.J., and Banks, R.E. (2004). Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* *4*, 4019-4031.
- Medema, J.P., de Jong, J., Peltenburg, L.T., Verdegaal, E.M., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J., *et al.* (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 11515-11520.
- Menager, M.M., Menasche, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C.H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2007). Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* *8*, 257-267.
- Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., *et al.* (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* *25*, 173-176.
- Miao, Y., Everly, J.J., Gross, T.G., Tevar, A.D., First, M.R., Alloway, R.R., and Woodle, E.S. (2009). De novo cancers arising in organ transplant recipients are associated with adverse outcomes compared with the general population. *Transplantation* *87*, 1347-1359.
- Millimaggi, D., Mari, M., D'Ascenzo, S., Carosa, E., Jannini, E.A., Zucker, S., Carta, G., Pavan, A., and Dolo, V. (2007). Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia* *9*, 349-357.

- Mineo, M., Garfield, S.H., Taverna, S., Flugy, A., De Leo, G., Alessandro, R., and Kohn, E.C. (2012). Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis* 15, 33-45.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2, 282.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450, 435-439.
- Mobius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E.G., Oorschot, V.M., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H.F., Geuze, H.J., and Slot, J.W. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J Histochem Cytochem* 50, 43-55.
- Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepfer, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K., *et al.* (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283-1298.
- Moloney, F.J., Comber, H., O'Lorcain, P., O'Kelly, P., Conlon, P.J., and Murphy, G.M. (2006). A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 154, 498-504.
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., *et al.* (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756-766.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., *et al.* (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257-3266.
- Morse, M.A., Garst, J., Osada, T., Khan, S., Hobeika, A., Clay, T.M., Valente, N., Shreeniwas, R., Sutton, M.A., Delcayre, A., *et al.* (2005). A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 3, 9.
- Movahedi, K., Williams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233-4244.
- Mroczko, B., Szmitkowski, M., Wereszczynska-Siemiatkowska, U., Okulczyk, B., and Kedra, B. (2007). Pretreatment serum levels of hematopoietic cytokines in patients with colorectal adenomas and cancer. *Int J Colorectal Dis* 22, 33-38.
- Muntasell, A., Berger, A.C., and Roche, P.A. (2007). T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J* 26, 4263-4272.
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J., and Gabrilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 13, 828-835.
- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research* 58, 3491-3494.

- Neeft, M., Wieffer, M., de Jong, A.S., Negroiu, G., Metz, C.H., van Loon, A., Griffith, J., Krijgsveld, J., Wulffraat, N., Koch, H., *et al.* (2005). Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Mol Biol Cell* *16*, 731-741.
- Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X.O., and Widmark, A. (2009). Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer* *100*, 1603-1607.
- Nolte-'t Hoen, E.N., Buschow, S.I., Anderton, S.M., Stoorvogel, W., and Wauben, M.H. (2009). Activated T-cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* *113*, 1977-1981.
- Nozawa, H., Chiu, C., and Hanahan, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12493-12498.
- Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C., and Rodriguez, P.C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* *13*, 721s-726s.
- Old, L.J., and Boyse, E.A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med* *15*, 167-186.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer research* *59*, 3128-3133.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., *et al.* (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* *12*, 19-30.
- Pages, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., *et al.* (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* *353*, 2654-2666.
- Palanisamy, V., Sharma, S., Deshpande, A., Zhou, H., Gimzewski, J., and Wong, D.T. (2010). Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One* *5*, e8577.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* *101*, 942-948.
- Parish, C.R. (2003). Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. *Immunol Cell Biol* *81*, 106-113.
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., de Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M.A., Molinari, A., *et al.* (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* *284*, 34211-34222.
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Wurdinger, T., and Middeldorp, J.M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 6328-6333.
- Pekarek, L.A., Starr, B.A., Toledano, A.Y., and Schreiber, H. (1995). Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *The Journal of experimental medicine* *181*, 435-440.

- Penn, I. (1996). Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 61, 274-278.
- Penn, I. (1999). Posttransplant malignancies. *Transplant Proc* 31, 1260-1262.
- Pisitkun, T., Shen, R.F., and Knepper, M.A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13368-13373.
- Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.
- Potolicchio, I., Carven, G.J., Xu, X., Stipp, C., Riese, R.J., Stern, L.J., and Santambrogio, L. (2005). Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J Immunol* 175, 2237-2243.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
- Qin, Z., and Blankenstein, T. (2004). A cancer immunosurveillance controversy. *Nat Immunol* 5, 3-4; author reply 4-5.
- Qin, Z., Kim, H.J., Hemme, J., and Blankenstein, T. (2002). Inhibition of methylcholanthrene-induced carcinogenesis by an interferon gamma receptor-dependent foreign body reaction. *The Journal of experimental medicine* 195, 1479-1490.
- Queen, M.M., Ryan, R.E., Holzer, R.G., Keller-Peck, C.R., and Jorcyk, C.L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer research* 65, 8896-8904.
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11172-11177.
- Rakhmilevich, A.L., Janssen, K., Hao, Z., Sondel, P.M., and Yang, N.S. (2000). Interleukin-12 gene therapy of a weakly immunogenic mouse mammary carcinoma results in reduction of spontaneous lung metastases via a T-cell-independent mechanism. *Cancer Gene Ther* 7, 826-838.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161-1172.
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., and Desaymard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 8, 2631-2645.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., and Ratajczak, M.Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20, 847-856.
- Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., and Wentzensen, N. (2009). A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1535-1544.
- Rialland, P., Lankar, D., Raposo, G., Bonnerot, C., and Hubert, P. (2006). BCR-bound antigen is targeted to exosomes in human follicular lymphoma B-cells. *Biol Cell* 98, 491-501.

- Rieu, S., Geminard, C., Rabesandratana, H., Sainte-Marie, J., and Vidal, M. (2000). Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. *Eur J Biochem* 267, 583-590.
- Robinson, B.D., Sica, G.L., Liu, Y.F., Rohan, T.E., Gertler, F.B., Condeelis, J.S., and Jones, J.G. (2009). Tumor microenvironment of metastasis in human breast carcinoma: a potential prognostic marker linked to hematogenous dissemination. *Clin Cancer Res* 15, 2433-2441.
- Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., and Ochoa, A.C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109, 1568-1573.
- Rodriguez, P.C., Zea, A.H., Culotta, K.S., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., and Ochoa, A.C. (2002). Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of biological chemistry* 277, 21123-21129.
- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T., and Stehelin, D. (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* 281, 452-455.
- Saegusa, C., Tanaka, T., Tani, S., Itohara, S., Mikoshiba, K., and Fukuda, M. (2006). Decreased basal mucus secretion by Slp2-a-deficient gastric surface mucous cells. *Genes Cells* 11, 623-631.
- Saji, H., Koike, M., Yamori, T., Saji, S., Seiki, M., Matsushima, K., and Toi, M. (2001). Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer* 92, 1085-1091.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjjatic, S., Ambrosone, C., *et al.* (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18538-18543.
- Saunderson, S.C., Schuberth, P.C., Dunn, A.C., Miller, L., Hock, B.D., MacKay, P.A., Koch, N., Jack, R.W., and McLellan, A.D. (2008). Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J Immunol* 180, 8146-8152.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., and Colombo, M.I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6, 131-143.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278, 20083-20090.
- Seabra, M.C., Ho, Y.K., and Anant, J.S. (1995). Deficient geranylgeranylation of Ram/Rab27 in choroideremia. *J Biol Chem* 270, 24420-24427.
- Segura, E., Guerin, C., Hogg, N., Amigorena, S., and Thery, C. (2007). CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol* 179, 1489-1496.
- Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Veron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S., and Thery, C. (2005). ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106, 216-223.

- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107-1111.
- Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* *33*, 787-791.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* *163*, 5211-5218.
- Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Park, J.Y., Lee, J.H., Lee, S.K., Lee, S.N., Jung, S.S., *et al.* (2001). Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer research* *61*, 4942-4946.
- Shojaei, F., Wu, X., Zhong, C., Yu, L., Liang, X.H., Yao, J., Blanchard, D., Bais, C., Peale, F.V., van Bruggen, N., *et al.* (2007). Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* *450*, 825-831.
- Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 575-581.
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* *10*, 1470-1476.
- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* *13*, 459-463.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* *90*, 1-50.
- Smyth, M.J., Kelly, J.M., Baxter, A.G., Korner, H., and Sedgwick, J.D. (1998). An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *The Journal of experimental medicine* *188*, 1611-1619.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000a). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of experimental medicine* *191*, 661-668.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000b). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine* *192*, 755-760.
- Song, X., Krelin, Y., Dvorkin, T., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E., and Apte, R.N. (2005). CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1 β -secreting cells. *J Immunol* *175*, 8200-8208.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* *149*, 901-914.

- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 447-458.
- Spector, D.H., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1978). Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4102-4106.
- Starzl, T.E., Porter, K.A., Andres, G., Halgrimson, C.G., Hurwitz, R., Giles, G., Terasaki, P.I., Penn, I., Schroter, G.T., Lilly, J., *et al.* (1970). Long-term survival after renal transplantation in humans: (with special reference to histocompatibility matching, thymectomy, homograft glomerulonephritis, heterologous ALG, AND RECIPIENT MALIGNANCY). *Ann Surg* 172, 437-472.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., and Vogt, P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-173.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-525.
- Stinchcombe, J.C., Barral, D.C., Mules, E.H., Booth, S., Hume, A.N., Machesky, L.M., Seabra, M.C., and Griffiths, G.M. (2001). Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol* 152, 825-834.
- Street, S.E., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192-197.
- Street, S.E., Trapani, J.A., MacGregor, D., and Smyth, M.J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine* 196, 129-134.
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183, 534-536.
- Stutman, O. (1979). Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst* 62, 353-358.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89, 205-212.
- Swann, J.B., Uldrich, A.P., van Dommelen, S., Sharkey, J., Murray, W.K., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2009). Type I natural killer T cells suppress tumors caused by p53 loss in mice. *Blood* 113, 6382-6385.
- Takahashi, H., Feuerhake, F., Kutok, J.L., Monti, S., Dal Cin, P., Neuberg, D., Aster, J.C., and Shipp, M.A. (2006). FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clin Cancer Res* 12, 3265-3271.
- Taylor, D.D., Akyol, S., and Gercel-Taylor, C. (2006). Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol* 176, 1534-1542.
- Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2005). Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer* 92, 305-311.

- Terabe, M., and Berzofsky, J.A. (2004). Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 16, 157-162.
- They, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 3*, Unit 3 22.
- They, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166, 7309-7318.
- They, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 581-593.
- They, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 147, 599-610.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thomas (1959). Discussion of cellular and humoral aspects of the hypersensitivity states. Lawrence HS, ed New York: Hoeber-Harper, 529-532.
- Tiwari, S., Italiano, J.E., Jr., Barral, D.C., Mules, E.H., Novak, E.K., Swank, R.T., Seabra, M.C., and Shivdasani, R.A. (2003). A role for Rab27b in NF-E2-dependent pathways of platelet formation. *Blood* 102, 3970-3979.
- Tlsty, T.D., and Coussens, L.M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annual review of pathology* 1, 119-150.
- Tolmachova, T., Abrink, M., Futter, C.E., Authi, K.S., and Seabra, M.C. (2007). Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5872-5877.
- Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., Huxley, C., and Seabra, M.C. (2004). A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol Biol Cell* 15, 332-344.
- Tonini, T., Rossi, F., and Claudio, P.P. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 22, 6549-6556.
- Torii, S., Takeuchi, T., Nagamatsu, S., and Izumi, T. (2004). Rab27 effector granuphilin promotes the plasma membrane targeting of insulin granules via interaction with syntaxin 1a. *J Biol Chem* 279, 22532-22538.
- Torii, S., Zhao, S., Yi, Z., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). Granuphilin modulates the exocytosis of secretory granules through interaction with syntaxin 1a. *Mol Cell Biol* 22, 5518-5526.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244-1247.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, N., Jr., and Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 645, 63-70.

- Tsuboi, T. (2008). Molecular mechanism of docking of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Med Mol Morphol* *41*, 68-75.
- Tsuboi, T., and Fukuda, M. (2005). The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* *280*, 39253-39259.
- Tsuboi, T., and Fukuda, M. (2006). The Slp4-a linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1-syntaxin-1a complex. *Mol Biol Cell* *17*, 2101-2112.
- Ueda, R., Shiku, H., Pfreundschuh, M., Takahashi, T., Li, L.T., Whitmore, W.F., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1979). Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing. *The Journal of experimental medicine* *150*, 564-579.
- Ueha, S., Shand, F.H., and Matsushima, K. (2011). Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol* *11*, 783-788.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* *9*, 654-659.
- Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Pilla, L., Sovena, G., Villa, A., Corbelli, A., Fais, S., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (2006). Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* *66*, 9290-9298.
- van den Broek, M.E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., Melief, C.J., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* *184*, 1781-1790.
- van Houdt, I.S., Sluijter, B.J., Moesbergen, L.M., Vos, W.M., de Gruijl, T.D., Molenkamp, B.G., van den Eertwegh, A.J., Hooijberg, E., van Leeuwen, P.A., Meijer, C.J., *et al.* (2008). Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer* *123*, 609-615.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* *21*, 708-721.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* *121*, 337-349.
- Vega, V.L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrman, M., Diaz, J.C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., and De Maio, A. (2008). Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol* *180*, 4299-4307.
- Veron, P., Segura, E., Sugano, G., Amigorena, S., and Thery, C. (2005). Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis* *35*, 81-88.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* *29*, 235-271.

- Viaud, S., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Andre, F., Novault, S., Escudier, B., Robert, C., Caillat-Zucman, S., Tursz, T., *et al.* (2009). Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15 α . *PLoS ONE* 4, e4942.
- Vidal, M., Mangeat, P., and Hoekstra, D. (1997). Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci* 110 (Pt 16), 1867-1877.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27, 5932-5943.
- Watanabe, S., Deguchi, K., Zheng, R., Tamai, H., Wang, L.X., Cohen, P.A., and Shu, S. (2008). Tumor-induced CD11b $^{+}$ Gr-1 $^{+}$ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes. *J Immunol* 181, 3291-3300.
- Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8 $^{+}$ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer research* 65, 5020-5026.
- White, I.J., Bailey, L.M., Aghakhani, M.R., Moss, S.E., and Futter, C.E. (2006). EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J* 25, 1-12.
- Williams, R.L., and Urbe, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 355-368.
- Wilson, S.M., Yip, R., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Zhang, Y., Novak, E.K., Swank, R.T., Russell, L.B., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2000). A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7933-7938.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 25, 85-101.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., They, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., *et al.* (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7, 297-303.
- Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R., and June, C.H. (2001). Regulatory CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer research* 61, 4766-4772.
- Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Hammer, J.A., 3rd (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol* 4, 271-278.
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278, 10963-10972.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer research* 64, 7022-7029.

- Xiang, X., Poliakov, A., Liu, C., Liu, Y., Deng, Z.B., Wang, J., Cheng, Z., Shah, S.V., Wang, G.J., Zhang, L., *et al.* (2009). Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer* 124, 2621-2633.
- Yang, L., DeBusk, L.M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L.M., Carbone, D.P., and Lin, P.C. (2004). Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 409-421.
- Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A.E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D.P., Matrisian, L.M., Richmond, A., Lin, P.C., *et al.* (2008). Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13, 23-35.
- Yang, R., Cai, Z., Zhang, Y., Yutzy, W.H.t., Roby, K.F., and Roden, R.B. (2006). CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer research* 66, 6807-6815.
- Yi, Z., Yokota, H., Torii, S., Aoki, T., Hosaka, M., Zhao, S., Takata, K., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol Cell Biol* 22, 1858-1867.
- Youn, J.I., and Gabrilovich, D.I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* 40, 2969-2975.
- Young, M.R., Wright, M.A., Matthews, J.P., Malik, I., and Prechel, M. (1996). Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide. *J Immunol* 156, 1916-1922.
- Young, M.R., Wright, M.A., and Young, M.E. (1991). Antibodies to colony-stimulating factors block Lewis lung carcinoma cell stimulation of immune-suppressive bone marrow cells. *Cancer Immunol Immunother* 33, 146-152.
- Yu, S., Liu, C., Su, K., Wang, J., Liu, Y., Zhang, L., Li, C., Cong, Y., Kimberly, R., Grizzle, W.E., *et al.* (2007). Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J Immunol* 178, 6867-6875.
- Zabuawala, T., Taffany, D.A., Sharma, S.M., Merchant, A., Adair, B., Srinivasan, R., Rosol, T.J., Fernandez, S., Huang, K., Leone, G., *et al.* (2010). An ets2-driven transcriptional program in tumor-associated macrophages promotes tumor metastasis. *Cancer research* 70, 1323-1333.
- Zeelenberg, I.S., Ostrowski, M., Krumeich, S., Bobrie, A., Jancic, C., Boissonnas, A., Delcayre, A., Le Pecq, J.B., Combadiere, B., Amigorena, S., *et al.* (2008). Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res* 68, 1228-1235.
- Zeisberger, S.M., Odermatt, B., Marty, C., Zehnder-Fjallman, A.H., Ballmer-Hofer, K., and Schwendener, R.A. (2006). Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* 95, 272-281.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-117.

- Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., *et al.* (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 203-213.
- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., *et al.* (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 39, 133-144.
- Zhao, S., Torii, S., Yokota-Hashimoto, H., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). Involvement of Rab27b in the regulated secretion of pituitary hormones. *Endocrinology* 143, 1817-1824.
- Zhu, X.D., Zhang, J.B., Zhuang, P.Y., Zhu, H.G., Zhang, W., Xiong, Y.Q., Wu, W.Z., Wang, L., Tang, Z.Y., and Sun, H.C. (2008). High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 26, 2707-2716.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4, 594-600.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6, 715-727.
- Zorn, E., and Hercend, T. (1999a). A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion. *Eur J Immunol* 29, 602-607.
- Zorn, E., and Hercend, T. (1999b). A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation. *Eur J Immunol* 29, 592-601.
- Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6, 295-307.