

Université de Montréal

Développement de modèles précliniques humanisés autologues en immuno-oncologie

par Gaël Moquin-Beaudry

Département de pharmacologie et physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor*
en Pharmacologie
option Cheminement libre

Août 2019

© Gaël Moquin-Beaudry, 2019

Cette thèse intitulée

Développement de modèles précliniques humanisés autologues en immuno-oncologie

Présentée par

Gaël Moquin-Beaudry

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Jean-François Gauchat

Président-rapporteur

Christian Beauséjour

Directeur de recherche

Sébastien Talbot

Membre du jury

François Mercier

Examineur externe

Résumé

La reconnaissance de l'implication du système immunitaire dans le cancer a guidé l'industrie vers le développement d'immunothérapies nombreuses et prometteuses. Or, à l'ère de l'immuno-oncologie, on constate un manque criant de modèles précliniques capables de simuler les interactions immunitaires entre un patient et sa tumeur.

Pour remédier à cette situation, nous avons développé des modèles de souris humanisées combinant la reconstitution immunitaire de souris immunodéficiente et l'injection de lignées tumorales issues d'un même donneur. L'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) a permis notamment le développement de multiples lignées tumorales à partir d'un seul donneur sain, facilitant ainsi l'accès aux cellules immunitaires nécessaires à l'humanisation des souris. La transformation des cellules primaires ou dérivées d'iPSC a été faite par la transduction lentivirale des proto-oncogènes de la télomérase (hTERT), de Ras oncogénique (HRAS^{V12}) et de la région précoce du virus simen 40 (*SV40ER*) encodant les gros et petits antigènes T (LgT et SmT).

Cette approche a permis de générer des tumeurs de haut grade, agressives et peu différenciées à l'aide de fibroblastes primaires et de cellules hépatiques, de cellules souches neurales et d'astrocytes dérivés d'iPSC. Dans tous les cas, les tumeurs ainsi générées ont été efficacement reconnues, infiltrées et souvent rejetées par le système immunitaire autologue implanté. Le rejet partiel de la plupart de ces tumeurs ouvre toutefois la porte à l'évaluation préclinique d'immunothérapies diverses reposant sur les réactions immunitaires anti-tumorales de l'hôte. Par exemple, nous avons pu étudier l'impact d'un traitement d'inhibition du point de contrôle immunitaire PD-1 sur la croissance de tumeurs d'origine fibroblastique où une augmentation marquée du taux d'infiltration immunitaire humaine a été observée sans toutefois mener à une réduction significative du fardeau tumoral. Nous avons aussi pu produire, de façon autologue, des lymphocytes T exprimant un récepteur d'antigène chimérique (CAR) contre le ganglioside GD2, un antigène tumoral préalablement identifié et détecté sur les tumeurs de cellules souches neurales générées par notre approche. L'efficacité cytotoxique de ces CAR a ainsi pu être validée *in vitro* dans un système autologue. Finalement, nous avons utilisé le modèle de tumeurs fibroblastiques dans des contextes immunitaires autologues et allogéniques

pour déterminer si le potentiel immunomodulateur des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) pouvait affecter la croissance tumorale. Selon nos résultats, les MSC n'auraient aucun effet ni sur le taux d'émergence et de croissance tumoral, ni sur l'infiltrat immunitaire, suggérant que leur utilisation thérapeutique serait sécuritaire en ce qui concerne ce type de tumeurs ayant préalablement un microenvironnement tumoral immunosuppresseur.

En somme, les modèles innovateurs décrits dans cette thèse visent à améliorer la qualité prédictive des modèles murins précliniques en immuno-oncologie en récapitulant certaines interactions immunitaires entre un patient et sa tumeur. La grande flexibilité de cette approche permettra d'adapter aisément le modèle aux problématiques d'intérêt, tant fondamentales que précliniques.

Mots-clés : Immunologie tumorale, immuno-oncologie, cancer, iPSC, souris humanisées, immunothérapie du cancer, cellules stromales mésenchymateuse, transformation tumorale.

Abstract

Identification of the human's immune system implication in cancer has guided the biotech industry towards the development of numerous and promising cancer immunotherapies. However, in the era of immuno-oncology, a distinct lack preclinical models can simulate the interactions between a patient's tumor and immune cells.

To tackle this issue, we developed humanized mouse models combining immune reconstitution of immunodeficient mice and injection of tumor cells lines from the same human donor. The use of induced pluripotent stem cells (iPSC) allowed the generation of multiple tumorigenic cell lines from a single donor, facilitating access to autologous immune cells necessary for mouse immune humanization. The transformation of primary or iPSC-derived cell lines was done using lentiviral transduction of proto-oncogenes telomerase (hTERT), oncogenic Ras (HRAS^{V12}) and simian virus 40 early region (*SV40ER*) encoding large and small T antigens (LgT and SmT).

This approach allowed to generate high grade, aggressive and undifferentiated tumors from primary fibroblasts and iPSC-derived hepatic cells, neural stem cells and astrocytes. In all cases, such tumors were efficiently recognized, infiltrated and often rejected by the implanted autologous immune system. However, partial rejection of most tumors allows for preclinical evaluation of targeted immunotherapies relying on the hosts' pre-existing immune response. For instance, we could study the impact of PD-1 checkpoint blockade inhibition on tumor growth in fibroblastic tumors where a significant increase in tumor infiltration was observed, but without an associated decrease in tumor burden. We could also produce autologous chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T lymphocytes against GD2 ganglioside, a previously described tumor antigen detected on our neural stem cell-derived tumor cells. Cytotoxic efficiency of these autologous CAR T cells could thus be validated *in vitro*. Finally, we used our fibroblast-derived tumor models in autologous and allogeneic settings to determine if mesenchymal stem cells' (MSC) immunomodulatory potential could impact tumor growth. Our results showed that MSC had no effect neither on tumor emergence and growth nor on immune infiltration, suggesting therapeutic use of these cells should be safe regarding such tumors already harboring a strongly immunodeficient microenvironment. Overall, the novel models described in this thesis aim at

improving the predictive capacity of mouse pre-clinical models in immuno-oncology by recapitulating some immune interactions between a patient and its tumor. The great flexibility of this approach will allow for easy adaptation to many research problematics both preclinical and fundamental.

Keywords : Tumor immunology, immuno-oncology, cancer, iPSC, humanized mice, cancer immunotherapy, mesenchymal stromal cells, tumorigenic transformation

Table des matières

RÉSUMÉ	1
ABSTRACT.....	3
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLES.....	9
ABRÉVIATIONS.....	10
REMERCIEMENTS.....	14
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	18
1.1 Le cancer.....	18
1.1.1 Types de cancers et nomenclature.....	19
1.1.2 Processus de transformation tumorale	21
1.1.2.1 Transformation induite	21
1.1.2.1.1 SV40ER	22
1.1.2.1.1.1 Large T	23
1.1.2.1.1.2 Small T	23
1.1.2.1.2 Ras.....	24
1.1.2.1.3 hTERT.....	24
1.1.3 Modèles précliniques de cancer	25
1.1.3.1 Modèles <i>in vitro</i>	25
1.1.3.2 Modèles murins <i>in vivo</i>	26
1.1.3.2.1 Tumeurs induites chimiquement.....	27
1.1.3.2.2 Modèles murins génétiquement modifiés (GEMM).....	28
1.1.3.2.3 Lignées tumorales murines	29
1.1.3.3 Modèles humains <i>in vivo</i>	30
1.1.3.3.1 Lignées tumorales <i>in vivo</i>	30
1.1.3.3.2 Xénogreffes dérivées de patients (PDX).....	31
1.1.3.4 Cellules souches pluripotentes induites.....	33
1.1.3.4.1 Processus de reprogrammation	33
1.1.3.4.2 Différenciation somatique.....	34
1.1.3.4.2.1 Cellules progénitrices neuronales et astrocytes	35

1.1.3.4.2.2 Hépatocytes	35
1.1.4 Microenvironnement tumoral (MET)	36
1.2 Immuno-oncologie.....	39
1.2.1 Théorie de l'immunoédition tumorale	39
1.2.1.1 Élimination	40
1.2.1.2 Équilibre	42
1.2.1.3 Évasion	42
1.2.2 Cellules et molécules impliquées dans la réponse tumorale	45
1.2.2.1 Lymphocytes T	45
1.2.2.1.1 $\gamma\delta$ T.....	45
1.2.2.1.2 T cytotoxiques.....	46
1.2.2.1.3 T auxiliaires	47
1.2.2.1.4 Lymphocytes T régulateurs (Treg)	48
1.2.2.2 Cellules NK	50
1.2.2.3 Cellules présentatrices d'antigènes.....	51
1.2.2.3.1 Cellules dendritiques.....	51
1.2.2.3.2 Macrophages	52
1.2.2.4 Autres cellules myéloïdes.....	53
1.2.2.5 Molécules importantes en immuno-oncologie	55
1.2.2.5.1 Interféron gamma.....	55
1.2.2.5.2 Cytokines immunosuppressives.....	56
1.2.3 Approches thérapeutiques en immuno-oncologie.....	57
1.2.3.1 Anticorps thérapeutiques	57
1.2.3.2 Inhibiteurs de point de contrôle.....	58
1.2.3.3 Récepteurs d'antigènes chimériques (CAR)	59
1.2.3.4 Vaccination thérapeutique	60
1.2.4 Biomarqueurs cliniques en immuno-oncologie	61
1.2.4.1 Infiltration immunitaire	61
1.2.4.2 Biomarqueurs fonctionnels.....	63
1.2.5 Modèles précliniques humanisés.....	64
1.2.5.1 Lignées murines immunodéficientes	65
1.2.5.2 Transfert adoptif.....	66

1.2.5.3	Hu-CD34	66
1.2.5.4	Hu-BLT	67
1.3	Cellules stromales mésenchymateuses	70
1.3.1	Définition	70
1.3.2	Différentes sources de MSCs.....	70
1.3.3	Propriétés et fonctions connues.....	71
1.3.3.1	Propriétés immunitaires.....	71
1.3.3.2	Migration vers les sites d'inflammation	72
1.3.3.3	Différenciation et réparation tissulaire	72
1.3.4	Applications thérapeutiques	74
1.3.5	MSC dans le cancer.....	74
1.4	Hypothèse et objectifs.....	76
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS.....		79
2.1	Premier article : présentation du modèle	79
2.1.1	Compléments au premier article	122
2.2	Deuxième article : impact des MSC sur la croissance tumorale	123
CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....		163
3.1	Modèles actuels	163
3.2	Processus de transformation	166
3.3	Rejet tumoral	171
3.4	Stroma tumoral	175
CHAPITRE 4 : CONCLUSION		177
BIBLIOGRAPHIE		179

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Les caractéristiques du cancer.	19
Figure 1.2 Caractéristiques moléculaires de <i>SV40ER</i>.	22
Figure 1.3 Établissement et usages des modèles PDX.	31
Figure 1.4 Processus de différenciation astrocytaire à partir d'iPSCs.	34
Figure 1.5 Processus de différenciation hépatocytaire à partir d'iPSC	35
Figure 1.6 Implications du microenvironnement résident et activé dans le phénotype cancéreux.	37
Figure 1.7 les 3 étapes de l'immunoédition.	40
Figure 1.8 Évasion immunitaire par les cellules cancéreuses.	43
Figure 1.9 Impact des cellules $\gamma\delta$T murines sur la croissance tumorale.	46
Figure 1.10 Mécanismes d'immunosuppression par les Treg.	50
Figure 1.11 Fonctions pro-tumorales des TAMs.	53
Figure 1.12 Différentes méthodologies de vaccination thérapeutique contre le cancer ...	60
Figure 1.13 Caractérisation de l'infiltration tumorale	62
Figure 1.14 Potentiel de différenciation des MSC.	73
Figure 1.15 Taux d'approbation de nouvelles thérapies en oncologie	76
Figure 3.1 Design de cassette polycistronique pour transformation cellulaire	165
Figure 3.2 Potentiel de transformation tumorale des hépatocytes dérivés d'iPSC	168

Liste des tables

Tableau 1.1: Classification des cancers	20
Tableau 1.2 Exemples de carcinogènes identifiés chez les modèles de rongeurs	27
Tableau 1.3 Propriétés des modèles en oncologie	32
Tableau 1.4 Propriétés des modèles précliniques d'humanisation immunitaire en immuno-oncologie	69

Abréviations

ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps
ARG1	Arginase 1
bFGF	Facteur de croissance de fibroblastes basique
BMP	Protéine morphogénétique de l'os
CAF	Fibroblastes associés aux cancer
CAR	Récepteur d'antigène chimérique
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
cDC	Cellules dendritiques conventionnelles
CSF-1	Facteur stimulateur de colonies 1
DC	Cellules dendritiques
DKC1	Dyskerine
ECM	Matrice extracellulaire
EMT	Transition epithelio-mésenchymateuse
FOXP3	Facteur de transcription forkhead box P3
G-CSF	Facteur stimulateur de colonies de granulocytes
GEMM	Modèles murins génétiquement modifiés
GFP	Protéine fluorescente verte
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages
haIL-2R	Récepteur d'IL-2 à haute affinité
HGF	Facteur de croissance hépatique
HLA	Antigène des leucocytes humains
HNSCC	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
Hsc70	Protéine de choc thermique 70
hTERT	Reverse transcriptase de télomerase
Hu-PBMC	Souris humanisée à l'aide de PBMC
ICD-O-3	<i>International Classification of Disease for Oncology</i>
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygénase 1
IFNGR	Récepteur à l'interféron gamma
IFN γ	Interferon gamma

IL	Interleukine
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites
KIR	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
Kyn	Métabolites de l'acide kynurénique
LAG3	Gène activateur des lymphocytes-3
LgT	Grand antigène T du virus SV40
mAb	Anticorps monoclonaux
M-CSF	Facteur stimulateur de colonies de macrophages
MDSC	Cellules myéloïdes suppressives
MET	Microenvironnement tumoral
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MICA/B	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A et B</i>
MØ	Macrophages
mRFP	Protéine fluorescente rouge monomérique
MSC	Cellules stromales mésenchymateuses
NCI	<i>National cancer institute</i> des États-Unis
NK	Cellules tueuses naturelles
NKR	Récepteur de cellule NK
NKT	Tueurs naturels T
NO	Oxide nitrique
NOD	Diabétique non-obèse
NPC	Cellules neurales progénitrices
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PD-L1	Ligand de mort programmée 1
PDX	Xénotgreffe dérivée de patient
PGE2	Prostaglandine E2
PP2A	Phosphatase protéique 2A
PRKDC	Protéine kinase dépendante de l'ADN
RAG1	Gène associé à la recombinaison 1
scFv	Fragment variable en simple chaîne
scid	Immunodéficiência combinée sévère
SDF-1	Facteur dérivé de cellules stromales

SI	Système immunitaire
SmT	Petit antigène T du virus SV40
SV40ER	Région précoce du virus simien 40
TAA	Antigène associé aux tumeurs
TAM	Macrophages associés aux tumeurs
TCR	Récepteur de cellule T
TERC	Composantes ARN de télomérase
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
TIL	Lymphocytes infiltrant la tumeur
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin domain containing-3</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRAIL	<i>Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>
TRAILR	Récepteur TRAIL
Treg	Lymphocytes T régulateurs
Trp	Tryptophane
ULBP	Protéines liant UL-16
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial
VEGF	Facteur de croissance vasculaire épithélial
$\gamma\delta$ T	Lymphocytes T de type $\gamma\delta$

À Laure, pour tout et encore plus

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres du comité de thèse qui ont gracieusement accepté de participer à ce moment important de ma vie. Dr **François Mercier**, M **Jean-François Gauchat** et M **Sébastien Talbot**, je vous remercie chaleureusement pour vos commentaires et votre implication durant cette épreuve finale de mon parcours.

À mon directeur de recherche, **Christian Beauséjour**, je dis aussi un sincère et profond merci. Tu m'as véritablement accompagné, guidé et soutenu depuis que j'ai mis les pieds dans le laboratoire en 2012, il y a près de 7 ans. Dès le début tu as cru en moi et m'as fait confiance et j'espère te prouver aujourd'hui que tu as eu raison. Tu as été pour moi un exemple de candeur, d'équilibre et de rigueur. Tout les membres du laboratoire et de l'institut qui ont eu la chance de te côtoyer seront d'accord que tu es un PI extraordinaire. Attentif et compréhensif, tu as su nous pousser aux bons moments et nous récupérer aux plus mauvais (et on sait qu'il y en a eu). Tu as cru en moi quand je n'y croyais plus, tu as compris mes besoins et jamais tu ne m'as poussé au-delà du raisonnable. Je ressors de mon expérience dans ton laboratoire plus confiant en mes aptitudes, conscient de mes forces et mes faiblesses, mais surtout infiniment reconnaissant pour la place que tu m'as permis d'occuper dans le laboratoire toutes ces années.

Un merci aussi au **Centre de recherche du CHU Sainte-Justine** dans son ensemble. C'est un environnement que j'ai toujours adoré, où je me suis senti chez moi et fier d'y être. Fier de participer à ce grand projet de protéger la santé des enfants, du futur. Cette motivation est renouvelée chaque jour en se promenant dans l'hôpital en sachant que de près ou de loin, nos travaux peuvent changer des vies. Merci au centre de recherche de mettre en place des infrastructures qui supportent nos ambitions et de favoriser les échanges entre chercheurs.

L'obtention d'un doctorat est le travail d'une vie. Nombreux sont ceux qui m'ont encouragé, motivé, guidé et inspiré sur ce chemin et je tiens à prendre un moment pour les remercier et immortaliser ces relations qui m'ont permis d'atteindre ce but ambitieux.

Tout commence évidemment par mes parents, **Serge** et **Marie-France**. Non seulement vous m'avez donné la vie, mais vous avez forgé qui je suis. La curiosité, la passion, la patience, la sérénité et la joie de vivre que vous m'avez insufflé expliquent que j'aie pu me rendre aussi loin. Cette réussite, je la partage avant tout avec vous. C'est la réussite d'un parent que de voir son enfant s'épanouir et réussir dans ce qu'il aime. Merci de m'avoir supporté, merci de m'aimer et d'être là, ensembles, pour moi.

Ludvic, mon grand frère. Toujours impressionnant par ta culture, ta détermination, ton irrévérence. Jamais un souper n'est ennuyant quand tu es présent. Depuis toujours, tu as contribué à cet environnement intellectuellement stimulant que représente notre famille. Merci d'avoir attisé en moi la curiosité, l'envie de me dépasser et d'en connaître toujours plus.

Agnès, ma très chère petite sœur. Je t'adore. Les rires qu'on partage n'ont pas d'égal. On se comprend sans effort, ça a toujours été le cas. Je sais qu'un moment avec toi est toujours un moment agréable. Tu m'as appris à écouter, à être attentif d'aussi loin que je me souviens. De tes premiers balbutiements à déchiffrer à tes œuvres magnifiques aujourd'hui qui m'invitent à regarder à la fois à l'intérieur et vers toi pour bien ressentir. Tu m'as appris la sensibilité et l'écoute émotionnelle qui sont précieux pour moi.

Ma famille est une mosaïque de personnages colorés qui s'agencent à merveille et se complètent pour donner un tout harmonieux, vivant et bon. J'ai été choyé par la vie de tomber dans un si beau clan et aujourd'hui plus que jamais j'en suis reconnaissant.

Au-delà de la famille, j'ai aussi eu la chance d'être entouré par des êtres fantastiques toute ma vie et plusieurs méritent mention ici (sans ordre particulier...).

À **Laure**, mon amour, ma précieuse. La distance qui nous a séparés cette dernière année n'a d'égal que les sentiments qui nous unissent. Tu as été ma raison d'avancer et de me dépasser pendant ces mois difficiles. Tu es ma source quotidienne de bonheur et mon rêve le plus cher. Je te dédie cet ouvrage pour tous les moments magiques que tu m'as procurés cette année et pour tous ceux qui nous attendent. Je t'aime.

À mes amis **Étienne, Pedro, Simon, Brice** pour les aventures fantastiques qu'on partage et qui me permettent de m'évader de ma tête quand ça va mal. On a partagé plus qu'une amitié à travers le temps, on a partagé un appart aussi 😊 Merci les Barons!

À mes amis de plus ou moins longue date que je ne vois pas assez souvent, mais avec qui les bons moments sont toujours garantis : **Philippe Tessier, Julien Pouliot, Philippe Turcotte, Sébastien Jacques, Yannick Cyr, Marie-Philippe Tétreault.**

À **Kate**, ma confidente, mon support. Le soutien inconditionnel que tu m'as donné ces dernières années dans les moments les plus difficiles a été d'une valeur inestimable. De notre aventure nordique inoubliable au printemps 2016 aux fins de soirées dans le sofa à pleurer quand ça allait mal, j'ai toujours su que je pouvais compter sur toi. Tu es instrumentale à ma réussite et une amie vraiment précieuse. Merci pour tout.

Los Boyos hermanos et henritosama, quand j'ai besoin d'une vraie aventure, de tout laisser derrière pour aller me retrouver dans le bois. Je sais que je peux compter sur vous pour me remonter le moral en étant simplement en votre présence. **Émile** « le cartographe », **Patrick** « le scribe », **Yahya** « Navy Seal » et **Henri** « Henritosama ». Vous m'avez baptisé « le spécialiste » et c'est le titre que je porte avec la plus grande fierté. Vivement la prochaine aventure!

Un merci très spécial à **Damien** pour tous les chapeaux que tu as portés avec moi : ami, confident, mentor. Au travail comme à l'extérieur, tu as toujours été présent, engagé, attentif, ouvert et surtout drôle! Tu es arrivé au bon moment et quel bonheur que nos chemins se soient croisés. Je sais que cette amitié est faite pour durer peu importe où nous serons. Je t'aime cher ami.

À mes collègues et amis, présents et passés, qui m'ont accompagné dans ce chapitre au laboratoire je dis un grand merci : **Cynthia** pour ta joie de vivre indéfectible, **Marie-Lyn** pour ta présence et ton attention, **Basma** pour ton énergie rassurante, **Oanh** pour ta rigueur et ta fiabilité, **Lina** *because we share*, **Juliette** pour les rires, l'assistance et l'entrain, **Kerstin** pour ta persévérance et ta légèreté et **Pascal** pour ton authenticité. Je n'y serais pas arrivé sans vous.

Un peu plus loin physiquement, mais tout aussi proches dans mon cœur, je dois remercier les membres du labo Haddad : **Chloé, Aurélien, William, Hugo, Delphine** (ou **Daphné**, je sais plus), **Isabelle, Camille, Silvia, Kathie, Joëlle** pour la camaraderie même après le divorce. Je tiens aussi à remercier les autres amis que j'ai rencontrés à Sainte-Justine et qui m'ont marqués et aidés : **Florian Wünnemann, Mathieu Roussy, Sara Bourbonnais, Silvia Neri**

Un grand merci à mes compagnons de volleyball du lundi. Quelques mentions spéciales à **Silvie** pour l'organisation et **Denis** et **Alain** pour la camaraderie. Ce rendez-vous hebdomadaire a été ma bouée de sauvetage à plusieurs moments pendant les presque 7 années où j'y ai participé. Vous m'avez vu grandir et j'ai développé cette passion grâce à vous. Merci du fond du cœur, vous allez me manquer.

À **Sarah** avec qui j'ai partagé ma vie pendant le plus clair de ces années. Merci de m'avoir accompagné et supporté pendant une bonne partie de cette épreuve. Tu as été et tu demeures très importante dans ma vie et je suis ravi du chemin qu'on a parcouru ensemble. Même si tu n'as jamais su expliquer ce que je faisais comme recherche, il y a un peu de toi dans cet accomplissement. Merci Dabou.

À **Kiwi**, même si tu ne liras pas ces lignes. Après plus de 9 ans je m'émerveille toujours de toi. Ma poulette d'amour qui m'enrage, m'attendrit, me fait rire. Ton amour parfois curieux, mais inconditionnel m'est indispensable. Croquette cacahuète.

À ma **Grand-maman Ghislaine**. J'aurais tellement aimé partager ce moment avec toi. À chaque grand moment je pense à toi et ton amour me remplit d'énergie. Je sais que d'où tu es tu es fière de moi et ça compte énormément. Tu ne me quitteras jamais et je veux que tu saches que tu restes près de moi dans les plus grands moments de ma vie, pour toujours.

Je tiens finalement à remercier les femmes en science et dans la société. Ces femmes qui doivent trop souvent se prouver au-delà du raisonnable dans un univers tordu et contrôlé par les hommes. Merci à ces femmes qui prennent leur place sans s'excuser, à ces femmes brillantes qui nous font avancer. Merci à ces figures de l'ombre qui défendent, qui luttent, qui aiment.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le cancer

Selon l'Organisation mondiale de la Santé, le cancer représente la 2^e cause de mortalité dans le monde avec 8,8 millions de décès enregistrés en 2015 [1]. Aujourd'hui plus que jamais, des efforts considérables sont donc déployés internationalement pour la compréhension, la prévention et le traitement de cette pathologie responsable de près d'un décès sur 6 à l'échelle mondiale.

Le terme cancer désigne un ensemble de maladies pouvant atteindre n'importe quelle partie d'un organisme en entraînant une prolifération rapide, anormale et incontrôlable des cellules résidentes au-delà de leurs délimitations naturelles par invasion des tissus avoisinants et/ou par dissémination à des tissus distants via le système circulatoire (métastases) [1, 2].

Pour soutenir cette capacité à proliférer, les cellules cancéreuses partagent plusieurs caractéristiques essentielles [3] qui promeuvent leur croissance (signaux prolifératifs, immortalité, instabilité génomique et mutations, altérations métaboliques), inhibent leur élimination (résistance aux signaux d'arrêt de prolifération, évasion immunitaire, résistance à la mort cellulaire) et modèlent leur microenvironnement (inflammation, invasion et métastase, angiogenèse).

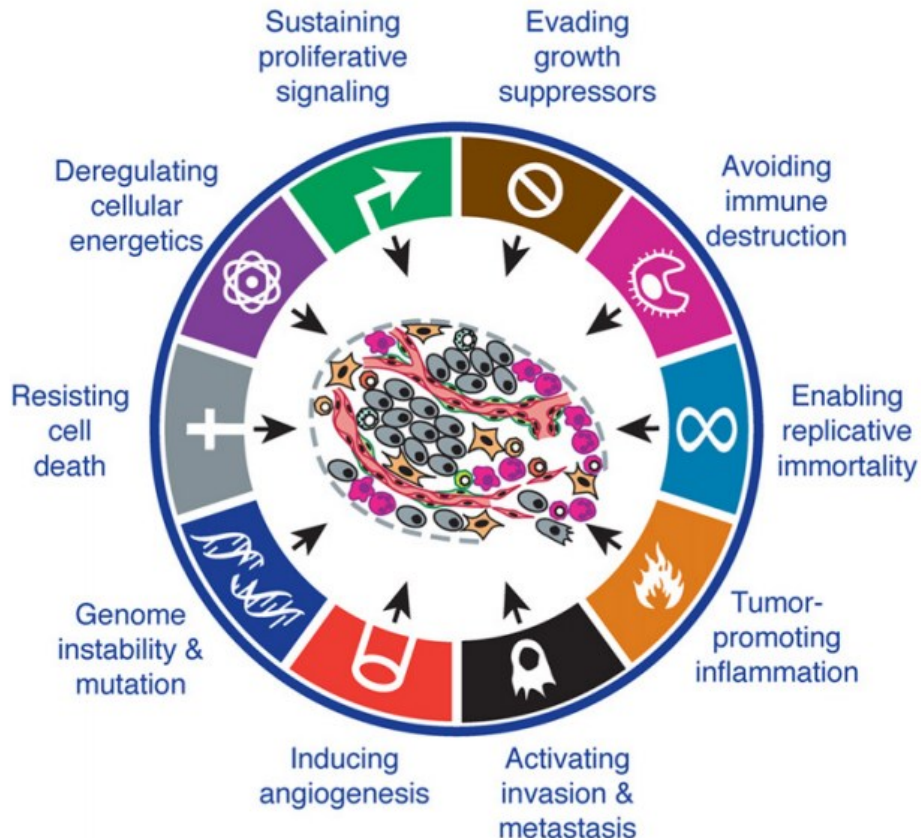


Figure 1.1 Les caractéristiques du cancer.

Plusieurs facteurs permettent l'émergence et le maintien des lésions cancéreuses. Sont indiquées ici les caractéristiques intrinsèques aux cellules cancéreuses ainsi qu'au microenvironnement tumoral. Adapté de Hanahan et Weinberg 2011[3]

Une problématique majeure du cancer est la pluralité de ses manifestations. Bien que plusieurs propriétés et mécanismes soient partagés par tous, chaque cancer est aussi unique que son hôte, par le fond génétique de l'individu, la combinaison de mutations présentes, l'emplacement des lésions, etc. rendant très improbable l'idéal d'une cure universelle et entraînant par le fait même une multiplication des catégories de lésions cancéreuses.

1.1.1 Types de cancers et nomenclature

Tel que mentionné, la pluralité des cancers a donné lieu à une hiérarchisation et une nomenclature fine au fil du temps. Ainsi, on peut caractériser les cancers par type histologique ou par le site d'origine de la tumeur, tous deux codifiés par le *International Classification of*

Disease for Oncology (ICD-O-3). D'un point de vue histologique, on distingue 6 catégories de lésions tumorales : carcinomes, sarcomes, myélomes, leucémies, lymphomes et mixtes [4] (**Tableau 1.1**).

Tableau 1.1: Classification des cancers

Classe histologique	Origine	Sous-types	Caractéristiques
Carcinome	Épithélium	<ul style="list-style-type: none"> • Adénocarcinome (glandes ou tissus) • Carcinome squameux 	80-90% cancers
Sarcome	Tissus conjonctifs (Mésenchyme)	<ul style="list-style-type: none"> • Osseux (os, cartilage, moelle) • Tissus mous (muscles, tissus adipeux, fibreux, etc.) 	Ressemblent généralement au tissu d'origine
Myélome	Plasmocytes		Tumeur liquide
Leucémie	Système hématopoïétique	Multiples selon le type cellulaire touché (myélocytes, lymphocytes, érythrocytes, thrombocytes)	Tumeur liquide
Lymphome	Système lymphatique	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphome hodgkinien • Lymphome non-hodgkinien 	Tumeur immunologique solide
Mixte	Plus d'une composante tumorale		

Les cancers sont souvent aussi classifiés par grade afin de préciser le niveau de différenciation et de ressemblance avec les cellules avoisinantes. Ainsi, les cellules peuvent être considérées comme bien différenciées (grade 1), modérément différenciées (grade 2), faiblement différenciées (grade 3) ou indifférenciées (grade 4). Au diagnostic, le stade du cancer est aussi établi. Il s'agit du niveau de progression de la maladie tenant compte de la taille et du niveau d'invasion dans le tissu et de la dissémination au-delà du tissu d'origine. Le système TNM de classification permet ainsi de qualifier la Tumeur, le Nombre de ganglions lymphatiques (ou Nodes) où des masses tumorales sont retrouvées et la présence de Métastases.

1.1.2 Processus de transformation tumorale

Le processus entraînant la conversion de cellules normales en cellules tumorales implique des événements génétiques favorisant une ou plusieurs des caractéristiques énumérées plus haut (**Figure 1.1**). Il est généralement reconnu qu'il s'agit d'un processus séquentiel et multi-étapes où l'ordre d'apparition des mutations a une incidence sur l'efficacité du processus de transformation [5-7]. En fait, selon les types de cancers, le nombre d'événements génétiques nécessaires semble varier entre 2 et 8 [8, 9]. Ces événements génétiques peuvent être de nature variée : mutations congénitales, mutations somatiques fonctionnelles, modifications épigénétiques, altérations génomiques telles que des translocations chromosomiques, etc. Les événements promouvant l'instabilité génétique des cellules, notamment au niveau de la reconnaissance et la réparation des dommages à l'ADN, tendent donc à favoriser et accélérer le processus de transformation tumorale, ce qui explique que ces gènes soient fréquemment mutés dans l'ensemble des cancers. À titre d'exemple, le gène *TP53* encodant la protéine p53, un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la détection et la résolution de dommages à l'ADN, est directement muté dans plus de la moitié des cancers, en faisant le gène le plus fréquemment affecté [10].

Le processus de transformation nécessite au minimum trois fonctions communes à tous les cancers : inhibition des points de contrôle du cycle cellulaire (gènes suppresseurs de tumeur), l'augmentation des signaux de prolifération (oncogènes) et immortalisation. Grâce à une meilleure compréhension du processus de transformation naturel, nous sommes aujourd'hui en mesure d'induire la transformation tumorale de cellules saines à l'aide d'un nombre minimal de modifications génétiques.

1.1.2.1 Transformation induite

En 1999, William C Hahn et Robert Weinberg ont identifié 3 gènes qui, lorsqu'introduits dans des cellules somatiques, permettent la formation de tumeurs *in vivo* [11, 12]. Cette approche a été démontrée comme suffisante pour transformer de nombreux types cellulaires : cellules rénales embryonnaires, fibroblastes, astrocytes, myoblastes, cellules épithéliales, endothéliales, mésothéliales et bronchiales notamment [11, 13-17]. Cette découverte fut critique

pour la compréhension des mécanismes de tumorigenèse et des voies impliquées dans pratiquement tous types cellulaires.

1.1.2.1.1 SV40ER

Le virus simien 40 (SV40) est un polyomavirus, virus à ADN, reconnu pour former des vacuoles et autres tumeurs chez les mammifères [18, 19]. Du génome de ce virus fut isolée la région précoce (*SV40ER*) encodant 2 protéines principales par épissage alternatif, soit le grand antigène T ou Large T (LgT) et le petit antigène T ou small T (SmT) (**Figure 1.2**). La capacité du virus SV40 à induire naturellement des cancers chez l'humain est débattue depuis plus de 50 ans [20] depuis la campagne de vaccination massive contre la polio avec des vaccins contaminés au SV40 aux États-Unis [21]. Les propriétés des protéines encodées par ce virus ont toutefois été étudiées extensivement depuis leur découverte menant à de nombreuses et importantes découvertes en biologie moléculaire.

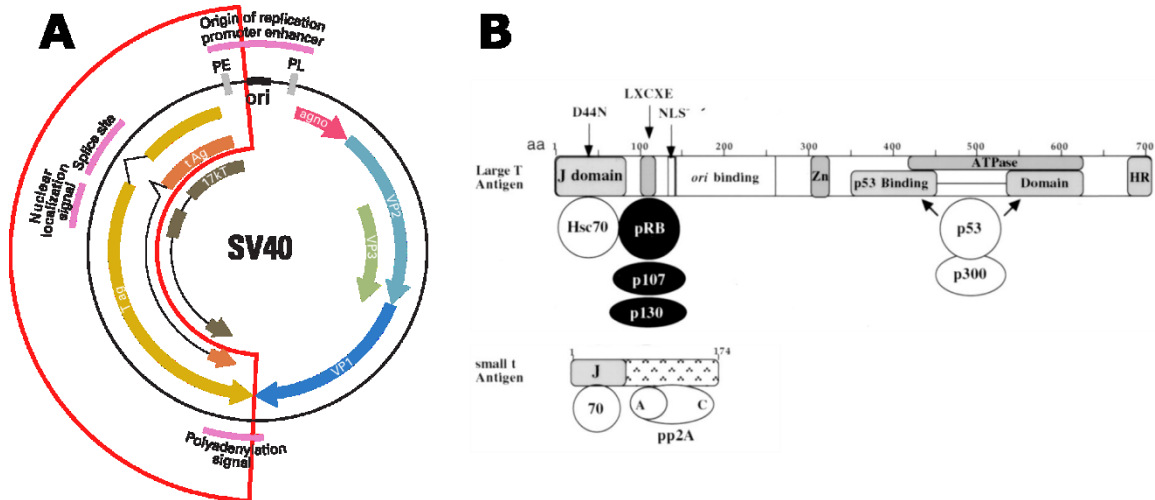


Figure 1.2 Caractéristiques moléculaires de *SV40ER*.

(A) Génome du virus SV40 et son épissage alternatif. Encadré en rouge est la région *SV40ER*. T ag (jaune) : grand antigène T; t Ag (orange) : petit antigène T; PE : promoteur précoce; ori : origine de réplication du génome viral. Adapté de Poulin et al. [20]. (B) Domaines protéiques des gros et petits antigènes T et leurs partenaires de liaison. Adapté de Sullivan et al. [22]

1.1.2.1.1.1 Large T

Le grand antigène T du virus SV40 est une protéine de 708 acides aminés possédant plusieurs domaines fonctionnels ayant été abondamment disséqués depuis la découverte des propriétés néoplasiques du virus chez les mammifères dans les années 1960 [18, 19]. Les principaux domaines ayant été identifiés pour les fonctions de transformation cellulaire sont le domaine J liant la protéine de choc thermique 70 (Hsc70), le motif LXCXE liant les protéines du rétinoblastome (pRB) et le domaine de liaison au suppresseur de tumeur p53 (**Figure 1.2B**). L'inhibition de pRB par LgT entraîne un relâchement des facteurs de transcription de la famille E2F permettant l'entrée en phase S et la progression dans le cycle cellulaire. Cette inhibition nécessite notamment une interaction avec le domaine J de LgT [23] et les fonctions de phosphorylation de Hsc70 [24] afin de relâcher les complexes inhibiteurs de E2F. Par ailleurs, LgT contribue à la transformation cellulaire via p53, un interrupteur moléculaire majeur dans la réponse aux stress cellulaires, qui fut originalement découvert par son interaction avec LgT [25, 26]. La protéine p53 est un facteur de transcription suppresseur de tumeur puisqu'il régule l'expression de gènes associés à l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. LgT inhibe l'action de p53 notamment en occupant son site de liaison à l'ADN [27], mais aussi de façon indirecte [28]. Ainsi, ces interactions permettent d'éviter les points de contrôle majeurs du cycle cellulaire.

1.1.2.1.1.2 Small T

Le petit antigène T de SV40 est un produit d'épissage alternatif du transcrite de LgT menant à la production d'une protéine de 174 acides aminés possédant le même domaine J que LgT et une section C-terminale permettant l'interaction avec la phosphatase protéique 2A (PP2A). PP2A est responsable de la majorité de l'activité phosphatase sérine/thréonine chez les cellules eucaryotes et son interaction est la fonction principale de Smt pour la transformation cellulaire. SmT lie la sous-unité catalytique de PP2A en compétitionnant la sous-unité régulatrice B et altère l'activité phosphatase et la spécificité de substrat [29]. Ces altérations relèvent principalement de l'inhibition de l'activité phosphatase contre de nombreuses cibles, notamment LgT et p53, contribuant ainsi à maintenir les voies de signalisation mitogéniques.

1.1.2.1.2 Ras

La superfamille Ras est un regroupement de plus de 150 petites GTPases chez l'humain. Ces enzymes sont des interrupteurs moléculaires impliqués dans la transduction de signaux et divisés en 5 familles selon leur séquence et leurs similarités fonctionnelles : Ras, Rho, Rab, Ran et Arf [30]. La famille Ras est impliquée dans la prolifération cellulaire et subdivisée en 6 sous-familles (Ras, Ral, Rap, Rheb, Rad et Rit). Les 3 membres de la sous-famille Ras HRas, KRas et NRas – nommés selon l'origine de leur identification, soit Harvey Rat sarcoma, Kirsten Rat sarcoma et neuroblastoma Rat sarcoma respectivement – sont exprimés de façon ubiquitaire dans les cellules et considérés comme oncogènes par leur fonction de promotion de la croissance cellulaire principalement par les voies de signalisation Raf/MEK/MAPK pour la transduction de signaux prolifératifs. Ensemble, ils représentent les oncogènes les plus mutés avec 20 à 30% de tous les cancers humains montrant une mutation activatrice d'une de ces protéines [31]. Les mutations en question se retrouvent sur les codons 12, 13 et 61 et entraînent une activation perpétuelle de la protéine et donc une transduction permanente de signaux prolifératifs.

1.1.2.1.3 hTERT

Découverte originalement en 1985 par Carol W. Greider et Elizabeth Blackburn [32], la télomérase est l'enzyme permettant l'allongement des télomères, ces séquences 5'-TTAGGG répétées protégeant les chromosomes de l'attrition due aux divisions cellulaires. La structure de la télomérase, décrite en 2007 par Scott Cohen et son équipe [33], comprend la sous-unité reverse transcriptase protéique (TERT ou hTERT chez l'humain) [34, 35], la sous-unité d'ARN (TERC) et la dyskerin (DKC1). Bien que normalement exprimée presque exclusivement dans la lignée germinale et très tôt dans le développement [36], environ 85 à 90% des tumeurs montrent une activation de la télomérase [37]. Les lignées n'exprimant pas la télomérase emploient néanmoins des méthodes alternatives d'allongement des télomères basées sur la recombinaison homologue [38]. Toutefois, l'expression de hTERT seule suffit pour réactiver l'activité de la télomérase et ainsi immortaliser les cellules cancéreuses.

1.1.3 Modèles précliniques de cancer

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le cancer et d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies, plusieurs types de modèles sont utilisés en laboratoire. Qu'il s'agisse de modèles de culture cellulaire *in vitro* ou de modèles animaux complexes, l'objectif demeure toujours d'avoir un système contrôlé, robuste et facilement manipulable, mais suffisamment représentatif afin de tirer des conclusions claires pouvant se traduire en avancées cliniques. Or, historiquement, tous les modèles n'ont pas une valeur prédictive équivalente pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique comme l'ont démontré nombre de revues à ce sujet [39-46]. Tout modèle demeure imparfait de nature et doit être utilisé de façon appropriée pour tirer des conclusions valables, surtout pour une condition aussi complexe, multifactorielle et hétérogène que le cancer.

1.1.3.1 Modèles *in vitro*

La lignée HeLa fut la première lignée cellulaire humaine mise en culture en 1951 à partir de cellules issues d'un cancer cervical [47]. On dénombre aujourd'hui des centaines voire des milliers de lignées cellulaires cancéreuses disponibles commercialement, sans compter les lignées primaires isolées directement de patients par des laboratoires partout sur la planète. Aujourd'hui encore, les lignées cellulaires saines ou cancéreuses sont des ressources inestimables pour l'étude de mécanismes biologiques, l'identification de cibles et le criblage thérapeutique. Elles ont notamment été utilisées au sein du programme de développement de thérapeutiques (DTP) de l'Institut National du Cancer (NCI), fondé en 1955. Sous forme d'un panel de 60 à 80 lignées cancéreuses pour l'évaluation préliminaire de composés actifs contre différents types de cancer, cette approche a permis au fil des années d'identifier de nombreux composés anti-cancéreux par une approche empirique [48-50]. Bien que de façon rétrospective l'efficacité de cette approche ait montré une corrélation suffisante avec les données cliniques, la confirmation de ces données avec des modèles plus complexes demeure un passage obligé du développement pharmacologique.

L'utilisation de cultures cellulaires *in vitro* comporte toutefois des problématiques importantes qui limitent leur portée. Dans un premier temps, seule une portion des cancers

observés en clinique peut être cultivée *in vitro*. Cela entraîne par conséquent un biais de sélection pour certaines caractéristiques propices. De même, au sein d'une tumeur, seule une sous-population possédant ces caractéristiques favorables à la croissance bidimensionnelle dans un milieu artificiel sera sélectionnée. Par ailleurs, puisque les lignées obtenues proviennent de tumeurs établies et souvent agressives, elles auront tendance à hériter de ces caractéristiques, notamment d'un phénotype d'évasion immunitaire. Finalement, l'utilisation prolongée de telles lignées mène aussi à une dérive génétique. De nombreux facteurs influencent cette évolution génétique, tels que les conditions de culture, la durée de culture, l'instabilité génétique de la souche et bien sûr une dose de hasard et entraînent des conséquences importantes sur la biologie de ces cellules, notamment leur réponse à des agents thérapeutiques [51, 52].

1.1.3.2 Modèles murins *in vivo*

L'utilisation de modèles animaux permet de valider l'efficacité thérapeutique de composés dans un contexte biologique plus complexe où les principes de pharmacodynamique s'appliquent. Ainsi, la toxicologie, la biodistribution, la pharmacocinétique, les effets secondaires et l'impact du stroma tumoral, par exemple, peuvent être pris en compte pour la validation d'approches thérapeutiques. Or, les modèles murins sont généralement peu prédictifs de la réponse clinique chez l'humain, mais demeurent utiles pour établir les doses à tester lors d'études cliniques I [44]. On remarque toutefois une meilleure efficacité prédictive des modèles de croissance tumorale orthotopique (dans le tissu d'origine de la tumeur) au lieu de tumeurs ectopiques (tumeurs implantées dans un site anormal, par exemple sous-cutanées ou intrapéritonéales) [53-55].

Les modèles murins de croissance tumorale spontanée sont néanmoins très utiles en recherche fondamentale sur les mécanismes d'émergence, d'évolution, de métastase et d'élimination tumorale. Il a été démontré grâce à de telles études que le processus de transformation tumorale est légèrement différent entre humain et souris, ces dernières étant globalement plus permissives à la transformation tumorale [56], mais ces découvertes ont aussi permis de valider le rôle de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur chez

l'humain, de même que les mécanismes sous-jacents. Historiquement, plusieurs types de modèles murins ont été utilisés à ces fins, nous en feront ici un bref survol.

1.1.3.2.1 Tumeurs induites chimiquement

La première description d'une corrélation entre un cancer et l'exposition à un agent chimique est attribuée à Percival Pott en 1775 pour la description de l'incidence d'une forme de cancer du scrotum chez les ramoneurs exposés à la suie de cheminée [57]. Cette découverte a lancé une vague d'études sur les bases chimiques du cancer et la découverte de nombreux carcinogènes (Tableau 1.2)

Tableau 1.2 Exemples de carcinogènes identifiés chez les modèles de rongeurs

Composé	Organe touché	Année et ref
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	Nombreux (peau, poumons, système digestif, etc.)	1932 [58, 59]
Colorants aminoazo (ex. 0-aminoazotoluene, AAT ou 4-diméthylaminoazobenzene DAB)	Foie (parfois rate)	1935 [60-62]
2-fluorenamine	Glandes mammaires, foie, vessie	1941 [63]
Urethane	Poumons	1943 [64]
7,12-diméthylbenz[a]anthracene (DMBA) + 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA)	Peau	1947 [65-67]
Nitrosamines	Foie, système digestif	1956 [68]

La plupart des composés ainsi identifiés se sont avérés posséder la caractéristique commune de pouvoir lier l'ADN, impliquant celui-ci comme joueur important dans le développement du cancer [69, 70]. La découverte de mutations d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs dans des tumeurs humaines et induites chimiquement [71-74] ont par la suite mené à la théorie liant exposition aux carcinogènes, mutations génétiques et cancer.

Certaines de ces approches par carcinogénèse chimique sont toujours utilisées en recherche, comme l'approche DMBA+TAP [67], et présentent divers avantages et inconvénients. Par exemple, ce sont des approches peu coûteuses, rapides et reproductibles dont les mécanismes sont aujourd'hui bien connus. À l'opposé, ils sont toutefois plutôt aléatoires au niveau génétique et ont une cinétique très variable. De plus, le suivi peut être très compliqué selon le modèle et le tissu étudié.

Plus récemment, la combinaison d'approches de carcinogénèse chimique avec des modèles murins modifiés génétiquement (GEMM) a permis l'identification de mécanismes moléculaires de carcinogénèse avec plus de finesse et d'identifier les interactions entre la génétique et l'environnement sur la susceptibilité au cancer et ainsi créer des modèles de cancer plus finement régulés [75]

1.1.3.2.2 Modèles murins génétiquement modifiés (GEMM)

Grâce au développement des approches de manipulation génétique et à l'identification de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes, le nombre et la variété des modèles GEMM a explosé dans les 20 dernières années [75-77]. Afin de disséquer le processus de transformation tumorale, par exemple, différentes stratégies peuvent être utilisées afin d'insérer ou de retirer l'expression de certains gènes et d'en étudier la portée dans un contexte général, tissu-spécifique, cellule-spécifique, temps-spécifique ou à la suite d'un traitement activateur ou inhibiteur [78, 79]. Ainsi, de nombreuses lignées animales possédant des insertions ou délétions conditionnelles d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs ont permis d'identifier le rôle de ces gènes dans le processus de carcinogénèse. Parmi ceux-ci, on peut notamment citer les souris p53 knockout susceptibles à la formation de tumeurs plus agressives [80] ou plus sensibles aux carcinogènes chimiques [81], les souris déficientes en Arf, un gène suppresseur de tumeur régulant p53 aussi susceptibles de développer des tumeurs cutanées, hépatiques et pulmonaires [82-84]. Ce type de modèles étant aussi très bien caractérisé et flexible, on a aussi pu l'employer comme outil de criblage thérapeutique [85, 86] avec un succès toutefois mitigé [44, 87].

Comme tout modèle, les GEMM présentent des lacunes dont il faut tenir compte. Tout d'abord, il s'agit de modèles 100% murins, donc la prédictibilité chez l'homme est imparfaite.

De plus, les souris étant le plus souvent issues de lignées syngéniques, on ne retrouve pas la diversité génétique normalement retrouvée dans une population. Le suivi et la cinétique de la croissance tumorale est aussi plus imprévisible et logistiquement problématique, de même que la mise en place des lignées. Il s'agit toutefois d'excellents modèles pour l'étude des processus biologiques et génétiques du cancer puisqu'ils évoluent en présence d'un microenvironnement normal et d'un système immunitaire (SI) fonctionnel et complètement autologue, c'est-à-dire que les tumeurs sont immunitairement reconnues comme du soi puisqu'issues d'un même individu. Finalement, l'absence de variabilité génétique est ici un atout afin d'étudier l'effet des gènes avec un minimum de bruit de fond.

1.1.3.2.3 Lignées tumorales murines

Historiquement, les modèles de transplantation tumorale chez la souris précèdent les GEMM. On les utilise abondamment depuis les années 1960-70 à la suite de l'amélioration des approches de culture cellulaire permettant la propagation de cellules cancéreuses. L'injection de cellules cancéreuses murines dans un hôte murin s'avérait ainsi une alternative rapide, simple, et reproductible pour étudier l'efficacité de traitements anti-cancéreux et a ainsi été utilisée abondamment par le NCI notamment pour le criblage de composés thérapeutiques. Ainsi, dès 1964, l'utilisation de la lignée leucémique murine L1210 pour le criblage chimiothérapeutique [88] puis la lignée leucémique P388 mènent à l'avancement des thérapies contre les leucémies et lymphomes [89], mais peu de progrès pour le traitement de tumeurs solides. Cette situation a mené le NCI à l'élaboration d'un panel tumoral comportant les lignées murines B16 (mélanome), CD8F (adénocarcinome mammaire), Colon 38 (carcinome du colon) et Lewis lung carcinoma (carcinome pulmonaire) dès 1976 [50]. Une des valeurs importantes de ces modèles est notamment la nature du microenvironnement tumoral (MET). Grâce à des approches syngéniques, où tumeur et hôte partagent le même fond génétique, il est possible d'étudier et de prendre en compte l'impact du stroma, soit la composante non-cancéreuse d'une tumeur (cellules normales, vaisseaux sanguins, cellules immunitaires, etc.) et d'un SI fonctionnel sur la croissance tumorale. Toutefois, les tumeurs étant d'origine murine, les découvertes ne sont pas toujours transposables chez l'humain.

1.1.3.3 Modèles humains *in vivo*

Bien que les modèles murins soient parvenus à améliorer les traitements contre les cancers humains, ils demeurent imparfaits dans leur représentation de la réalité clinique, que ce soit au niveau de la prévalence, de la variété, de la cinétique, de l'histologie ou de la génétique. Il est donc nécessaire d'étudier les cancers humains dans un contexte biologique complexe, soit dans un animal hôte. Plusieurs approches ont été élaborées au fil du temps, mais toutes s'appuient sur l'utilisation d'animaux immunodéficients permettant la croissance de tumeurs xénogéniques (provenant d'une autre espèce) qui seront discutées plus loin (1.2.5.1 Lignées murines immunodéficientes).

1.1.3.3.1 Lignées tumorales *in vivo*

Tout comme pour les lignées tumorales murines, les lignées cellulaires issues de cancers humains sont aussi utilisées *in vivo* depuis la découverte des lignées murines immunodéficientes. Leur avantage principal est la proximité génétique avec les cancers cliniques, du moins dans les souches originales, puisque comme toute lignée cellulaire, on retrouve les mêmes problématiques de biais de sélection et de dérive génétique de la population. La réimplantation de cellules *in vivo* entraîne aussi une étape de sélection supplémentaire pouvant altérer la diversité et la composition génétique de la tumeur [90]. Ces événements de sélection clonale permettent toutefois l'obtention de populations relativement homogènes génétiquement, facilitant l'étude d'altérations génétiques sur des phénomènes complexes nécessitant un support *in vivo* tels que la métastase ou la résistance/susceptibilité thérapeutique. Le support *in vivo* est toutefois imparfait. Puisque le MET est murin et le SI est absent, l'évolution tumorale est altérée et présente par conséquent une histopathologie non-représentative. Au niveau préclinique, le potentiel prédictif de ce type de modèles est par conséquent faible et les approches de xéno greffes dérivées de patients (PDX) sont généralement préférées à cet effet. L'injection orthotopique (dans le tissu d'origine) permet toutefois d'améliorer la qualité du phénotype tumoral par rapport aux injections ectopiques (hors du tissu, généralement sous-cutanées) [44, 53, 91].

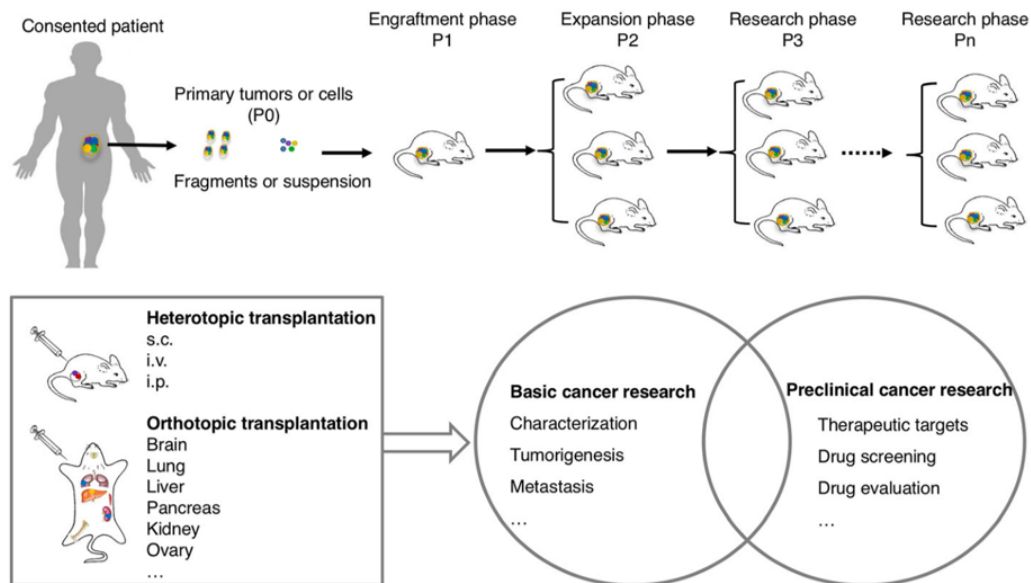


Figure 1.3 Établissement et usages des modèles PDX.

Tiré de Lai *et al.* [92]

1.1.3.3.2 Xénogreffes dérivées de patients (PDX)

Dans un souci d'augmenter la proximité des modèles tumoraux avec les tumeurs cliniques, les approches PDX ont été développées en implantant directement chez des souris immunosupprimées des fragments de tumeurs provenant de patients (

Figure 1.3). On retrouve de nombreuses souches PDX pour de nombreux cancers liquides et solides : leucémie lymphoïde chronique [93], lymphome diffus à grandes cellules B [94], cholangiocarcinome intrahépatique [95], cancer du pancréas [96, 97], cancer colorectal [97, 98], carcinome ovarien séreux [99], etc. La caractérisation de ces modèles permet d'apprécier la proximité histopathologique, structurelle et génétique du cancer et de son microenvironnement avec la tumeur d'origine et ce pendant quelques passages. Bien que la qualité de modélisation des approches PDX pour la biologie tumorale, l'identification de biomarqueurs, le criblage de composés et l'évaluation préclinique de thérapies soit bien démontrée, il demeure que l'utilisation à long terme de ces tumeurs entraîne une dérive de la tumeur et de son microenvironnement au fil du temps. De plus, les tumeurs étant implantées dans des animaux immunodéficients, l'absence d'un SI fonctionnel peut aussi avoir un effet sur la croissance tumorale, le microenvironnement inflammatoire et la réponse thérapeutique. Globalement, on

les considère généralement comme les meilleurs modèles pour l'étude des tumeurs humaines en recherche fondamentale et préclinique, malgré certaines lacunes [92, 100].

Les avantages et inconvénients principaux de chacun des modèles discutés dans cette section sont résumés au **Tableau 1.3**.

Tableau 1.3 Propriétés des modèles en oncologie

Modèle	Avantages	Inconvénients
Lignées tumorales <i>in vitro</i>	Flexible, demande peu d'infrastructures, criblage à grande échelle, très grande variété	Biais de sélection, tumeurs agressives, dérive génétique, pas de microenvironnement, pas de pharmacodynamique.
Carcinogénèse induite	Modèle <i>in vivo</i> , rapide et simple, peu coûteux	100% murin, peu définis génétiquement, variabilité stochastique, suivi potentiellement difficile
GEMM	Génétiquement définis, très flexibles, SI fonctionnel, microenvironnement complet	100% murin, pas de diversité génétique dans la population, rapidité de croissance tumorale, généralement long et complexe à établir
Lignées tumorales murines <i>in vivo</i>	Rapide et facile à contrôler, suivi facilité, SI de l'hôte, flexible, relativement homogène	100% murin, histopathologie peu représentative de l'humain, sélection et évolution <i>in vitro</i> , peu prédictif
Lignées tumorales humaines <i>in vivo</i>	Cellules humaines, rapide et facile à contrôler, suivi facilité, flexible, relativement homogène	Pas de SI fonctionnel, histopathologie peu représentative, sélection et évolution <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>
PDX	Cellules humaines, présence transitoire de stroma humain, pas d'adaptation <i>in vitro</i> , peut être maintenu à long terme, très représentatif de la tumeur originale	Très coûteux, accès et maintien difficiles, représentatif d'une seule tumeur, voire d'une fraction d'une tumeur, absence de SI, stroma humain transitoire

1.1.3.4 Cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont des modèles émergents pour les études en oncologie. Depuis la découverte du processus de reprogrammation de cellules somatiques par Takahashi et Yamanaka en 2006 [101], les applications pour cette technologie se sont multipliées dans la plupart des domaines biomédicaux. Les iPSC générées par cette reprogrammation sont analogues aux cellules souches embryonnaires (pluripotence, auto-renouvellement) mais ont l'avantage de pouvoir être générées directement de patients et soulèvent moins d'enjeux éthiques que ces dernières. Les parallèles entre les processus de reprogrammation somatique en iPSC et de transformation néoplasique ont été étudiés abondamment dans la dernière décennie et les iPSC ont fait leur apparition comme outil en recherche sur le cancer. La reprogrammation de lignées cancéreuses et la différenciation subséquente ont par exemple permis d'étudier les différents stades de progression tumorale et d'élucider des mécanismes associés aux tumeurs pancréatiques précoces, mais perdus au fil de la progression cancéreuse [102]. Or, la rareté des études témoignant d'une reprogrammation fructueuse de cellules cancéreuses primaires suggère la présence de barrières biologiques au processus de reprogrammation [103]. Il a aussi été démontré qu'une reprogrammation incomplète de cellules non pathologiques en iPSC pouvait mener à la formation de tumeurs *in vivo* selon un processus épigénétique réversible [104]. La reprogrammation de cellules somatiques normales issues de patients atteints de cancers familiaux comme le syndrome Li Fraumeni – arborant des mutations de p53 – a permis de modéliser plus fidèlement la tumorigénèse de ces patients que les modèles murins [105]. En résumé, les iPSC sont de puissants outils de modélisation, permettent l'étude de mécanismes génétiques – impact de l'activation, inactivation de gènes associés à la transformation ou au phénotype tumoral – et épigénétiques – processus de dédifférenciation tumorale, modulation épigénétique de l'expression génique, hypométhylation, etc. [106] – associés au cancer et permettent le criblage thérapeutique et génétique à haut débit.

1.1.3.4.1 Processus de reprogrammation

La reprogrammation de cellules somatiques en iPSC nécessite l'expression de gènes de pluripotence de façon transitoire, soit par virus non intégrant (ex. Sendai), par vecteurs

épisomaux ou par ARNm [107]. Les protéines originalement décrits comme étant nécessaires et suffisants pour y parvenir sont les facteurs de transcription Oct4, SRY-box 2 (Sox2), cMyc et Kruppel-like factor 4 (Klf4). Le processus de reprogrammation est toutefois stochastique, très inefficace (0,01-0,1%) et long (3-4 semaines chez l'humain). L'isolement et la caractérisation de clones de reprogrammation est donc nécessaire afin de contrôler la qualité de la reprogrammation.

1.1.3.4.2 Différenciation somatique

La capacité de différenciation de cellules iPSC est fondamentale puisque par définition celles-ci devraient pouvoir générer tous les types cellulaires du corps humain. De nombreux protocoles de différenciation *in vitro* ont été développés pour l'obtention de types cellulaires provenant des trois feuillets germinaux : ectoderme (ex. neurones, astrocytes, kératinocytes), mésoderme (ex. myocytes, cardiomyocytes, adipocytes, cellules endothéliales) et endoderme (ex. hépatocytes, cellules d'îlots β du pancréas, cellules alvéolaires des poumons). Pour valider le niveau de reprogrammation, l'injection *in vivo* d'iPSC non-différenciées devrait mener à la formation de tératomes – des tumeurs provenant de la lignée germinale comprenant différents tissus –comportant des tissus des trois feuillets germinaux mentionnés (ecto-, méso- et endoderme). Deux processus de différenciation utilisés au cours de notre étude seront brièvement présentés ici.

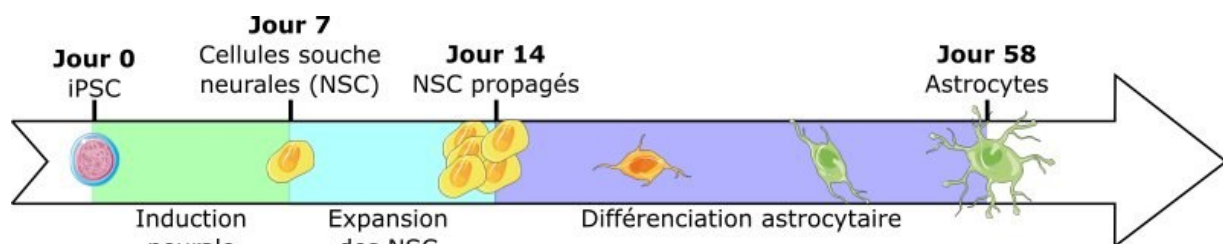


Figure 1.4 Processus de différenciation astrocytaire à partir d'iPSCs. Processus typique de différenciation à l'aide de protocoles commerciaux.

1.1.3.4.2.1 Cellules progénitrices neurales et astrocytes

Différentes approches ont été développées pour la différenciation de cellules iPSC en cellules neurales (neurones et cellules gliales). La première étape du processus consiste à générer des cellules souches neurales (NSC) (**Figure 1.4**). Les NSC sont les cellules les plus précoces du système nerveux central et ont un caractère souche puisqu'elles sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation. Toutefois, contrairement aux iPSC, les NSC sont multipotentes et ne sont en mesure de générer que des cellules neuronales ou gliales. *In vitro*, l'induction neurale peut être faite notamment par l'inhibition de la voie de signalisation du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), de la voie de la protéine morphogénétique de l'os (BMP) impliquée dans la dorsalisation en embryogenèse, et de la voie Wnt/ β -caténine grâce à des petites molécules inhibitrices [108]. Les NSC expriment les marqueurs nestine, SOX2 et PAX6. Une méthode pour la différenciation subséquente en cellules astrocytaires consiste essentiellement à la culture des NSC en présence de faibles concentrations de sérum animal, d'insuline, de transferrine, de progestérone, de putrescine et de sélénium [109]. Les cellules ainsi différenciées devraient exprimer la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), un filament intermédiaire caractéristique des astrocytes [110]. Ce type de différenciation a été utilisé notamment pour des études de développement, de fonction et de pathogénèse de maladies neurodégénératives [111-114].

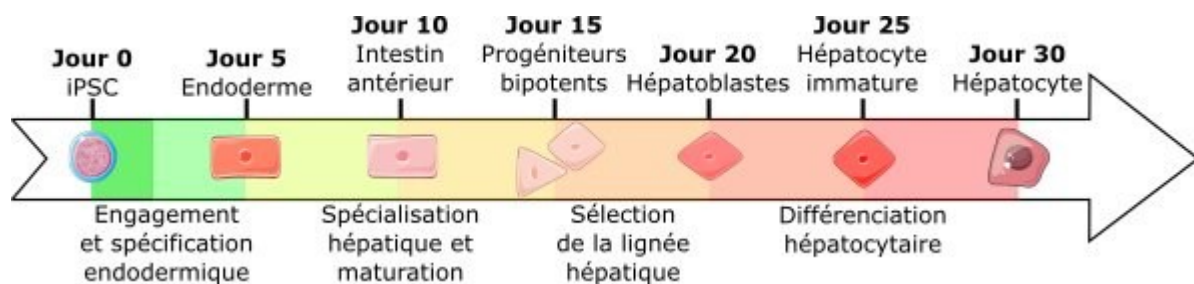


Figure 1.5 Processus de différenciation hépatocytaire à partir d'iPSC
Continuum d'intermédiaires dans la différenciation d'iPSC en hépatocytes.

1.1.3.4.2.2 Hépatocytes

La différenciation en cellules hépatiques (**Figure 1.5**), quant à elle, relève du feuillet endodermique et débute ainsi par l'engagement des cellules iPSC dans cette lignée grâce au

supplément B27 (un mélange défini de 20 suppléments moléculaires et protéiques riche en antioxydants utilisé principalement pour le maintien de cultures neuronales *in vitro* [115]), à l'activine A (un membre de la famille TGF- β [116]) et à l'activation transitoire de la voie Wnt (par l'inhibition de GSK3). Le processus de différenciation hépatique génère des progéniteurs bipotents pouvant générer les lignées hépatocytaires – cellules du foie – et cholangiocytaires – cellules épithéliales des conduits biliaires. Les premiers étant d'un plus grand intérêt, la différenciation en hépatocytes est favorisée à l'aide de l'oncostatine M [117]. Finalement, la maturation des hépatoblastes en hépatocytes se produit en présence notamment de dexaméthasone [118] et ceux-ci sont caractérisés par l'expression de marqueurs comme l'albumine et l'alpha-fetoprotéine (AFP) [118] et l'absence de marqueurs cholangiocytaires comme les cytokératines 7 et 19. Ce type d'approche a été employé pour différentes études de fonction, de toxicité de composés ou d'infections par des pathogènes [119-121]

1.1.4 Microenvironnement tumoral (MET)

Le microenvironnement, ou stroma, tumoral définit tout le tissu normal entourant et supportant la croissance tumorale, soit les cellules stromales fibroblastiques, la matrice extracellulaire (ECM), les vaisseaux sanguins, les cellules immunitaires et les macromolécules solubles. Ces éléments sont des composantes importantes de la masse cancéreuse qui contribuent de façons multiples au développement tumoral, bien que la composition et l'abondance relative soit très variable entre tumeurs. Diverses composantes cellulaires du MET sont instrumentales à la plupart des propriétés communes à tous les cancers (**Figure 1.6**) [122]. L'étude du MET est relativement récente, mais le large éventail de types cellulaires et de molécules impliquées a généré une grande quantité de données sur le sujet. Nous n'aborderons donc ici que quelques aspects de façon superficielle à des fins de concision. Tout d'abord, il est reconnu que le microenvironnement joue un rôle déterminant dans l'initiation tumorale. Il a été démontré qu'un environnement inflammé est propice à l'émergence tumorale [123]. L'émergence accrue de carcinomes hépatocellulaires chez les patients cirrhotiques [124] ou de cancers colorectaux chez des patients atteints de syndrome du côlon irritable ou de colite ulcéreuse [125] en sont de bons exemples. En effet, l'inflammation chronique entraîne un recrutement, une accumulation, une activation, une dérégulation et une incapacité à résoudre

l'inflammation qui promeut l'émergence tumorale [126]. Inversement, une déficience immunitaire, soit par immunosuppression pharmacologique [127] ou chez des patients atteints du SIDA [128], mène aussi à une augmentation de l'incidence de cancer. Ces deux situations démontrent l'implication du SI dans l'émergence tumorale.

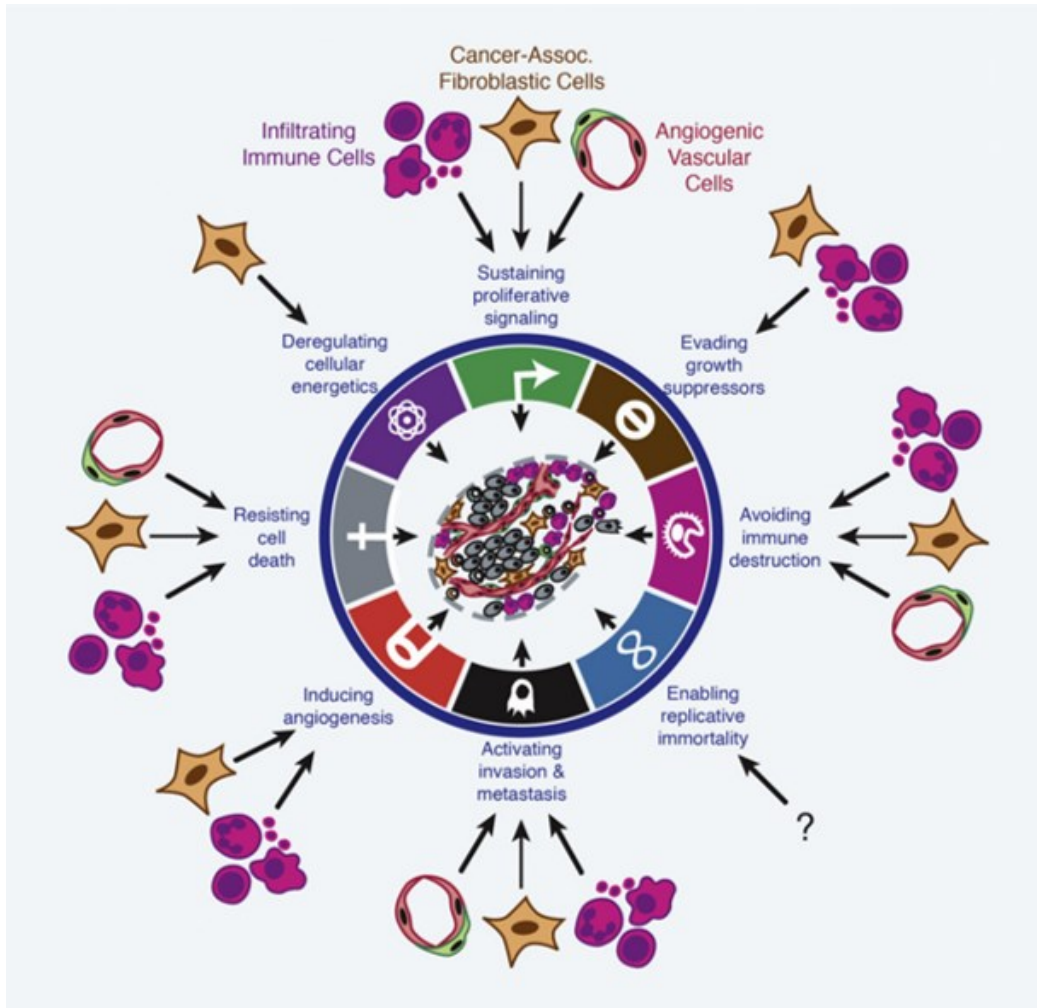


Figure 1.6 Implications du microenvironnement résident et activé dans le phénotype cancéreux.

Tiré de Hanahan & Coussens [122]

Les cellules stromales et tumorales communiquent de façon réciproque afin de favoriser le maintien et l'évolution tumorale. Par exemple, les fibroblastes normaux et les macrophages résidents sont généralement considérés comme participants à un microenvironnement suppresseur de croissance [129]. Or, lors de l'émergence tumorale, ces cellules sont détournées

par les cellules tumorales pour générer des fibroblastes associés au cancer (CAF) et des macrophages associés aux tumeurs (TAM), tous deux ayant des propriétés pro-tumorales importantes. Les CAFs sont une sous-population distincte de fibroblastes et surabondante dans les tumeurs qui favorisent la croissance tumorale et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), nécessaire à l'invasion et la métastase, par la modulation de l'ECM et par la sécrétion de facteurs solubles [130-133]. Les TAMs, quant à eux, sont reconnus pour promouvoir la progression et la métastase tumorale en favorisant l'angiogenèse, la migration et l'invasion tissulaire et en inhibant notamment la réponse immunitaire anti-tumorale et sont recrutés à la tumeur en réponse au milieu hypoxique et par la sécrétion de chimiokines comme l'endothéline-2 et le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) [134, 135]. Ceux-ci seront détaillés plus loin (1.2.2.3.2 Macrophages).

Les propriétés physiques de l'ECM sont aussi importantes à la biologie tumorale. En effet, on voit une augmentation des dépôts et une réticulation accrue de l'ECM au sein des tumeurs produisant une matrice très dense qui favorise la progression et la malignité tumorale, probablement par une augmentation de la signalisation par les intégrines [136]. De plus, la densité et la directionnalité des fibres d'ECM favorisent la migration et l'invasion tumorale suite à une EMT [137]. L'Hypoxie est par ailleurs un facteur stimulant fortement l'EMT. Puisque le MET est fortement hypoxique dû à une densité cellulaire élevée, une vascularisation sous-optimale et un métabolisme accéléré, on assiste à une promotion de l'EMT notamment via la voie de signalisation Notch [138] et une augmentation de l'expression de Snail-1, favorisant ainsi la migration cellulaire [139].

1.2 Immuno-oncologie

Depuis plusieurs années maintenant, on connaît et étudie l'implication du SI à toutes les étapes du processus tumoral, de l'initiation à l'élimination en passant par la croissance et la dissémination. En 1986, Flier *et al.* publient un article décrivant les tumeurs comme des « plaies qui ne guérissent jamais » où les tumeurs parviennent à détourner la machinerie de réponse aux blessures pour alimenter le stroma qui les supporte [140]. Parfois inhibitrice, parfois promotrice, la réponse immunitaire anticancéreuse est revenue à l'avant-plan depuis quelques décennies dans le but ultime d'offrir aux patients des thérapies personnalisées, ciblées et avec très peu d'effets secondaires. Pour y arriver, de nombreux groupes se sont penchés sur l'immunologie des cancers et différentes stratégies de modulation. Dans la prochaine section, nous aborderons certaines de ces découvertes fondamentales et cliniques ainsi que les modèles couramment utilisés en immuno-oncologie.

1.2.1 Théorie de l'immunoédition tumorale

Décrite pour la première fois en 2002 par Dunn et al. [141], la théorie de l'immunoédition tumorale est aujourd'hui la pierre angulaire de l'immuno-oncologie. Cette théorie unifiée de l'impact du SI sur la prévention, l'émergence et la croissance tumorale s'appuie sur la théorie de l'immunosurveillance telle qu'émise par Sir Macfarlane Burnet et Lewis Thomas à la fin des années 1950 [142-144]. Selon cette théorie, le processus de transformation cellulaire mène à l'expression de néo-antigènes tumoraux qui sont reconnus par le SI de l'hôte et entraînent l'élimination ou l'inactivation des cellules mutantes pré-tumorales émergeant continuellement. Les cellules immunitaires ont ainsi la fonction de sentinelles pour la préservation de l'homéostasie tissulaire [144].

Après un abandon de la théorie dans les années 1970 à la suite de nombreuses expériences peu conclusives [145-147], la découverte de nouveaux modèles murins au tournant des années 2000 confirma les tenants de la théorie de Burnet et Lewis et permit d'en identifier les joueurs clés, du moins chez la souris. Des études épidémiologiques de prévalence de cancers chez des patients immunosupprimés [148-151] ainsi que l'accumulation de démonstrations de

corrélations entre taux de survie et infiltration tumorale chez des patients [152-154] tendent à confirmer la théorie d'immunosurveillance chez l'humain.

Or, la capacité des tumeurs à émerger malgré un SI fonctionnel démontre une faille dans cette reconnaissance. Plusieurs expériences ont démontré que le statut immunitaire de l'hôte affectait l'immunogénicité tumorale. Ainsi, des tumeurs émergent dans des animaux immunocompétents sont tolérées par d'autres animaux immunocompétents, ce qui n'est pas le cas de tumeurs provenant d'animaux immunodéficients [155-157]. Cela laisse supposer que le statut immunitaire forge le phénotype immunogène des tumeurs et donc que la tumeur s'adapte pour proliférer.

Le principe d'immunoédition prend en compte ces deux facettes des interactions tumeurs – SI : immunosurveillance et sculpture de l'immunogénicité tumorale par le SI. On obtient ainsi un modèle en 3 étapes, les 3 « E » de l'immunoédition : Élimination, équilibre et évasion [141, 158] (**Figure 1.7**).

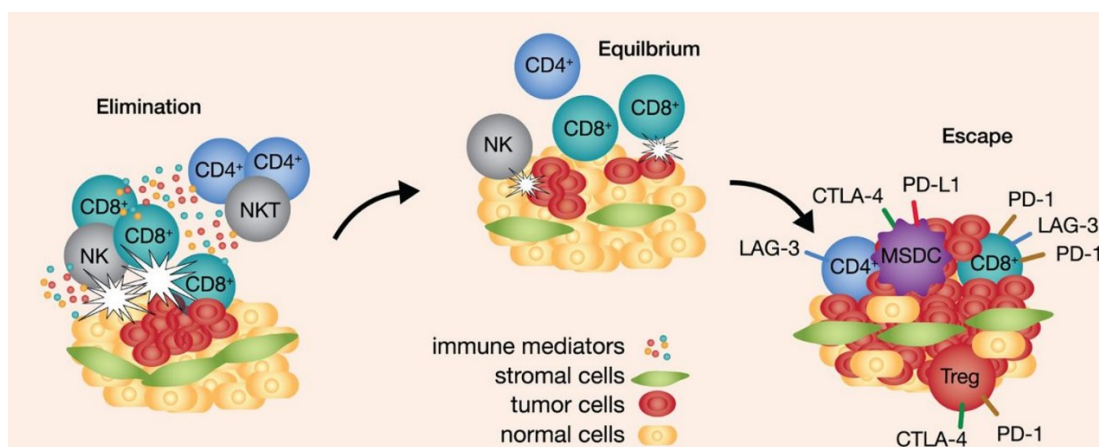


Figure 1.7 les 3 étapes de l'immunoédition.

Schématisation de certains acteurs importants des processus d'élimination, d'équilibre et d'évasion de la tumeur par le SI au site tumoral. Adapté de Harshman *et al.* [159]

1.2.1.1 Élimination

La phase d'élimination correspond essentiellement au processus d'immunosurveillance mentionné plus tôt. Elle décrit la capacité du SI à identifier et éliminer les lésions cancéreuses de façon précoce par une vigilance du SI inné menant à une activation de la réponse adaptative

contre la tumeur. Brièvement, la réponse est déclenchée lorsque l'homéostasie du tissu est affectée par la prolifération anormale de cellules transformées. Tout d'abord, la production très précoce de signaux pro-angiogéniques, notamment le facteur de croissance de fibroblastes basique (bFGF) et le facteur de croissance vasculaire épithélial (VEGF), mène à une prolifération des vaisseaux sanguins à proximité des ilots tumoraux [160]. Par la suite, une réponse inflammatoire induite par l'invasion tissulaire des cellules tumorales recrute les effecteurs du SI inné : cellules tueuses naturelles (NK), tueurs naturels T (NKT), lymphocytes T de type $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ T), macrophages (MØ) et cellules dendritiques (DC) [161]. La reconnaissance de marqueurs anormaux sur les cellules tumorales – soit induits par un processus de transformation ou en réponse au microenvironnement inflammatoire – entraîne la sécrétion d'interféron gamma ($IFN\gamma$) par ces effecteurs [162]. En plus d'une certaine inhibition de croissance cellulaire directe par l' $IFN\gamma$ [163], elle entraîne aussi une mort cellulaire indirecte en induisant l'expression de chimiokines angiostatiques par la tumeur et/ou le stroma, diminuant l'apport sanguin [164, 165]. Les DC présents captent par la suite les débris cellulaires relargués par les cellules mortes afin d'en faire la présentation dans les ganglions lymphatiques drainant. Ceci a pour effet l'activation d'une réponse cellulaire adaptative médiée par les lymphocytes T $CD4^+$ de type T_H1 exprimant de l' $IFN\gamma$ et de lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques (CTL) réactifs aux antigènes tumoraux [166]. Parallèlement, au site tumoral, l'inflammation favorise le recrutement d'un nombre accru de cellules NK et MØ. La transactivation mutuelle de ces cellules par la production d' $IFN\gamma$ et d'interleukine-12 (IL-12) et l'activité cytotoxique de ces effecteurs accentuent la mort des cellules tumorales en attendant la réponse adaptative au site principal.

Dans la majorité des cas de lésions pré-tumorales, cette réponse initiale est suffisante pour éliminer les foyers émergents sans signe clinique apparent. Le processus d'immunoédition est ainsi limité à la phase d'élimination tumorale. Il arrive cependant que la réponse immunitaire initiale soit insuffisante pour mener à l'élimination complète des cellules tumorales. Cela entraîne une phase d'équilibre.

1.2.1.2 Équilibre

Dans l'éventualité d'une élimination incomplète des cellules tumorales lors de la réponse immunitaire initiale, un équilibre dynamique peut s'installer entre les cellules tumorales subsistantes et le SI. Il s'agit de la phase d'équilibre ou de persistance cancéreuse. Au cours de celle-ci, le SI exerce une pression sélective sur les cellules tumorales qui parviennent néanmoins à maintenir une population stable et évolutive. La phase d'équilibre peut s'étendre sur de nombreuses années et on y assiste à un processus de sélection Darwinienne où les cellules évoluent afin de survivre à la pression sélective de leur environnement. Ainsi, grâce à leur grande capacité mutationnelle, certaines cellules tumorales peuvent parvenir à acquérir, au fil du temps, des mutations leur permettant de mieux survivre à la pression immunitaire. Il s'agit d'une phase dynamique de modelage tumoral où la plupart des variants originaux sont éliminés au profit de générations mieux adaptées, forgées par la pression du SI [141, 158]. Le processus d'équilibre peut persister jusqu'à la mort de l'hôte ou prendre fin soit par l'élimination tumorale à la suite d'une recrudescence de la réponse immunitaire ou une émergence tumorale à la suite d'un épuisement de la réponse immunitaire ou de l'acquisition de phénotypes moins immunogènes par les cellules tumorales.

Une manifestation clinique évocatrice de ce phénomène est l'émergence de tumeurs chez des patients transplantés. Plusieurs exemples de ce phénomène se retrouvent dans la littérature [167, 168]. On y décrit l'émergence de tumeurs dans les organes transplantés de donneurs en longue rémission ou sans historique de cancer. Cela suggère la présence de foyers maintenus sous contrôle par le SI du donneur jusqu'à l'implantation dans le patient receveur ; l'immunosuppression pharmacologique qui s'ensuit permettant l'évasion tumorale.

1.2.1.3 Évasion

Il a été démontré que tant le compartiment inné qu'adaptatif sont impliqués dans la réponse anti-tumorale. L'acquisition d'un phénotype d'immuno-évasion par les cellules tumorales implique par conséquent une résistance à la détection et l'élimination par ces deux branches du SI. Il est donc suggéré que le processus d'évolution tumorale au cours de la phase d'équilibre implique l'acquisition successive de plusieurs caractéristiques favorables jusqu'à

l'atteinte d'un point critique où une sous-population de cellules cancéreuses parvient à évader la surveillance immunitaire entièrement. Plusieurs mécanismes moléculaires ont été identifiés pour permettre aux cellules tumorales d'évader le SI qui peuvent être catégorisés en trois volets : passer inaperçues, se défendre et instaurer un microenvironnement immunosuppresseif (**Figure 1.8**).

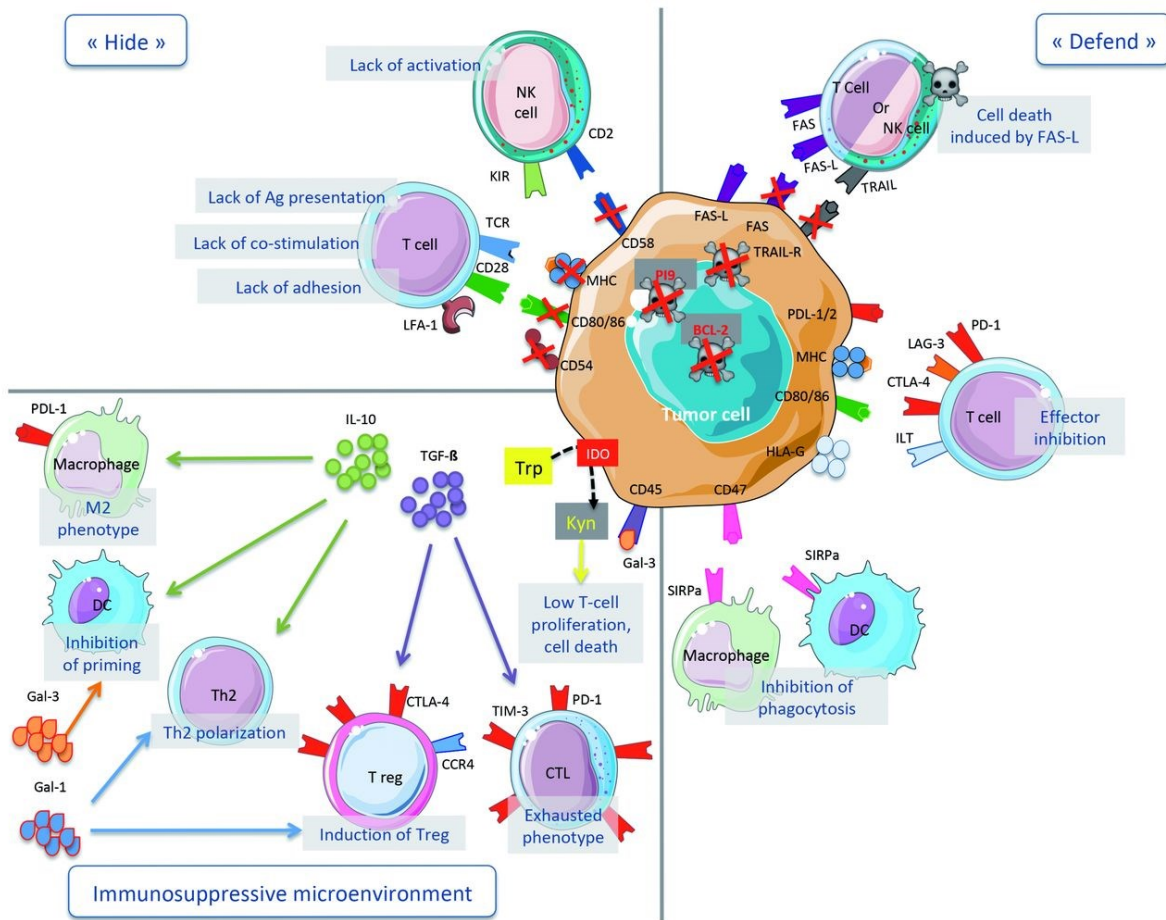


Figure 1.8 Évasion immunitaire par les cellules cancéreuses.

Les mécanismes d'évasion employés par les cellules tumorales peuvent être divisés en 3 volets : passer inaperçues (« *Hide* »), se défendre (« *Defend* ») et instaurer un microenvironnement immunosuppresseif. Tiré de de Charrette *et al.* [169]

Tableau 1.4 Mécanismes d'évasion immunitaire

Stratégie	Mécanisme	Effet	ref
Passer inaperçus	↓ présentation d'immunogènes	Pas de présentation d'antigènes tumoraux aux cellules T	[170]
	↓ MHC/HLA	Diminution de la présentation antigénique globale aux cellules T	[171]
	↓ CD80/86	Diminution du signal de costimulation des cellules T	[172]
	↓ CD54	Diminution de l'adhésion des cellules T	[172]
	Sécrétion de ligands à NKG2D	Diminution de l'activation des cellules NK	[173]
Se défendre	↓ Signalisation à l'IFN γ	Perte de sensibilité à l'IFN γ	[174]
	↓ Fas / TRAIL-R	Résistance à l'apoptose induite par les voies Fas et TRAIL des CTL/NK	[170]
	↑ FasL	Induction de l'apoptose des cellules CTL/NK	[175]
	↑ CD47	Inhibition de phagocytose par M \emptyset et DC	[176]
	↑ Ligand de mort programmée 1 (PD-L1)	Signal de co-inhibition de la réponse T	[177]
Microenvironnement immunosuppresseif	↑ TGF- β	Recrutement et activation des Treg, épuisement des CTL	[170, 178]
	↑ IL-10	Polarisation des M \emptyset et T $_H$ en sous-types immunosuppresseifs	[179]
	↑ indoleamine 2,3-dioxygénase 1 (IDO1)	Attrition et mort des cellules T par conversion du tryptophane en kynurénines	[180]
	Recrutement et activation de cellules immunosuppresseives	Amplification du phénotype immunosuppresseif par le recrutement de cellules inhibitrices	[181, 182]

Cette liste non-exhaustive donne un aperçu de l'éventail de stratégies communes à de nombreux cancers pour diminuer leur immunogénicité et former des lésions malignes incontrôlables par le SI.

1.2.2 Cellules et molécules impliquées dans la réponse tumorale

Tel que mentionné précédemment, de nombreux acteurs sont impliqués dans la réponse immunitaire au cancer. Dans cette section, nous nous attarderons aux rôles des principales cellules et cytokines impliquées aux différentes étapes du processus tumoral et leur dérégulation.

1.2.2.1 Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont parmi les effecteurs principaux de la réponse anti-tumorale et sont impliqués à toutes les étapes du processus d'immunoédition. On distingue de nombreuses populations de cellules T ayant des propriétés et des rôles distincts, parfois contradictoires et quelquefois incompris dans la réponse tumorale.

1.2.2.1.1 $\gamma\delta$ T

Les lymphocytes $\gamma\delta$ T sont à l'interface entre la réponse immunitaire innée et adaptative. En effet, ils peuvent initier une réponse immunitaire via leur récepteur de cellule T (TCR) de type $\gamma\delta$ ou leur récepteur de cellule NK (NKR) comme le récepteur NKG2D [183]. On distingue plusieurs sous-populations de $\gamma\delta$ T qui sont catégorisées, chez l'humain, par l'usage du gène V de la sous-unité δ du TCR associé à une distribution tissulaire et un profil sécrétoire distincts, les plus fréquents étant la combinaison V γ 9V δ 2 (circulants) et V δ 1 (principalement dans l'épithélium, le derme, la rate et le foie) [184]. Tel qu'abordé plus tôt, les $\gamma\delta$ T sont impliqués dans la réponse précoce à l'inflammation associée aux tumeurs et exercent une activité anti-tumorale directe et indirecte : cytotoxicité via les voies perforine/granzyme et *tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) et la sécrétion d'IFN γ (**Figure 1.9**). La cytotoxicité de ces cellules est induite par l'activation du TCR ou d'un NKR comme NKG2D. l'impact de l'IFN γ sur la croissance tumorale est discuté plus loin dans cette section.

Paradoxalement, les $\gamma\delta$ T ont aussi une activité pro-tumorale chez l'humain comme chez la souris [185, 186]. Cette activité pro-tumorale est associée à une sous-population de $\gamma\delta$ T sécrétant de l'IL-17. Ces cellules sécrétant aussi de l'IL-8, du facteur de nécrose tumorale (TNF) et du facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages (GM-CSF), favorisent le

recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) immunosuppressives et ainsi le microenvironnement inflammatoire pro-tumoral. D'ailleurs, le taux d'infiltration de $\gamma\delta$ T produisant l'IL-17 corrèle avec le stade clinique des cancers colorectaux, suggérant l'implication de ces cellules dans la promotion tumorale [186].

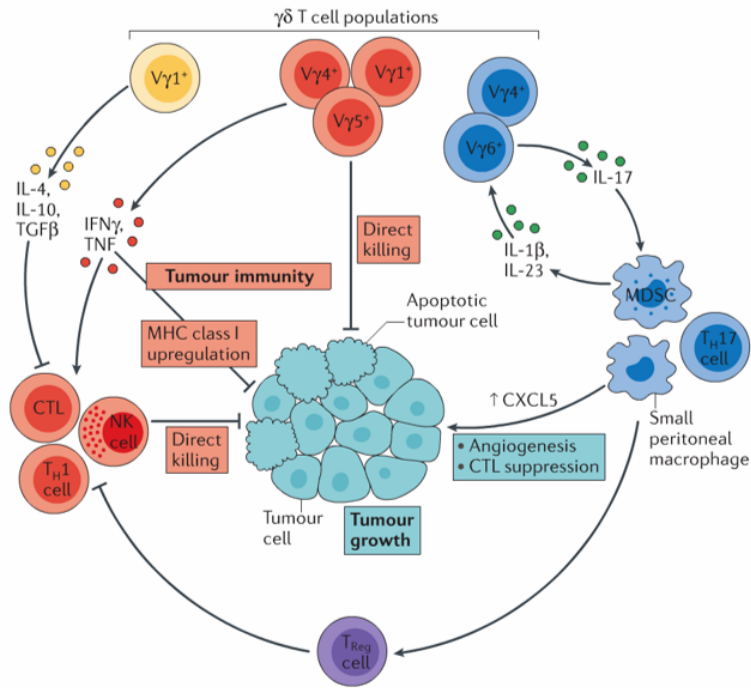


Figure 1.9 Impact des cellules $\gamma\delta$ T murines sur la croissance tumorale.

Influences directes et indirectes des différentes sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ murins. Chez l'humain, les mécanismes d'action sont analogues, seules les sous-populations $\gamma\delta$ T les exerçant varient. On retrouve principalement les populations $V\gamma 9V\delta 2$ et $V\delta 1$, toutes deux ayant démontré une activité pro- et anti-tumorale selon ces mécanismes. Tiré de Silva-Santos, B. *et al* [184]

1.2.2.1.2 Lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont définis par l'expression de la glycoprotéine CD8 qui s'associe au TCR pour lier les MHC de type I, que l'on retrouve à la surface de toutes les cellules. Le MHC I permet la présentation de peptides immunogènes, ou épitopes, intracellulaires. Aucune réponse immunitaire n'est normalement induite contre les complexes MHC I-épitope normaux grâce au processus de sélection thymique. Les CTL ont donc la fonction de réagir contre des épitopes anormaux, soit à la suite d'une infection virale ou de

mutations fonctionnelles comme dans les cellules cancéreuses. Les CTL constituent donc un des effecteurs principaux de la réponse anti-tumorale. Les CTL peuvent être activés localement au site tumoral par la liaison directe avec un MHC I sur la cellule tumorale ou dans le ganglion lymphatique drainant à la suite de la présentation de ces épitopes par une cellule dendritique. L'activation de ces cellules mène à l'induction du potentiel cytotoxique, principalement via la sécrétion de perforines et de granzymes induisant l'activation de caspases dans les cellules cibles pour entraîner leur apoptose. La voie *Fas/Fas* ligand (*FasL*) est aussi probablement employée pour induire l'apoptose, bien qu'il ait été démontré que plusieurs cancers détournent cette voie de signalisation à leur avantage [187]. En effet, l'activation de *Fas* sur les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose peut activer une voie de signalisation alternative pour favoriser la croissance cellulaire

Or, étant des effecteurs importants de la réponse anti-tumorale, plusieurs mécanismes d'immuno-évasion concernent les CTL, tel que présenté à la **Figure 1.8**. Notons la diminution de la présentation antigénique par MHC I, soit par diminution partielle ou complète de l'expression du MHC I ou une altération du protéasome responsable de la préparation des épitopes à présenter sur les MHC [170, 188, 189]. Une diminution de molécules d'adhésion comme CD54 ou de costimulation comme CD80/86 contribue aussi à cacher la tumeur des CTL [169]. D'autres mécanismes de défense sont aussi employés par la tumeur : l'induction d'apoptose des CTL par la signalisation *Fas/FasL* suite à l'activation d'expression de *FasL* par certaines cellules cancéreuses [175] ou l'expression de ligands co-inhibiteurs comme PD-L1. Finalement, le microenvironnement tumoral diminue la prolifération et induit l'anergie des cellules T par l'action de l'IDO1 et favorise l'acquisition d'un phénotype de dysfonction ou d'épuisement des CTL caractérisé par l'expression des récepteurs inhibiteurs PD-1, du gène activateur des lymphocytes-3 (LAG3) et du *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing-3* (TIM-3) [190].

1.2.2.1.3 T auxiliaires

Contrairement aux CTL, les lymphocytes T auxiliaires (ou T helpers, T_H) possèdent un TCR qui, associé à la glycoprotéine CD4, reconnaît le MHC de classe II. Celui-ci est

habituellement exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) professionnelles (DC, MØ, Lymphocytes B). Les MHC II servant principalement à la présentation d'antigènes exogènes, un rôle principal des cellules T_H est la stimulation de la réponse humorale, soit la production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B. Les cellules cancéreuses n'expriment généralement pas de MHC II, à l'exception de certains cancers liquides issus de compartiments APC et de quelques cancers solides où une activation de l'expression du MHC II a été observée, notamment dans le mélanome [191]. L'activation des T_H nécessite donc l'absorption d'antigènes tumoraux par les APCs résidents lors de la phase préliminaire d'élimination, la migration aux ganglions lymphatiques et la présentation croisée d'antigènes endogènes sur le MHC II.

Dans la réponse anti-tumorale, les T_H n'ont pas de rôle effecteur direct. Ils permettent plutôt d'orchestrer la réponse immunitaire par le support de la prolifération des DC [192] et des CTL, notamment par la sécrétion d'IL-2 nécessaire à l'expansion clonale, la fonctionnalité cytotoxique et l'établissement d'une population T CD8⁺ mémoire [193-196]. Au site tumoral, la présence de T_H spécifiques à la tumeur a été démontrée comme favorisant le recrutement, l'expansion, la différenciation et l'activité des CTL [197-199]. Globalement, la présence de T_H infiltrants tumeur-spécifiques corrèle avec l'abondance et l'efficacité de CTL tumeur-spécifiques et un pronostic favorable. Une activité cytotoxique de T_H tumeur-spécifiques à travers l'action de l'IFN γ et du TNF α a aussi été décrite.

Finalement, tout comme les CTL, les T_H peuvent être affectés par les processus d'immuno-évasion tumorale. La diminution d'expression du MHC II, des récepteurs de costimulation et d'adhésion, l'induction de mort cellulaire par la voie Fas/FasL, l'expression de récepteurs co-inhibiteurs de la réponse T et les facteurs solubles diminuant la capacité proliférative et fonctionnelle accompagnant un phénotype de dysfonction immunitaire sont tous des mécanismes qui peuvent aussi affecter le T_H (**Figure 1.8**).

1.2.2.1.4 Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les Treg constituent une sous-classe de lymphocytes T CD4⁺ spécialisés dans la régulation de la réponse immunitaire, c'est-à-dire possédant des fortes propriétés immunosuppressives. Ils sont caractérisés par l'expression de CD4, de la chaîne α du récepteur

à l'IL-2 (CD25) et du facteur de transcription forkhead box P3 (FOXP3) inversement corrélé avec l'expression du récepteur à l'IL-7 (CD127) [200, 201]. FOXP3 est suffisant et nécessaire pour l'activité immunosuppressive des Treg. Initialement absents du MET, ils s'y accumulent progressivement. D'un côté les Treg circulants sont recrutés via leur récepteur de chimiokine CCR4 en réponse à la production tumorale du ligand CCL22 [202]. Alternativement, la présence de TGF- β et d'IDO1 peut induire la différenciation de cellules T_H en Treg [203], contribuant d'autant plus au microenvironnement immunosuppresseur. Les Treg constituant normalement 5-10% des cellules CD4⁺ circulantes, elles peuvent ainsi atteindre jusqu'à 20-30% dans la tumeur, avec un impact apparemment dose-dépendant [203].

Les Treg exercent leur fonction immunosuppressive de plusieurs façons (**Figure 1.10**). L'inhibition directe des DC via le récepteur CTLA-4 sur le Treg entraîne sur la DC une diminution d'expression des récepteurs de co-stimulation CD80/86, diminuant la capacité d'activation de cellules T naïves et induit la production d'IDO1 par les DC, entraînant plus d'inhibition et d'apoptose des cellules effectrices. Les Treg peuvent aussi sécréter des perforines et granzymes B contre les DC et T effecteurs menant à leur apoptose. La sécrétion directe et indirecte (via les DC dysfonctionnels) de cytokines immunosuppressives (IL-10, IL-35), la déplétion de l'IL-2 par séquestration sur le récepteur d'IL-2 à haute affinité (hIL-2R) et la dégradation de l'ATP extracellulaire via la diphosphohydrolase de nucléoside triphosphate (CD39) et l'ecto-5'-nucleotidase (CD73) contribuent aussi à diminuer la prolifération et les fonctions des cellules effectrices et à promouvoir l'activité inhibitrice de MDSCs et de Treg [203, 204].

La quantité et l'abondance relative par rapport aux CTL des Treg est un marqueur pronostic important en immuno-oncologie et sera discuté plus loin (1.2.4 Biomarqueurs cliniques en immuno-oncologie).

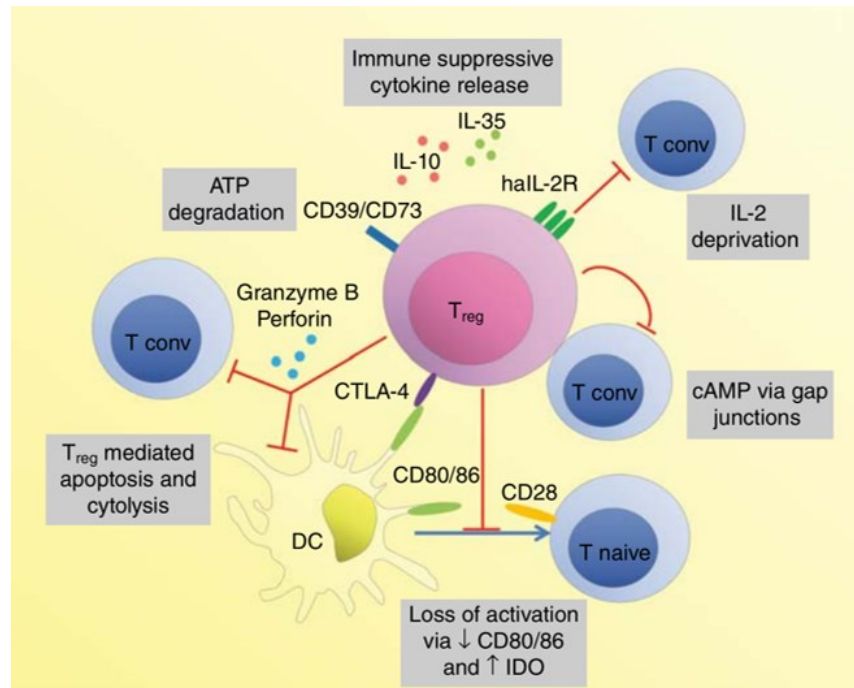


Figure 1.10 Mécanismes d'immunosuppression par les Treg.
Tiré de Oleinika *et al.* [203]

1.2.2.2 Cellules NK

Outre les différentes variétés de lymphocytes T impliquées dans la réponse au cancer, soit dans un rôle effecteur ou modulateur, on retrouve plusieurs autres acteurs cellulaires importants provenant du SI inné. Le SI inné permet une réponse immunitaire rapide contre des motifs moléculaires anormaux. Les effecteurs principaux de cette réponse en immuno-oncologie sont les cellules NK possédant des propriétés cytotoxiques directes – via la sécrétion de perforines/granzymes B, par contact direct avec Fas/FasL ou avec TRAIL et son récepteur (TRAILR) – et indirectes via la sécrétion d'IFN γ . Les cellules NK ne représentant qu'un faible pourcentage de l'infiltrat tumoral [205], on suspecte une implication principalement dans la réponse précoce, avant l'établissement de la réponse adaptative. Ainsi, la reconnaissance rapide de cellules anormales par les NK serait un mécanisme important de la phase d'élimination cancéreuse. L'activation des NK a lieu lors d'un débalancement des signaux activateurs versus inhibiteurs. L'expression du MHC I sur la cellule cible est un signal inhibiteur important grâce au récepteur *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR). Ainsi, la perte complète d'expression du MHC I par des cellules tumorales peut mener à leur reconnaissance et leur lyse

par les NK. À l’opposé, le récepteur activateur NKG2D reconnaît des ligands normalement peu présents à la surface de cellules normales, mais surexprimés à la suite de la transformation cancéreuse, rendant les cellules susceptibles à l’élimination par les NK [162, 206]. Un mécanisme d’évasion tumoral commun est d’ailleurs la perte d’expression de ces ligands à NKG2D [173, 207].

1.2.2.3 Cellules présentatrices d’antigènes

Les cellules présentatrices d’antigène (APC) servent de pont entre la réponse innée et adaptative. Elles permettent d’établir et de moduler la réponse immunitaire adaptative essentielle à la réponse anti-tumorale. Or, comme la plupart des compartiments immunitaires impliqués, les APC sont aussi manipulés et dérégulés dans le cancer.

1.2.2.3.1 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) sont essentielles à l’établissement de la réponse adaptative. Bien qu’elles ne démontrent pas la plus grande capacité à phagocyter cellules et débris, elles sont spécialisées dans la présentation antigénique et l’activation des cellules T [208]. Plusieurs sous-populations associées aux tumeurs ont été identifiées : cDC1, cDC2, migratoires ou non, etc. Alors que les cDC1 sont préférentiellement spécialisées dans l’activation des CTL CD8⁺ par la présentation antigénique sur le MHC I, les cDC2 représentent une population hétérogène avec un enrichissement de l’expression MHC II et ainsi une activation préférentielle des T_H CD4⁺[209]. Le rôle principal des cDC dans la réponse anti-tumorale est la captation des antigènes tumoraux, la migration aux ganglions lymphatiques et la présentation antigénique aux cellules effectrices grâce à leur grande capacité d’activation : abondance de MHC et de molécules de costimulation CD80/86 et production importante d’IL-12, nécessaire à l’activation et la prolifération lymphocytaire [210]. Or, seule une faible fraction des cDC migre vers les ganglions lymphatiques. Le rôle exact des cDC résidents dans la tumeur est méconnu, mais il est suggéré qu’ils agissent sur la régulation de la réponse locale pour maintenir une fonction cytotoxique aux CTL et contrebalancer le microenvironnement immunosuppresseur [211]. Ils sont aussi importants à l’établissement de structures lymphoïdes

tertiaires, soit des amas de cellules B, T et DC formant des structures folliculaires analogues aux ganglions lymphatiques directement au site d'inflammation chronique, soit la tumeur. Ces structures sont associées à un pronostic favorable dans de nombreux cancers en aidant au maintien d'une réponse à long terme au site tumoral, notamment contre des néoantigènes tumoraux émergeant plus tardivement [212, 213].

Au sein de la tumeur toutefois, le microenvironnement immunosuppresseur est aussi soupçonné d'agir sur les DC. Le VEGF, les prostaglandines E₂ (PGE₂) et l'IL-10 retrouvés dans le MET ont démontré la capacité d'inhiber les DC *in vitro* [211]. De plus, le VEGF, l'IL-6, l'IL-10 et le stimulateur de colonies 1 (CSF-1) favorisent la différenciation de monocytes en cellules suppressives plutôt qu'en DC [214]. Finalement, des facteurs physiques comme l'hypoxie et l'acide lactique présents dans le MET sont aussi des inhibiteurs d'activation des DC *in vitro* [215].

1.2.2.3.2 Macrophages

Classiquement, les macrophages (MØ) sont classifiés en M1 et M2, respectivement pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, anti-tumoraux et pro-tumoraux. On découvre aujourd'hui qu'il s'agit plutôt des extrêmes d'un spectre riche et fluide de sous-populations de MØ permettant de répondre finement aux conditions environnantes [216]. Ces cellules sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la réponse aux infections, la guérison de blessures et l'homéostasie, mais jouent aussi un rôle déterminant dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, certaines maladies auto-immunes et le cancer [217]. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) possèdent généralement un phénotype similaire aux M2 pro-tumoraux et ont été identifiés depuis plusieurs années comme des collaborateurs du processus de tumorigenèse. Le phénotype TAM est acquis suite à la différenciation – induite notamment par l'IL-4, IL-10 et IL-13 généralement abondantes dans le MET [218] – de MØ inflammatoires recrutés par différentes chimiokines présentes dans le MET – CXCL12 et angiopoïétine-2 induits par l'hypoxie, CCL2, facteur stimulateur de colonies de macrophages (M-CSF), CSF-1, IL-6, VEGF, TGF-β, PGE₂ etc. [219-222].

Au niveau fonctionnel, les TAMs produisent un grand nombre de facteurs solubles qui promeuvent la progression tumorale par différents mécanismes : immunosuppression, angiogenèse, migration et invasion tumorale, EMT, diapédèse, préparation des niches pré-métastatiques et maintien des cellules souches cancéreuses (**Figure 1.11**) [216].

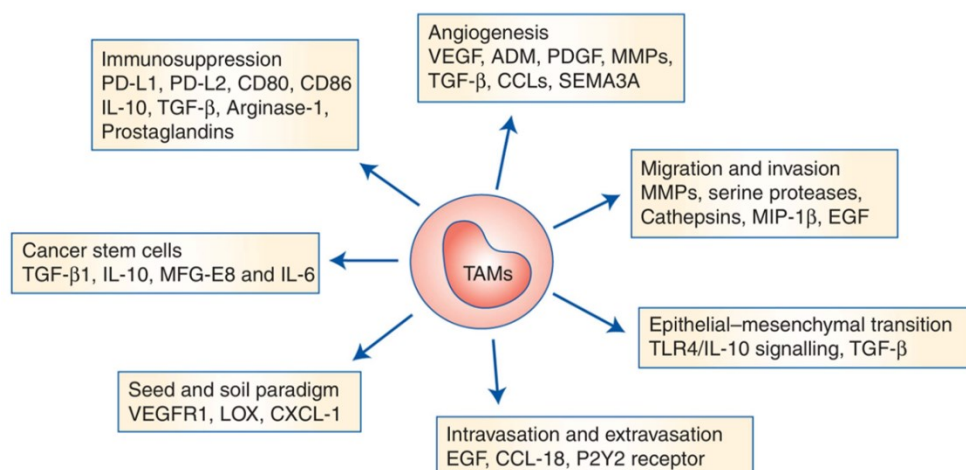


Figure 1.11 Fonctions pro-tumorales des TAMs.

Identification des fonctions de promotion tumorale des TAM des molécules effectrices associées. Tiré de Aras et Zaidi [216]

Ces cellules sont donc recrutées par et contribuent au MET et favorisent l'invasion et la dissémination tumorale. Il n'est donc pas étonnant que leur présence soit fortement corrélée à un mauvais pronostic dans de nombreux types de cancer [223-227].

1.2.2.4 Autres cellules myéloïdes

Outre les DC et les M \emptyset abordés précédemment, le compartiment myéloïde est le plus abondant du SI et est impliqué principalement dans la réponse immunitaire innée et l'inflammation précoce. Il est reconnu depuis plusieurs années que le MET altère la réponse de cellules myéloïdes différenciées comme les granulocytes et entraîne une différenciation anormale de précurseurs hématopoïétiques en cellules myéloïdes suppressives (MDSC). De façon similaire aux M \emptyset , des études ont démontré une polarisation TGF- β -dépendante de cellules neutrophiles d'un phénotype anti-tumoral « N1 » vers un phénotype pro-tumoral « N2 » au sein

du MET [228]. Toutefois, un des impacts les plus importants du cancer sur le compartiment myéloïde est une dérégulation du processus de différenciation. Alors que les cellules myéloïdes immatures sont normalement confinées à la moëlle osseuse, le « macroenvironnement » inflammatoire généré par le cancer provoque une mobilisation de cellules non différenciées en périphérie et une altération des voies normales de différenciation pour former le compartiment MDSC [222]. Le recrutement et la maturation des MDSC au site tumoral peuvent être médiés par la sécrétion de nombreuses molécules solubles par les cellules tumorales et stromales – ex. GM-CSF, M-CSF, VEGF, PGE2, IL-1 β , IL-6, CCL2 [229-232] – et par la sécrétion de cytokines par des cellules T activées – ex. IFN γ , IL-4, IL-10, IL-13 [233]. Les MDSC polymorphonucléaires (PMN-MDSC) et mononucléaires (M-MDSC) ont été identifiés comme ayant tous deux un fort phénotype immunosuppresseur non spécifique. Bien que les PMN-MDSC et les M-MDSC soient morphologiquement similaires aux neutrophiles et M ϕ respectivement [234], ils sont toutefois phénotypiquement et fonctionnellement distincts. Or, une relation progénitrice relie ces cellules puisque la culture *ex vivo* de PMN-MDSC génère une population fonctionnellement neutrophilique [234], de même que la culture de M-MDSC produit des M ϕ et DC matures *in vitro* en absence de facteurs tumoraux [235].

Tel que décrit par Gabrilovich *et al.* [222], les MDSC emploient différents mécanismes d'immunosuppression pouvant être regroupés en 4 catégories. Premièrement, une déplétion nutritionnelle des lymphocytes T notamment par la déplétion et la séquestration de L-arginine par l'arginase 1 (ARG1) et de L-cystéine extracellulaires inhibent la fonction et la prolifération de cellules activées [236, 237]. Ensuite, la production d'un stress oxydatif par les MDSC, notamment via la production de radicaux libres d'oxygène et d'azote avec l'enzyme iNOS, entraîne plusieurs dysfonctions chez les cellules T [238, 239]. Aussi, les MDSC affectent le recrutement et la viabilité des cellules T de façon directe – ex. activation de TIM3 par la galectine 9 induisant l'apoptose des cellules T [240] – ou indirecte – ex. dégradation de CCL2 favorisant le recrutement de CTL [241]. Finalement, les MDSC contribuent au recrutement et à la conversion locale de Treg, principalement via la sécrétion de facteurs solubles (IL-10, TGF β).

Les MDSC favorisent aussi la croissance tumorale indépendamment de leurs propriétés immunosuppressives. Dans des GEMM de tumorigenèse spontanée, un recrutement précoce des MDSC produisant de l'IL-6 et IL-11 active la voie STAT3 chez les cellules tumorales et stimule

la progression tumorale en favorisant l'expression de gènes anti-apoptotiques et pro-prolifératifs [242].

Finalement, l'ubiquité de leur présence dans tous types de cancers, leur abondance, leur importante contribution au MET immunosuppresseur et leur capacité à différencier en cellules anti-tumorales font des MDSC des cibles thérapeutiques importantes.

1.2.2.5 Molécules importantes en immuno-oncologie

Tel qu'observé jusqu'à présent, la plupart des cellules impliquées dans la réponse immunitaire contre le cancer ou l'inhibition de celle-ci exercent leur fonction en partie par la sécrétion de facteurs solubles. Nous décrivons ici brièvement les principales molécules vues précédemment qui représentent des cibles thérapeutiques importantes en immuno-oncologie.

1.2.2.5.1 Interféron gamma

Originellement reconnu pour favoriser la réponse antivirale, on reconnaît depuis les années 1990 l'importance de l'interféron gamma (IFN γ) endogène dans l'élimination tumorale [243]. On en connaît aujourd'hui mieux le rôle d'orchestration et de stimulation de la réponse antitumorale. Il est produit principalement par les lymphocytes T, les NK et les NKT lorsqu'activés, notamment au cours de la phase d'élimination tumorale précoce. Toutes les cellules nucléées expriment le récepteur à l'IFN γ (IFNGR1/2) et sont donc sensibles à son action de sensibilisation à la réponse immunitaire [244]. L'activation de IFNGR1/2 module l'expression de centaines de gènes via la liaison de STAT1 phosphorylé aux sites activés par IFN γ (GAS) dans le génome [245]. Cette activation entraîne une augmentation d'expression des MHC I et II, des ligands à NKG2D, des molécules de costimulation, de cytokines pro-inflammatoires, une inhibition de l'angiogenèse et de la différenciation des Treg, une activation et différenciation des CTL, une différenciation des T_H en T_H1 anti-tumoraux, une différenciation des TAM vers un phénotype M1 et l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la nécroptose des cellules tumorales et stromales endothéliales résultant en une ischémie tumorale [246, 247].

Or, la présence d'IFN γ dans le MET entraîne aussi une réponse immunosuppressive [248]. L'IFN γ peut notamment induire l'expression du ligand co-inhibiteur PD-L1 à la surface des APC périphériques ainsi que de cellules tumorales ou stromales, protégeant les cellules tumorales [249, 250]. Une induction de sécrétion d'IDO1 immunosuppresseur a aussi été observée à la suite d'une exposition à l'IFN γ [251]. L'IFN γ stimule aussi la maturation et l'activité de MDSC et de TAM immunosuppresseurs [233]. Finalement, l'IFN γ exerce une pression sélective importante sur les cellules tumorales et la perte de sensibilité à l'IFN γ par différents mécanismes est fréquemment observée dans divers cancers [252].

Ce double rôle anti- et pro-tumoral de l'IFN γ ainsi que son utilité en-dehors de la réponse anti-cancéreuse rend périlleuse la modulation thérapeutique de cette molécule clé de l'immunoédition tumorale.

1.2.2.5.2 Cytokines immunosuppressives

Plusieurs cytokines immunosuppressives ont été mentionnées au fil de ce chapitre. Nous aborderons ici brièvement les fonctions de quelques-unes d'entre elles plus en détail.

L'interleukine 10 (IL-10) est une cytokine pléiotropique principalement immunosuppressive sécrétée par les cellules cancéreuses, les Treg et plusieurs autres types cellulaires hématopoïétiques ou non [202]. Les fonctions de l'IL-10 sont nombreuses et controversées [253]. On l'associe principalement à une diminution de présentation antigénique des DC via une diminution de MHC II, des molécules de costimulation CD80/86 et de cytokines nécessaires à la réponse T_H (IL-2, IL-12, TNF α) [254]. Les DC exhibent aussi une absorption supérieure d'antigènes et une migration déficiente en présence d'IL-10 [255, 256]. L'IL-10 est aussi impliqué dans le recrutement et la maturation des Treg et diminue la sécrétion d'IFN γ par les NK tout en stimulant leur propriétés cytotoxiques [257, 258]. Le rôle exact de l'IL-10 est donc complexe, mais une association entre des concentrations élevées d'IL-10 dans le sérum de patients et un mauvais pronostic a été relevée dans plusieurs cancers [202].

Finalement, le facteur de croissance transformant β (TGF- β) est sécrété en grande quantité par de nombreuses cellules tumorales [259]. Sa sécrétion est stimulée par l'IL-10, dont il stimule aussi la production selon une boucle de rétroaction positive [253] et il stimule aussi la production

de nombreuses autres cytokines immunosuppressives. Le TGF- β est un antagoniste de la production d'IFN γ et de la fonction des lymphocytes T, il inhibe la production d'IL-2 et IL-12 par les APCs [260] et promeut le recrutement et la différenciation des Treg, TAM et MDSC, à leur tour capables de sécréter du TGF- β [222]. Le TGF- β est donc considéré comme une des cytokines principales dans l'établissement d'un MET immunosuppressif [202].

1.2.3 Approches thérapeutiques en immuno-oncologie

L'étude des différents acteurs du SI dans la biologie tumorale a permis l'émergence dans la dernière décennie de différentes approches thérapeutiques afin de moduler la réponse immunitaire intrinsèque. Qu'il s'agisse de potentialiser une réponse existante, d'éliminer les facteurs inhibant la réponse ou d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale *de novo*, le domaine de l'immuno-oncologie regorge aujourd'hui de solutions innovantes à la problématique du cancer.

1.2.3.1 Anticorps thérapeutiques

L'utilisation d'anticorps monoclonaux (mAbs) purifiés spécifiques à des cibles associées au cancer permet de favoriser une réponse très spécifique au site d'intérêt. Certains anticorps dits « nus » permettent une reconnaissance et une élimination des cellules cibles par un processus d'opsonisation, soit l'enrobage de la cible par des anticorps, et de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). Ce mécanisme décrit l'activation de cellules effectrices cytotoxiques par la présence d'anticorps sur la cible menant à la lyse de celle-ci grâce à des récepteurs activateurs des régions Fc des anticorps. Cette réponse cellulaire n'implique donc pas de cellules T effectrices spécifiques à la cible. Par exemple, trastuzumab (Herceptin[®]) est dirigé contre HER2 exprimé par certains cancers du sein et de l'estomac, bloque l'action de la protéine et favorise l'ADCC par les cellules NK et les macrophages. D'autres mAbs sont utilisés pour l'administration ciblée de composés cytotoxiques conjugués à l'anticorps. Des anticorps radiotraceurs comme Ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]), dirigé contre CD20, sont

couplés à des éléments radioactifs permettant l'administration très localisée de radiothérapie. D'autres anticorps sont couplés à des agents chimiothérapeutiques puissants et permettent une administration très spécifique de composés autrement trop toxiques pour être administrés systémiquement (ex. le composé *MMAE* de l'anticorps thérapeutique Brentuximab vedotin) [261]. Des anticorps bispécifiques monoclonaux ou synthétiques sont aussi utilisés pour favoriser le recrutement et l'activation de cellules effectrices, notamment les CTL, aux sites tumoraux grâce à une double spécificité : un segment liant la cellule effectrice et un second liant la cellule cible grâce à un épitope tumoral spécifique. La présence d'un fragment Fc sur l'anticorps monoclonal peut aussi mener à une réaction ADCC. Des exemples de cette approche sont le Catumaxomab, un anticorps monoclonal dirigé contre EpCAM pour le traitement d'ascites malins lors de cancers métastatiques [262] et les *Bi-specific T-cell engager* (BiTEs) synthétiques dépourvus de fragment Fc comme le Blinatumomab dirigé contre CD19 utilisé dans les lymphomes non-Hodgkiniens ou les leucémies lymphoblastiques aiguës de type B [263].

1.2.3.2 Inhibiteurs de point de contrôle

Parmi les meilleurs exemples d'approches immunothérapeutiques contre le cancer on retrouve les inhibiteurs de point de contrôle des cellules T : anti-CTLA-4 (Ipilimumab, tremelimumab), anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, cemiplimab) et anti-PD-L1 (Durvalumab, atezolizumab, avelumab). Ces traitements emploient des anticorps bloquant leurs récepteurs respectifs afin d'empêcher leur activation sur les cellules T. En inhibant les récepteurs co-inhibiteurs de la réponse T, les CTL sont ainsi réactivés contre leurs cibles respectives. Les anti-CTLA-4 agissent principalement en éliminant les Treg et en favorisant l'initiation de la réponse immunitaire via les T_H. Ces effets étant peu spécifiques au MET, les anti-CTLA-4 ont potentiellement des effets secondaires importants, notamment en favorisant des réactions auto-immunes [264]. De leur côté, les thérapies anti-PD-1/PD-L1 potentialisent la réaction cytotoxique des CTL contre leur cible et empêchent l'inhibition de cette réponse par le récepteur co-inhibiteur PD-1 à la surface des CTL. Or, encore une fois, puisque l'axe PD-1/PD-L1 est impliqué dans d'autres processus de répression immunitaire que la réponse anti-tumorale, des effets secondaires importants peuvent être observés chez certains patients, mais ceux-ci sont généralement moins fréquents qu'avec un traitement anti-CTLA-4 [264, 265]. Finalement, ces

traitements étant rarement complètement efficaces en eux-mêmes leur combinaison entre eux ou avec d'autres thérapies – immunitaires ou non – est souvent synergique et représente une approche importante en immunothérapie du cancer [264, 266, 267].

1.2.3.3 Récepteurs d'antigènes chimériques (CAR)

Élaborés pour la première fois en 1989 par Gross *et al.* [268] les récepteurs d'antigènes chimériques (CAR) sont composés d'un domaine de liaison extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine d'activation intracellulaire. Le domaine extracellulaire est composé d'un fragment variable en simple chaîne (scFv) d'un anticorps spécifique à un antigène d'intérêt. Le domaine intracellulaire inspiré du TCR permet la transduction du signal d'activation et est la section ayant le plus évolué dans les 30 dernières années suivant la première génération pour former les CAR de 2^e, 3^e et maintenant 4^e génération [269]. Le domaine de signalisation intracellulaire CD3 ζ est commun à toutes les générations. Ces dernières se distinguent par l'ajout de domaines coactivateurs au fil du temps : CD28 ou 4-1BB pour la 2^e génération, une combinaison de 2 domaines coactivateurs (ex. CD28-41BB ou CD28-OX40) pour la 3^e génération et un domaine coactivateur et l'activation de transgènes inductibles – pour la sécrétion de cytokines ou de signaux co-stimulateurs – pour la 4^e génération. En introduisant le transgène pour cette protéine chimérique dans des cellules effectrices (CTL ou NK), il est possible de diriger une réponse immunitaire ciblée contre un antigène tumoral à l'aide du scFv spécifique indépendamment de sa présentation sur le MHC. L'identification d'antigènes tumoraux spécifiques demeure l'étape limitante de l'utilisation de CAR du fait de leur rareté et de la plasticité tumorale. Des approches de combinaison de CAR permettent toutefois d'augmenter la spécificité de la réponse en requérant la présence de 2 signaux complémentaires ou en inhibant la réponse en présence d'un signal indésirable [270]. Parmi les effets secondaires ayant été observés pour ce type d'approche, on dénote entre autres des syndromes de relargage de cytokines dus à l'hyperprolifération et à l'activité des cellules infusées et des syndromes de lyse tumorale lorsque le taux de mort cellulaire est trop important. En juin 2019, on dénombrait 290 essais cliniques en recrutement, en cours ou complétés sur <https://clinicaltrials.gov> pour un vaste éventail de cancers liquides et solides.

1.2.3.4 Vaccination thérapeutique

Finalement, une autre approche de potentialisation de la réponse immunitaire anti-tumorale est la vaccination thérapeutique. Cette approche vise à favoriser ou à induire l'activation d'une réponse immunitaire adaptative spécifique aux antigènes tumoraux. Plusieurs méthodologies de vaccination sont étudiées à cette fin (**Figure 1.12**).

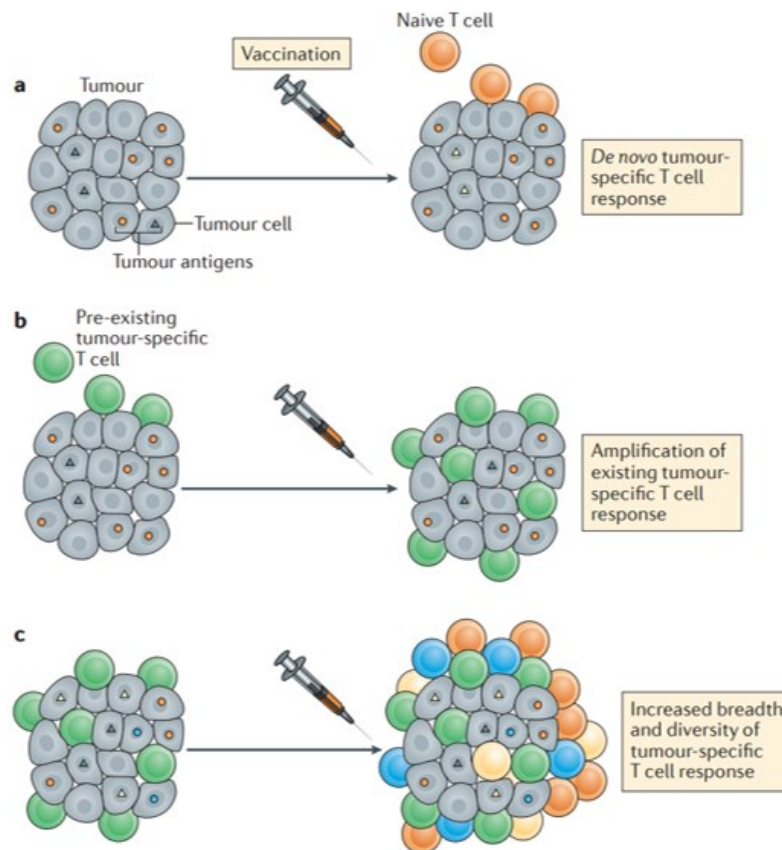


Figure 1.12 Différentes méthodologies de vaccination thérapeutique contre le cancer

Tiré de Hu *et al.* [271]

Toutes les approches manipulent l'axe antigène tumoral / présentation par les DC / activation des lymphocytes T effecteurs et mémoire afin d'obtenir une réponse spécifique, puissante et durable. Le produit de vaccination peut ainsi varier grandement d'un protocole à l'autre : virus oncolytiques (pour une vaccination *in situ*), antigènes tumoraux purifiés, DC chargées d'antigènes tumoraux, cellules T antigène-spécifiques préactivées *in vitro*.

L'utilisation d'adjuvants pour augmenter l'efficacité de la vaccination est aussi fréquente. Comme pour les CAR, l'identification d'antigènes tumoraux demeure l'étape limitante du processus de vaccination. L'approche personnalisée du processus augmente aussi la logistique et les coûts liés à de telles thérapies. On ne compte qu'un seul vaccin thérapeutique approuvé par la FDA (Sipuleucel-T® pour le traitement des cancers de la prostate avancés) et très peu d'essais cliniques comparativement à d'autres types d'immunothérapies. [271]

1.2.4 Biomarqueurs cliniques en immuno-oncologie

L'implication du système immunitaire dans le développement et la réponse tumorale n'est plus à démontrer. Or, pour potentialiser cette réponse déficiente en clinique, il est nécessaire de la caractériser et d'identifier les situations où une immunothérapie pourrait profiter au patient. L'identification de biomarqueurs robustes est donc une étape importante pour la stratification clinique (biomarqueurs pronostiques) et l'efficacité thérapeutique (biomarqueurs prédictifs) en immunothérapie du cancer.

1.2.4.1 Infiltration immunitaire

La caractérisation de la densité et de la nature de l'infiltrat immunitaire tumoral permet d'emblée d'établir la susceptibilité de la tumeur à différents traitements ainsi que les chances de survie d'un patient. Grossièrement, les tumeurs peuvent être caractérisées comme « froides » ou « chaudes » selon leur niveau d'infiltration immunitaire intratumorale. Les tumeurs froides sont peu inflammées et caractérisées par une faible infiltration de cellules T effectrices CTL, de T_H1, de T mémoire et d'APC fonctionnels et potentiellement par la présence de cellules immunosuppressives (Treg, TAMs, MDSC). À l'opposé, les tumeurs dites chaudes présentent une forte inflammation et un nombre important de cellules effectrices et APC et une diminution de sous-types immunosuppresseurs. La localisation de l'infiltrat dans le cœur tumoral ou les organes lymphoïdes tertiaires [212, 272] est aussi associée à un pronostic favorable par opposition à l'infiltrat limité en périphérie, aussi appelées tumeurs froides par exclusion [273] (**Figure 1.13**)

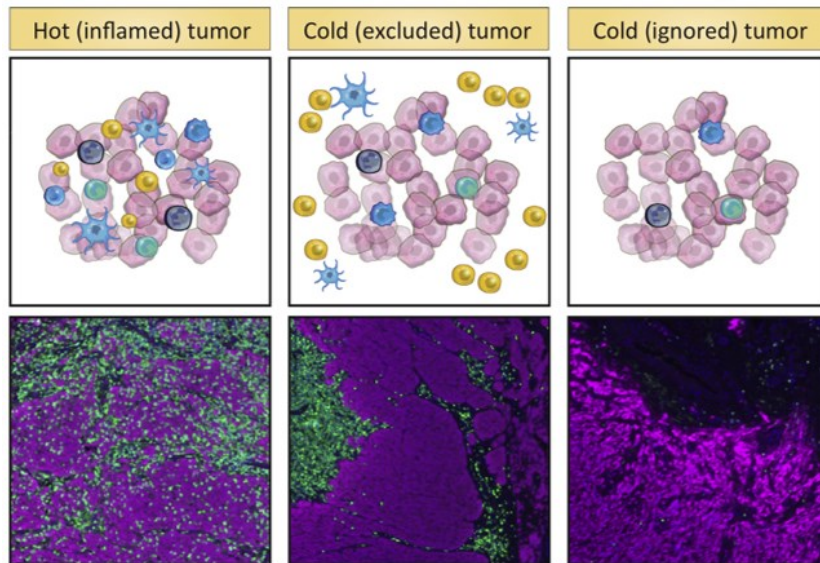


Figure 1.13 Caractérisation de l'infiltration tumorale

Exemples de tumeurs « chaudes » et « froides » par exclusion ou par ignorance immunitaire. Tiré de van der Woude et. Al. [273]

Plusieurs facteurs contribuent à la capacité des cellules effectrices à infiltrer la tumeur. La présence de vaisseaux sanguins dans la tumeur et les organes lymphoïdes tertiaires favorise l'infiltration. Or la sécrétion anormale de VEGF et bFGF par la tumeur peut entraîner une anergie des cellules endothéliales empêchant la liaison des cellules T et l'extravasation [274]. Le MET riche en VEGF, IL-10 et PGE2 peut aussi entraîner l'expression de FasL par les cellules endothéliales entraînant l'apoptose des cellules T recrutées [275].

Le recrutement immunitaire s'opère aussi par la sécrétion de chimiokines pro-cellules T et NK comme CXCL9 et CXCL10. Celles-ci sont toutefois souvent épigénétiquement réprimées par les cellules tumorales [276]. Le recrutement est aussi favorisé par l'absence de chimiokines recrutant des cellules immunosuppressives (Treg, TAM, MDSC recrutés notamment par CCL22, CCL2 et CXCL8 respectivement) [277].

Finalement, la structure de la matrice extracellulaire (ECM) semble aussi avoir un impact sur l'efficacité de la réponse anti-tumorale. En effet, l'augmentation de la densité de l'ECM est liée à une diminution de l'invasion immunitaire et une diminution de la fonctionnalité des cellules effectrices *in vitro* [278]. Ces résultats concordent avec l'observation que les tumeurs

plus riches en collagène présentent un infiltrat immunitaire plus rare. La richesse en collagène d'un échantillon tumoral est donc un marqueur pronostique défavorable [279, 280].

Or, au-delà de la localisation et de la densité de l'infiltration immunitaire, la composition de celle-ci est aussi très importante. Tel que discuté précédemment, nombre de cellules immunitaires présentes dans le MET sont de nature immunosuppressives ou pro-tumorales. La présence de celles-ci est souvent associée à un pronostic défavorable. Ainsi, un ratio CD8⁺/Treg en faveur des Treg est associé à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers [203, 281, 282]. De même, la quantité de TAM présente au sein des tumeurs est inversement corrélée au taux de survie pour plusieurs cancers humains [223, 283] et de nombreuses études ont aussi démontré une corrélation entre l'infiltration de MDSC (tant PNM-MDSC que M-MDSC) et le fardeau tumoral et une corrélation inverse au taux de survie [284]. À l'opposé, une forte présence de cellules effectrices et de marqueurs d'activité cytotoxique (CD8, IFN γ , granzyme B) ainsi que l'enrichissement du marqueur de mémoire immunitaire CD45RO corréleront fortement avec un stade tumoral inférieur, une diminution du potentiel d'invasion et de métastase et donc un taux de survie supérieur [285, 286].

Globalement, la caractérisation du type, de la localisation et de la densité de l'infiltrat tumoral a été démontrée comme un meilleur prédicteur de survie que la classification TNM de l'Union internationale pour le contrôle du cancer (UICC) dans le cancer colorectal [287, 288] et associée à une meilleure réponse au traitement par chimiothérapie dans le cancer du sein [289]. Le profilage immunitaire est donc suggéré comme complément aux systèmes de classification tumorale actuels afin de tenir compte du contexte immunitaire du patient dans l'élaboration de la stratégie thérapeutique [290, 291].

1.2.4.2 Biomarqueurs fonctionnels

L'avènement des premières stratégies d'immunothérapies du cancer à l'aide d'anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4 ont démontré deux faits importants : 1) Ces approches sont efficaces pour l'élimination tumorale et 2) Ces approches ne fonctionnent pas de façon universelle. Ce deuxième point a stimulé au cours des dernières années l'identification de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux immunothérapies afin de mieux adapter la thérapie au patient.

Naturellement, l'expression des marqueurs ciblés par la thérapie révèle souvent la sensibilité du patient au traitement. Or, le niveau d'expression du ligand de la cible, par exemple dans l'axe PD-1/PD-L1, semble parfois plus révélateur. En effet, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales dans des échantillons pré-traitement anti-PD-1 s'avère être un meilleur indicateur de l'efficacité thérapeutique que l'expression de PD-1 par les cellules immunitaires ou le taux d'infiltration tumorale pour différents cancers [292]. La thérapie ciblant CTLA-4 démontre toutefois dans la majorité des études des biomarqueurs prédictifs distincts des thérapies PD-1/PD-L1. En effet, l'expression des marqueurs prédictifs est généralement plus ténue et associés à l'abondance de sous-types cellulaires distincts comme les cellules T CD4 et CD8 mémoire présentes au site tumoral [293].

Les processus de réponse immunitaire et résistance tumorale étant très dynamiques, certains auteurs observent toutefois une meilleure valeur prédictive aux échantillons prélevés après l'initiation du traitement par immunothérapie afin d'identifier les répondants potentiels, tant pour les thérapies CTLA-4 que PD-1 [294]. De nombreux groupes s'intéressent aussi à la détection de biomarqueurs sanguins prédictifs de la réponse aux immunothérapies. Parmi ceux-ci, notons l'abondance de M-MDSC, de cellules T CD4+ mémoire centrale et de Treg circulants qui a montré des associations significatives avec l'efficacité de traitements anti-PD-1 [295]. Bim1, une molécules de signalisation en aval de PD-1, a aussi été identifiée comme un marqueur pronostic et prédictif de l'efficacité de traitements anti-PD-1 dans le mélanome lorsqu'exprimé par des CTL tumeur-spécifiques circulants [296].

La disponibilité de données cliniques due à l'augmentation des études cliniques et des approbations des nouvelles thérapies permet aujourd'hui de mener des analyses rétroactives de plus en plus vastes pour identifier les biomarqueurs prédictifs. Le raffinement de ces biomarqueurs risque d'augmenter au fil des prochaines années avec l'utilisation de meilleurs outils diagnostiques.

1.2.5 Modèles précliniques humanisés

Bien que les modèles murins de tumorigenèse induite aient été indispensables à l'avancement des connaissances en immuno-oncologie, les différences significatives dans les

processus immunologiques [297] et la transformation tumorale [298] rendent les modèles murins mésadaptés à l'étude préclinique d'immunothérapies dédiées à l'humain. Les différents modèles précliniques de cancers humains ayant déjà été abordés dans cette thèse, nous nous intéresserons ici aux différents modèles d'humanisation immunitaire chez la souris.

1.2.5.1 Lignées murines immunodéficientes

Toute approche d'humanisation de souris débute par l'utilisation de lignées murines immunodéficientes. Cela permet d'éviter le rejet des cellules xénogéniques, soit provenant d'une autre espèce, par le système immunitaire murin. Historiquement, les premières souris suffisamment immunodéficientes pour tolérer des greffes humaines sont les souris *nude* découvertes en 1962 dans le laboratoire du Dr Norman R. Grist [299]. Bien qu'elles soient toujours utilisées pour certaines applications, de nombreuses lignées murines présentant des niveaux d'immunodéficiences supérieures sont aujourd'hui préférées aux souris *nude*, particulièrement pour l'humanisation immunitaire. Les lignées utilisées aujourd'hui sont pour la plupart issues du fond génétique diabétique non-obèse (NOD) déficient en cellules immunitaires innées (diminution des fonctions des DC et de l'activité des MØ, absence du système du complément) [300]. L'addition de mutations conférant un phénotype d'immunodéficiences combinées sévères (*scid*) – notamment via la mutation du gène de la protéine kinase dépendante de l'ADN (PRKDC) ou du gène activant la recombinaison (RAG1) – élimine les cellules de l'immunité adaptative en empêchant la recombinaison homologue essentielle au développement des cellules B et T [301]. Finalement, une mutation dans la chaîne γ du récepteur à l'IL-2 ($IL2R\gamma^{tm1Wjl}$) empêche la signalisation par de nombreuses cytokines (IL-2, 4, 7, 9, 15 et 21) nécessaires au développement et à la maturation de plusieurs cellules immunitaires, notamment les NK [302]. La combinaison de ces 3 approches d'immunodéficiences génère des animaux capables d'accueillir des cellules humaines et de supporter une hématopoïèse, soit le développement de cellules sanguines, à un niveau exceptionnel. On nomme ces lignées NSG (NOD-PRKDC^{scid}-IL2R γ^{tm1Wjl}) ou NRG (NOD-Rag1^{-/-}-IL2R γ^{tm1Wjl}). D'autres lignées sont aussi décrites, mais celles-ci sont les plus utilisées. L'addition de différentes propriétés génétiques à ces souris permet aussi de supporter davantage la reconstitution immunitaire humaine chez ces animaux, par exemple l'ablation du MHC I et/ou II murins, l'insertion de gènes HLA ou de

cytokines supportant l'hématopoïèse humaine [303]. Un problème majeur des souches immunodéficientes est l'absence de ganglions lymphatiques autres que mésentériques [304]. Cela peut diminuer l'efficacité de présentation antigénique et l'étude de l'impact des ganglions lymphatiques sur la réponse anti-cancéreuse dans ces modèles.

1.2.5.2 Transfert adoptif

L'approche la plus simple pour l'humanisation immunitaire de souris est l'implantation de cellules immunitaires circulantes provenant du sang périphérique, ou transfert adoptif. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), composées essentiellement des lymphocytes T et B, des monocytes et des NK, sont les cellules principalement utilisées à cette fin. Leur isolation par leucaphérèse ou par centrifugation sur gradient de Ficoll-Paque à partir de donneurs vivants est simple et routinière, il s'agit donc d'une source très accessible de cellules immunitaires. Les premières applications de ce type de modèle remontent à 1988 dans un hôte *scid*, alors dénommé modèle Hu-PBL-SCID (pour humanisation par lymphocytes de sang périphérique de souris *scid*) [305]. Grâce à l'augmentation des taux de greffe due à l'amélioration du fond génétique des souris, les doses de PBMC requises pour la reconstitution efficace sont aujourd'hui réduites et la reconstitution est ainsi accélérée.

L'approche d'humanisation avec PBMC (Hu-PBMC) est simple d'utilisation et permet une reconstitution rapide avec des cellules immunitaires matures et fonctionnelles. Toutefois, on observe une disparition rapide des types cellulaires autres que les lymphocytes T, ainsi que le développement rapide de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) où les cellules implantées attaquent l'hôte murin dans une réaction xénogénique, soit entre deux espèces. L'utilisation de souches murines n'exprimant pas les MHC I et II permet de ralentir la GVHD xénogénique en échange d'une reconstitution inférieure [306].

1.2.5.3 Hu-CD34

L'alternative à l'humanisation par transfert adoptif de PBMC est l'utilisation de cellules souches hématopoïétiques (HSC) exprimant le marqueur CD34. Contrairement à l'approche par PBMC, l'utilisation de HSC implique une substitution des cellules murines des niches

hématopoïétiques par irradiation subléthale de 2Gy suivie de l'injection des HSC humaines quelques heures plus tard. L'irradiation des souris à faible doses permet la mobilisation des cellules souches des niches hématopoïétiques (moëlle osseuse) afin de libérer celles-ci pour la greffe des cellules humaines. Les HSC sont isolées de différentes sources comme le sang de cordon ombilical, la moëlle osseuse, le foie fœtal et le sang périphérique à la suite d'un traitement de mobilisation de cellules souches avec le facteur stimulateur de colonies de granulocytes (G-CSF) [303, 307]. Ce processus mène à l'émergence de cellules immunitaires humaines dès les premières semaines, mais un délai de 8 à 12 semaines est généralement nécessaire à l'obtention de niveaux suffisant de reconstitution immunitaire humaine. Contrairement aux modèles Hu-AT, on observe chez les souris Hu-CD34 une reconstitution à long terme des animaux avec un répertoire cellulaire étendu (cellules B, T et APC stables), améliorée davantage avec l'utilisation de lignées murines exprimant des cytokines hématopoïétiques humaines [308, 309]. La diversité du répertoire de TCR reconstituée avec de tels modèles a été démontrée comme équivalent à celle retrouvée chez l'humain [304, 310]. Toutefois, bien que ces cellules soient diversifiées, le processus de maturation thymique est altéré dans ces modèles puisque le thymus, siège de la maturation des lymphocytes T, est d'origine murine et les processus de maturation y sont déficients. Par conséquent, bien que présente, les réponses cellulaires autologues et allogéniques (la reconnaissance du non-soi au sein d'une même espèce) médiée par le HLA est imparfaite dans ces animaux [304, 311].

1.2.5.4 Hu-BLT

Afin d'améliorer le niveau de reconstitution et de maturité des cellules humaines dans un hôte murin, l'approche ultime à ce jour est le modèle d'humanisation moëlle osseuse, foie, thymus (Hu-BLT). Cette approche est similaire aux modèles Hu-CD34 avec l'ajout de l'implantation chirurgicale sous la capsule rénale de fragments de thymus fœtaux – avec ou sans fragments de foie autologue – chez des souris immunodéficientes préalablement irradiées. On procède ensuite à l'injection des HSC isolées à partir du foie fœtal du même donneur (thymus, foie et HSC autologues) comme dans le modèle Hu-CD34. Ainsi, la maturation des cellules T a lieu au sein d'un organoïde thymique humain autologue. Ce type de modèles présente un niveau de reconstitution soutenus et une maturation supérieure aux modèles Hu-CD34 sans thymus

humain et est d'ailleurs le seul modèle humanisé capable de reconstituer le SI des muqueuses murines [312, 313]. L'amélioration de fonctionnalité du SI dans ces souris entraîne toutefois une augmentation du phénotype d'épuisement immunitaire au fil du temps dans les souris Hu-BLT [311] et une accélération du processus de GVHD xénogénique et donc une fenêtre d'étude raccourcie comparativement aux modèles Hu-CD34. On observe donc la maturité du SI humain vers 8-10 semaines et un début des GVHD en moyenne vers 20 semaines post-reconstitution. Aussi, bien que les modèles Hu-BLT soient aptes à monter une réponse humorale anti-virale, celle-ci demeure restreinte à une réponse primaire IgM sans maturité d'affinité [314]. Cela suggère une inaptitude des cellules B à maturer, probablement à cause de l'absence ou du manque d'organisation des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate). Ces déficiences peuvent aussi avoir un impact sur la réponse anti-tumorale adaptative à long terme. Cependant, les modèles Hu-BLT reposent sur l'utilisation de matériel biologique d'origine fœtal peu accessible et nécessite une expertise chirurgicale avancée, ce qui restreint leur utilisation.

Tableau 1.5 Propriétés des modèles précliniques d'humanisation immunitaire en immunoncologie

Nom	Méthode de reconstitution	Avantages	Inconvénients
Hu-PBMC	Injection de cellules sanguines matures	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide et facile d'accès • Bonne reconstitution des T effecteurs et mémoire et Treg • Système immunitaire mature 	<ul style="list-style-type: none"> • Xeno-GVHD rapide (fenêtre d'étude ~4 semaines) • Reconstitution essentiellement des cellules T • Peu d'APC
Hu-CD34	Injection de HSC, souvent de cordon ombilical, après irradiation subléthale de l'hôte	<ul style="list-style-type: none"> • Reconstitution de multiples lignées hématopoïétiques (B, T, APC, possibilité de myéloïdes et NK) • Fenêtre d'étude étendue dû à la reconstitution plus lente (>15 semaines) • xéno-GVHD tardive 	<ul style="list-style-type: none"> • Délai de reconstitution (10-15 semaines) • Accès aux HSC plus restreint que PBMC • SI mûré sur thymus murin • Faible reconstitution et mobilisation des cellules polymorphonucléées, globules rouges et plaquettes humaines
Hu-BLT	Injection de HSC de foie fœtal après irradiation subléthale de l'hôte et implantation de fragments thymique sous la capsule rénale	<ul style="list-style-type: none"> • Reconstitution d'un système immunitaire relativement complet • Maturation des cellules T sur thymus humain autologue • Reconstitution plus rapide et complète que Hu-CD34 • Fenêtre d'étude relativement longue 	<ul style="list-style-type: none"> • Accès au matériel biologique et expertise chirurgicale • Délais de reconstitution (8-12 semaines) • Xéno-GVHD à moyen terme (fenêtre d'étude ~8-10 semaines)

1.3 Cellules stromales mésenchymateuses

De nombreux traitements peuvent avoir des impacts – désirables ou non – sur la réponse immunitaire. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment les cellules stromales mésenchymateuses multipotentes (MSC) ayant des propriétés immunomodulatrices bien connues mais dont l'impact sur la croissance tumorale demeure controversé.

1.3.1 Définition

La grande hétérogénéité des MSC ainsi que de leurs méthodes d'isolation et d'expansion ont incité l'élaboration de critères minimaux afin de définir cette population cellulaire par la Société internationale de thérapie cellulaire (ISCT). On définit ainsi les MSCs avec les critères suivants :

- 1) des cellules adhérentes au plastique
- 2) exprimant les marqueurs de surface CD105, CD73 et CD90, dépourvus des marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 et HLA-DR (ou HLA II)
- 3) capables de différenciation en lignées ostéoblastique, adipocytaire et chondroblastique *in vitro* [315].

1.3.2 Différentes sources de MSCs

On retrouve des cellules possédant le phénotype MSC avec des proportions variables dans la plupart des tissus chez le fœtus comme chez l'adulte, probablement dû à leur rôle dans la réparation tissulaire (discuté plus loin). Chez la souris, des populations de type MSC ont été isolées dans le cerveau, la rate, le foie, les reins, les poumons, la moelle osseuse, les muscles, le thymus et le pancréas [316]. Or, certains tissus sont plus intéressants pour la récolte d'une quantité suffisante de cellules d'un point de vue clinique. Historiquement, les MSC furent d'abord isolées dans la moelle osseuse [317] comme étant la population responsable de la source de progéniteurs ostéogéniques et ne présentant aucune activité hématopoïétique. Depuis, des quantités importantes de MSC ont pu être isolées à partir de différents tissus de façon moins

invasive. On en retrouve notamment une quantité importante dans le tissu adipeux [318, 319], le sang de cordon ombilical [320] et le cordon ombilical lui-même, particulièrement dans la gelée de Wharton [321]. Bien que répondant toutes aux critères décrits par l'ISCT, les propriétés des cellules issues des différents tissus se sont toutefois avérées légèrement variables, par exemple le taux d'expansion supérieur des MSC de sang de cordon par rapport aux MSC issus de la matrice du cordon ombilical [322, 323], le profil sécrétoire différent entre les MSC de moelle osseuse et de tissu adipeux [324], l'incapacité des MSC de cordon ombilical à se différencier en fibroblastes associés au cancer [325], etc.. Puisqu'à ce jour aucun consensus n'a été obtenu sur la meilleure source de MSC, des cellules de moelle osseuse, de tissu adipeux et de cordon ombilical sont toutes utilisées en clinique.

1.3.3 Propriétés et fonctions connues

Les MSC présentent un nombre important de caractéristiques qui en font des outils thérapeutiques intéressants. Outre la facilité avec laquelle elles peuvent être isolées et amplifiées *in vitro* afin de générer des quantités suffisantes pour un usage en thérapie, elles présentent aussi des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles favorables à leur utilisation.

1.3.3.1 Propriétés immunitaires

Tout d'abord, les MSC sont peu immunogènes de nature. Elles expriment peu de HLA-I et n'expriment pas de HLA-II ni de récepteurs de costimulation CD80 et CD86 [326]. Elles sont donc très résistantes à l'élimination immunitaire, ce qui en permet l'utilisation allogénique en clinique, facilitant ainsi le processus de production.

Outre leurs propriétés immunitaires intrinsèques, une des propriétés principales des MSC est leur fort potentiel immunomodulateur. Bien que les mécanismes impliqués ne semblent pas avoir été complètement élucidés, le potentiel immunosuppresseur des MSC est connu depuis longtemps tant *in vitro* qu'*in vivo* [327]. Les MSC suppriment la réponse immunitaire principalement via des mécanismes paracrines. En effet, il a été démontré qu'elles sécrètent une multitude de facteurs solubles immunosuppresseurs comme le lactate, l'IDO, le PGE2, l'oxide

nitrique (NO), le facteur de croissance hépatique (HGF), le HLA-G5, l'IL-10 et le TGF- β [328, 329]. Ces facteurs ainsi que les mécanismes dépendant du contact direct des MSC avec les cellules immunitaires ont été démontrés comme inhibiteurs de la prolifération, la maturation et la fonction de cellules B, T, NK, macrophages et DC ainsi que pour induire les Treg [329-334]. La stimulation du phénotype sécrétoire immunosuppresseur a aussi été observée à la suite de l'exposition aux cytokines pro inflammatoires IFN γ et TNF α permettant de potentialiser la réponse immunosuppressive spécifiquement aux sites d'inflammation [335, 336].

1.3.3.2 Migration vers les sites d'inflammation

Une autre propriété supposée des MSC est leur capacité de migration aux sites d'inflammation. En effet, il a été observé que les MSC démontrent un tropisme vers les sites d'inflammation, probablement afin de promouvoir la réparation de dommages tissulaires. Décrite initialement en 2003 [337], plusieurs hypothèses ont été suggérées afin d'expliquer cette capacité migratoire. Les MSCs expriment un grand nombre de récepteurs aux chimiokines et le facteur dérivé de cellules stromales 1 (SDF-1 ou CXCL12) apparaît comme une des chimiokines impliquées dans ce processus via son récepteur CXCR4 à la surface des MSC [338-340]. D'autres chimiokines suggérées pour le recrutement de MSC au site d'inflammation sont notamment CCL21, favorisant aussi la différenciation des MSC *in situ* [341] et la protéine du complément C1q servant d'agent chimiotactique et potentialisant l'efficacité du SDF-1 en augmentant l'expression de CXCR4 [342].

1.3.3.3 Différenciation et réparation tissulaire

La capacité des MSC à se différencier en différents types cellulaires est l'une des caractéristiques principales. Leur potentiel de différenciation est toutefois généralement supérieur aux critères minimums établis et s'étend au-delà des lignées mésodermiques que sont les ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes. En effet, différents groupes de recherche ont observé leur aptitude à se différencier en lignées endodermiques (cellules musculaires et épithéliales) et neurectodermiques (neurones, astrocytes) [343-346] (**Figure 1.14**). Une explication possible pour cette capacité est l'origine neuroépithéliale et de la crête neurale d'une

portion des MSC lors du développement [347]. La diminution d'un tel potentiel de transdifférenciation avec l'âge a toutefois été décrit [347], favorisant potentiellement l'utilisation de MSC d'origine fœtale pour ces applications. La transdifférenciation désigne la différenciation dans un type cellulaire provenant d'une lignée germinale différente de celle de la cellule sans passage par une phase de dédifférenciation. Les mécanismes de ce processus sont méconnus.

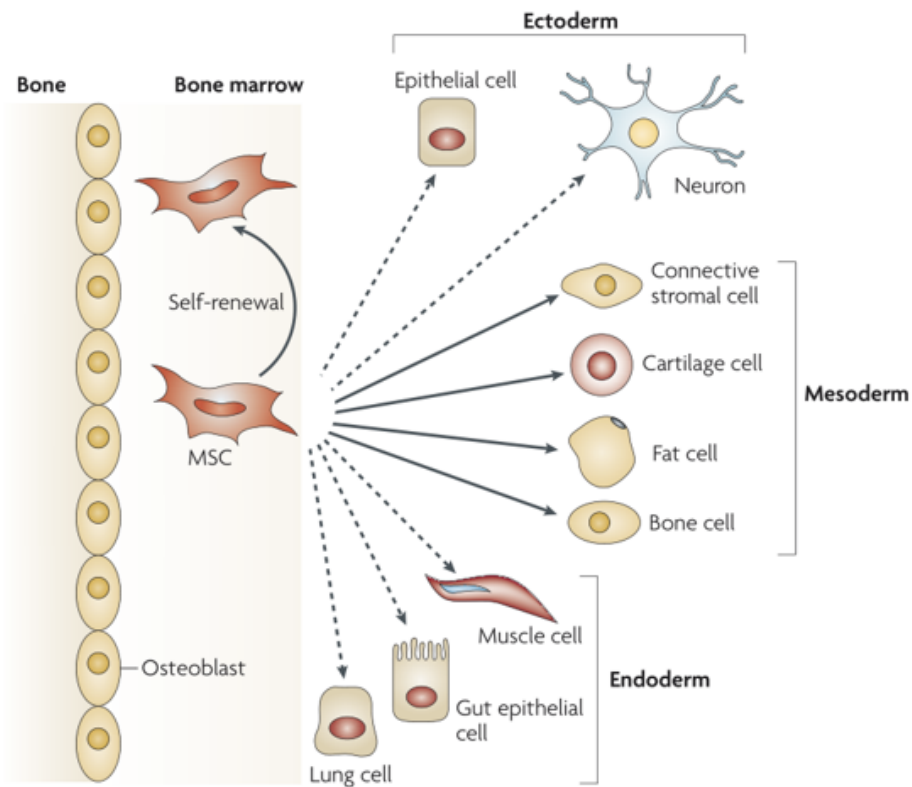


Figure 1.14 Potentiel de différenciation des MSC

Schématisation de la capacité d'auto-renouvellement (flèche courbée), de différenciation en lignées mésodermiques (flèches droites pleines) et de transdifférenciation en lignées endodermiques et ectodermiques (flèches pointillées). Tiré de Ucelli *et al.* [348].

Ces propriétés de différenciation combinées à la capacité de migration aux sites d'inflammation ont contribué à l'hypothèse du rôle des MSC dans la réponse aux dommages et la réparation tissulaire. En effet, la capacité de réparation tissulaire des MSC a été démontrée pour de nombreuses conditions de blessure ou de maladie comme l'*osteogenesis imperfecta* [349], le diabète [350], l'infarctus du myocarde [351], plusieurs désordres neurologiques [352],

des dommages aux poumons [353] et des pathologies rénales [354]. La plupart des études ont cependant démontré que la transdifférenciation des MSC semble ne jouer qu'un rôle marginal dans le processus de réparation tissulaire comparativement aux mécanismes paracrines [355]. La nature de ces mécanismes paracrines étant spécifique aux tissus touchés, il serait trop long d'en faire l'énumération ici, mais la sécrétions de cytokines favorisant l'angiogenèse et de particules exosomales semblent instrumentaux à ce processus [356].

1.3.4 Applications thérapeutiques

Grâce à ces propriétés biologiques comme l'immunosuppression, la localisation aux sites d'inflammation et un fort phénotype sécrétoire, les MSC font d'excellents candidats pour la thérapie cellulaire de certaines affections pour lesquelles peu d'approches pharmacologiques se sont montrées efficaces. Au-delà des maladies congénitales de l'os, du diabète, des affections cardiaques, des troubles neurologiques ainsi que des dommages aux poumons et aux reins cités plus haut, l'impact des MSC a été évalué notamment pour le traitement de l'ostéoarthrite [357] et d'autres pathologies de l'os et des articulations [358], d'insuffisance hépatique [359], de la sclérose en plaques [360], de la maladie de Crohn [361], de GVHD [362] ainsi que pour l'amélioration de la prise de greffe lors de transplantations de moelle osseuse [363] et d'organes solides [364]. Ainsi, à l'été 2019, plus de 600 essais cliniques utilisant des MSC étaient en cours ou complétés (clinicaltrials.gov).

1.3.5 MSC dans le cancer

Les propriétés des MSC sur la croissance tumorale sont beaucoup plus controversées, quant à elles. Plusieurs revues à ce sujet ont soulevé les nombreuses études contradictoires quant à l'impact des MSC sur la croissance tumorale [365-367]. Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer de tels résultats. Parmi ceux-ci, on dénote la promotion de l'angiogenèse et le support vasculaire – notamment par l'expression de VEGF et SDF-1 [368] et la différenciation en péricytes [369] – bien que d'autres études aient observé une inhibition angiogénique *in vitro* des MSC se traduisant en une inhibition de croissance de mélanomes *in vivo* [370]. La capacité des MSC, sauf celles provenant de cordon ombilical [325], à se différencier en fibroblastes associés au cancer (CAF) en réponse au microenvironnement tumoral a aussi été suggérée

comme un facteur de promotion tumorale puisque ceux-ci sont reconnus pour alimenter cette croissance [371]. Les MSC exerçant la plupart de leurs effets via des mécanismes paracrine, on peut suspecter que ceux-ci soient importants aussi dans leur potentiel de modulation tumorale. Ainsi, l'impact de nombreux facteurs sécrétés ou induits par les MSC a été démontré comme promouvant la croissance tumorale (ex. lactate, IDO1, PGE2, NO, HGF, TGF- β , IL-10, HLA-G5 [180, 231, 372-376]) ou la métastase (CCL5 [377]) alors que d'autres composés ont démontré un effet anti-tumoral (ex. la protéine dickkopf-1 [378] inhibant la voie β -catenin). La sécrétion de grandes quantités de vésicules extracellulaires contenant différents facteurs et micro ARN a aussi été impliquée dans des mécanismes pro- et anti-tumoraux [366, 379]. Finalement, le potentiel immunosuppresseur des MSC est bien connu, toutefois les études d'impact de cette immunosuppression sur la croissance tumorale sont rares, spécialement dans un contexte humain. Or l'immunosuppression étant généralement associée à une plus grande incidence et agressivité des lésions cancéreuses, il est fort probable qu'il s'agisse d'un mécanisme important de promotion tumorale par les MSC.

Avec l'accumulation des études à ce sujet, la balance semble pencher vers un effet pro-tumoral des MSC sur la prolifération, l'invasion et la métastase. Or, la parution continue d'études démontrant une inhibition de croissance tumorale en réponse à l'administration de MSC rappelle la complexité des systèmes biologiques et l'importance du contexte expérimental.

1.4 Hypothèse et objectifs

Selon les plus récentes analyses sur l'industrie du médicament, on constate que bien que le cancer soit la pathologie contre laquelle le plus de nouvelles thérapies sont testées, le taux d'approbation de celles-ci était de loin le plus faible de l'industrie entre 2006 et 2015 (5.1% vs 9.6% en moyenne) avec des performances particulièrement déplorable en phase II (24.6% vs 30.7% en moyenne) et phase III (40.1% vs 58.1% en moyenne). Le portrait est pire en cancers solides qu'en cancers hématologiques [380] (**Figure 1.15**). À la lumière de ces informations, un constat semble clair : les modèles actuels sont peu aptes à prédire la réponse clinique à de nouvelles thérapies chez l'humain.

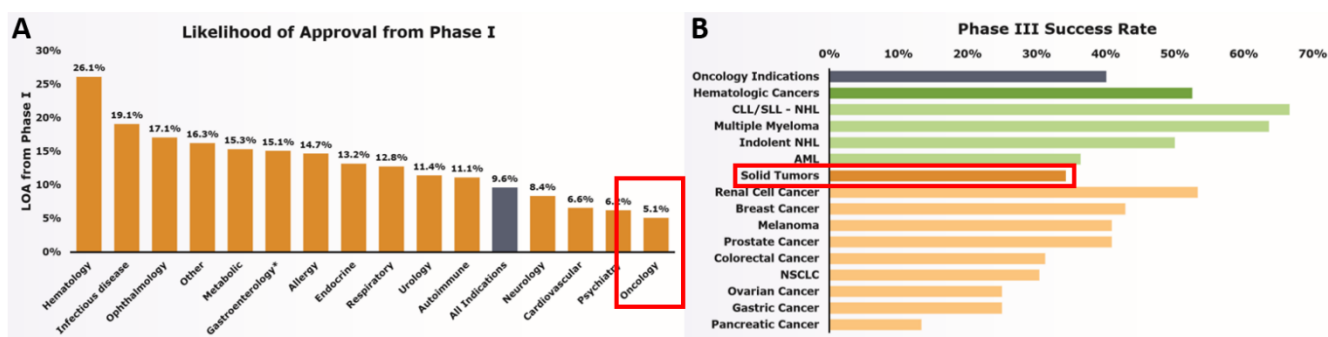


Figure 1.15 Taux d'approbation de nouvelles thérapies en oncologie

Évaluation comparative des probabilités d'approbation (LOA) de nouvelles thérapies dans différentes catégories d'indications. A) LOA globale à partir de l'entrée en phase clinique I et B) Détail des taux de succès d'études cliniques de phase III en oncologie par famille d'indication. Les encadrés rouges indiquent les valeurs d'intérêt. Adapté de Thomas *et al.* [380]

La tendance vers l'immunothérapie du cancer entraîne de surcroît de nouveaux défis pour la modélisation préclinique : comment modéliser le microenvironnement immunitaire tel que retrouvé en clinique dans un modèle animal? En effet, la réponse immunitaire d'un patient contre sa propre tumeur – de l'élimination à l'évasion en passant par la phase d'équilibre, selon le principe d'immunoédition (1.2.1 Théorie de l'immunoédition tumorale) – implique une réponse autologue très fine. La modulation de cette réponse chez le patient nécessite par conséquent l'utilisation de modèles précliniques capables de récapituler les phases critiques de ce processus. Différentes approches ont été tentées afin de répondre à cette problématique, par exemple la combinaison de PDX avec soit les PBMC ou les HSC du donneur original [381] ou

l'assortiment des donneurs par typage HLA [382]. Or, ces approches sont logistiquement très restrictives ou imparfaites de nature. De plus, l'utilisation de PDX ou de lignées tumorales implique qu'une immunoédition ait déjà eu lieu chez le patient, générant des tumeurs naturellement plus résistantes à la réponse immunitaire.

Au cours des dernières années, afin de contourner ces problématiques, nous avons développé des modèles précliniques pour l'immuno-oncologie où tumeurs et SI sont humains, autologues et issus de donneurs sains. L'objectif principal de cette thèse est donc de démontrer le potentiel préclinique de ces modèles innovateurs en répondant aux objectifs spécifiques suivants :

- Évaluer la possibilité de générer plusieurs lignées tumorales représentatives *in vivo* à partir d'un seul donneur sain à la suite de la différenciation de cellules iPSC normales. (Article 1)
- Démontrer l'impact d'un système immunitaire autologue sur l'émergence et la croissance *in vivo* des différentes lignées tumorales. (Article 1)
- Démontrer la faisabilité d'utiliser ces modèles pour évaluer l'efficacité d'immunothérapies ciblées (Article 1)
- Utiliser cette approche pour déterminer si l'effet immunomodulateur des MSC influe sur la croissance tumorale. (Article 2)

Chapitre 2 : Résultats

2.1 Premier article : présentation du modèle

Moquin-Beaudry G., Benabdallah B., Le O., Li Y., Colas C., Raggi C., Ellezam B., McCallum M., Guimond J.V., Paganelli M., Haddad E., and Beauséjour C. (unpublished).

Development of novel preclinical humanized mouse models in immuno-oncology.

Article original en préparation

Development of novel preclinical humanized mouse models in immuno-oncology

Gaël Moquin-Beaudry^{1,2}, Basma Benabdallah¹, Oanh Le¹, Yuanyi Li¹, Chloé Colas^{1,3}, Claudia Raggi¹, Benjamin Ellezam^{4,7}, Marie McCallum^{1,5}, Dorothée Dal Soglio^{6,7}, Jean V. Guimond⁸, Massimiliano Paganelli^{1,5,9,10}, Elie Haddad^{1,3,10}, Christian Beauséjour^{1,2*}

¹Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

² Département de pharmacologie et physiologie, ³Département de microbiologie, immunologie et infectiologie, ⁴Département de neurosciences, ⁵Département de biologie moléculaire, ⁶Département de pathologie et biologie moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal

⁷ Département de pathologie, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal

⁸ CIUSSS du Centre-Sud-de-l'Île-de-Montréal, Québec, Canada

⁹ Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and Pediatric Liver Transplantation Program at CHU Sainte-Justine, Université de Montréal

¹⁰ Département de pédiatrie, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal

* Correspondence:

Christian Beauséjour PhD

CHU Ste-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine

Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

(Phone) 514-345-4931 x4385

e-mail: c.beausejour@umontreal.ca

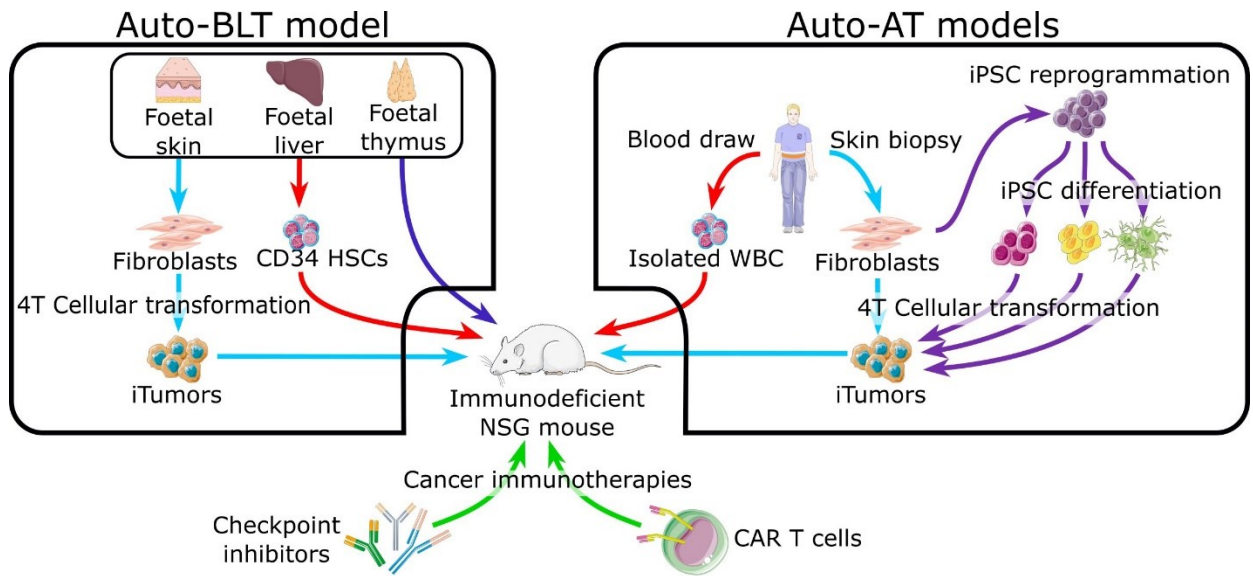
ABSTRACT

Modeling the tumor-immune cell interactions in humanized mice is complex and limits drug development. Here, we generated easily accessible autologous tumor models by first transforming primary skin fibroblasts and iPSC-derived hepatocytes or neural cell lines obtained from healthy donors. These engineered tumor cells were then injected in immune-deficient mice previously reconstituted with fetal hematopoietic stem cells (HSCs) and autologous thymus tissue (Hu-BLT) or following the adoptive transfer of immune cells (Hu-AT) collected from the same donors. Our results showed that tumors were efficiently recognized by autologous immune cells in both humanized mouse models. Characterization of tumor immune infiltrates revealed high expression levels of the dysfunction markers Tim3 and PD-1 in T cells and an enrichment in regulatory T cells suggesting rapid establishment of an immunosuppressive microenvironment. Inhibition of PD-1 by Nivolumab in Hu-AT mice did not significantly improve tumor clearance despite increasing immune cell infiltration. We also showed the *in vitro* efficacy of chimeric antigen receptor (CAR) T cells at killing autologous iPSC-derived transformed neural progenitor cells expressing the tumor specific antigen GD2. We expect our models will facilitate preclinical studies and validation of autologous cancer immunotherapies across a range of different tumor cell types.

195 words

Key words: Autologous tumors, humanized mice, iPSC, cancer immunotherapy

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Cancer drugs have the worst likelihood of approval when compared to the rest of the industry [1]. This situation underlines the need for better preclinical models to emulate clinical conditions in a reliable manner [2]. This is particularly true in the era of immuno-oncology, where cancer is no longer viewed as a cell-autonomous disease. Instead, the whole tumor microenvironment, especially the host's immune system, is now viewed as a modulator of cancer development and elimination through cancer immunoediting mechanisms [3, 4]. While classical cancer therapies have been shown to indirectly promote anticancer immune response [5, 6], new immunotherapies such as checkpoint blockade inhibitors, vaccination or chimeric antigen receptor (CAR) cell therapy aim at enhancing, potentializing or inducing the host's anti-tumor immune response. However, very few preclinical models manage to provide a relevant immunological environment where human tumors are confronted with autologous immune cells.

Genetically engineered mouse models of cancer are valuable platforms but their translational potential is limited by genetic and physiological differences between mice and humans [7, 8] and historically have demonstrated poor translational robustness [9]. This led to the development of various chimeric mouse models that use immunodeficient mice NOD/SCID/IL2R γ ^{null} (NSG) as vessels for human tumor growth. For example, while patient-derived xenograft (PDX) models are very potent tools to study established immune system-evading tumors, their use as preclinical platform has some caveats such as maintenance, genetic drift and most importantly their difficult combination with an autologous immune system. Some recent studies have tackled this issue by combining PDX with patient-derived hematopoietic stem cells (HSCs) or reinfusion of in vitro-expanded tumor-infiltrating lymphocytes [10, 11]. However, the reliance on patient-derived immune cells limits the accessibility and scalability of such models. Similarly, while cancer cell lines are easy to use, they are debatably reproducible [12, 13] and suffer the same complexities when it comes to studying autologous tumor-immune system. To address this, HLA matching has been successfully attempted but remains technically challenging [14].

Multiple approaches of mouse humanization are currently being used [15]. In humanized adoptive transfer (Hu-AT) models, mature and functional peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) from donors are injected to immunodeficient mice for rapid and efficient reconstitution, albeit at the cost of a rapid graft versus host disease (GVHD) onset [16]. Alternatively, humanization models using HSCs provide a long term robust human lymphocyte reconstitution [17, 18]. However, effector T cells are trained on murine thymic tissue, making it hard to distinguish specific autologous T cell reactions. To address this, humanized bone marrow/liver/thymus models (Hu-BLT) employ fetal liver-derived HSCs with surgical implantation of autologous thymic tissue under the renal capsule for improved T cell maturation [19, 20].

Here we propose an approach combining the flexibility of cancer cell lines by transforming primary fibroblasts or iPSC-derived cells with a set of define proto-oncogenes with the easy access to autologous immune cells from healthy donors. Using either Hu-BLT or Hu-AT mice, we have developed flexible and accessible preclinical models that are uniquely positioned to study immune-naive tumors in an autologous immune setting.

RESULTS

Fibroblast-derived tumors are partially rejected by autologous immune cells following adoptive transfer in mice

In order to establish tumor models with an easy access to autologous immune cells, we first choose to generate tumor cell lines from skin fibroblasts derived from healthy adult donors. Transformation of fibroblasts was achieved by successive lentiviral transductions of hTERT, SV40ER and HRas^{v12} genes which were shown to efficiently transform human cells [25]. These tumor cells were also tagged with the mPlum fluorescent marker for in vivo imaging and hereinafter designated 4T cell lines. The subcutaneous injection of tumor cells in the flank of NSG-SGM3 mice lead to the formation of tumors in all mice within 3-4 weeks (Fig. 1A). As

previously reported by our lab[26], partial to complete tumor rejection was observed in autologous Hu-AT mice (Auto-AT) suggesting a potent but insufficient immune response (Fig 1A, B). Flow cytometry analysis of the immune infiltrate of still growing tumors showed multiple immune cell populations, mostly restricted to T and NK cells (Fig. 1C and S1). Differential clustering analysis between human circulating and tumor-infiltrating immune cells (hTIIC) suggests that the tumor microenvironment can significantly alter the immune phenotype (Fig. 1C right). For examples, tumors were enriched for CD14⁺ cells and immunosuppressive CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells while depleted of effector CD56⁺ cells, CD8⁺ T cells and CD45RO⁺ effector memory T cells (Fig. 1D). However, no significant change in the proportion of dysfunctional T cells was found, with all mice showing high levels of dysfunctional cells in both blood and the tumor environment (Fig. 1F). We also observed variations in the expression level (as detected by mean fluorescent intensity) of the exhaustion markers Tim3 and PD-1 on T cells in both blood and tumors (Fig. 1E). These results suggest that while immune-naïve tumors are efficiently recognized by autologous immune cells, tumors are quickly able to induce an immunosuppressive microenvironment and avoid complete elimination in most cases.

Anti-PD-1 immunotherapy in autologous Hu-AT mice leads to increased immune infiltration

We next investigated, as a proof of concept, if autologous Hu-AT mice bearing fibroblastic tumors were sensitive to immunotherapy using the anti-PD-1 antibody Nivolumab. This is justified by the fact that our tumors were shown to express high levels of PDL1 (data not shown). Our results showed a slight but not significant improvement in tumor rejection upon treatment with Nivolumab (Fig. 2A). Flow cytometry analysis of the human immune compartment in these mice revealed that Nivolumab did not significantly affect immune population profiles either in blood or within tumors as shown by highly overlapping populations in tSNE dimensionality-reduction plots (Fig.2B). Only CD3⁻CD56⁺ NK cells seemed to decrease in abundance in blood samples of Nivolumab-treated animals (Fig. 2B, Blue-rich cluster in left panel). However, a significant increase in human CD45⁺ infiltration within tumors

was observed in Nivolumab-treated animals (Fig. 2C top left) and was confirmed by immunofluorescent staining (Fig. 2D). In all conditions, nearly all human infiltrating immune cells were CD3⁺ T cells (Fig 2C top second from left). No specific population enrichment was observed within the hTIIC compartment in Nivolumab-treated animals. Phenotypically, infiltrating T cells were also largely similar between animal groups with only PD-1 staining varying significantly, presumably as a staining artifact due to steric interference by residual circulating Nivolumab. Interestingly, Nivolumab-treated animals showed high levels of Tim3⁺PD-1⁺ dysfunctional T cells within tumors compared to blood samples. This may suggest a quicker PD-1 turnover and/or T cell activation/proliferation within tumors than in circulation after Nivolumab infusion. Alternatively, an inefficient distribution of Nivolumab inside tumors may account for this observation. Overall these results suggest the injection of Nivolumab in mice harboring PDL1⁺ tumors can increase the infiltration of T cells but this had no significant impact on tumor growth in an immunosuppressive environment.

Fibroblast-derived tumors are partially rejected in autologous Hu-BLT mice

We next wanted to measure the immunogenicity of our 4T fibroblasts in Hu-BLT mice which allow for a more robust reconstitution of diverse functional immunological compartments. Using the same methodology as above, we observed that Hu-BLT mice were also able to partially or completely reject both allogeneic and autologous subcutaneous 4T tumors derived from fetal skin fibroblasts (Fig. 3A). As expected, allogeneic tumors were more efficiently inhibited than autologous tumors in Hu-BLT mice (Fig. 3A and 3B). However, flow cytometry analysis of the human immune compartment (Fig. 3C, 3D and S2) revealed no phenotypic variations in circulating human blood cells between mice harboring Auto- and Allo-tumors (Fig. 3C left and 3E). hTIIC of non-eliminated tumors displayed similar population clustering with a slight but significant enrichment of CD8⁺ cells and concomitant reduction in CD4⁺ cells in Auto-BLT tumors (Fig. 3C right, 3D and 3E). As observed in Auto-AT mice, major phenotypic variations between circulating and tumor-infiltrating human immune cells were observed for both Auto- and Allo-BLT mice (Fig. 3C, 3D, 3E). However, while hTIIC displayed a marked increase in CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells and in PD-1 and Tim3

expression, circulating T cells did not show any sign of exhaustion in opposition to what we observed in Auto-AT mice (Fig. 3D, 3E). Yet, most tumors were eventually able to escape the immune response in Hu-BLT mice suggesting they can also induce an immunosuppressive microenvironment that cannot be overcome despite the absence of exhaustion in circulating blood T cells.

Transformation of iPSC-derived hepatocyte-like cells leads to tumor formation and partial rejection in autologous Hu-AT mice

To generate alternative tumor models that can be used in a humanized setting, we set out to transform iPSC-derived cells from healthy donors. First, hepatocytes were differentiated using a previously described protocol (schematized in Fig. 4A). We initiated the transformation process using SV40ER at different timepoints in the cell differentiation process which led to the formation of growing colonies. These colonies were then transduced with HRas^{V12} and hTERT lentiviral particles after the differentiation protocol was complete (Fig. 4A). We tried transforming cells at day 16, 22 and 30 of the differentiation protocol and observed the transformation potential of the cells was overall very limited with only a limited number of colonies formed at day 16 and rare foci at day 22. It was not possible to transform cells at day 30 suggesting *in vitro* transformation using SV40ER is possible only in a subset of poorly differentiated cells and likely requires cells to maintain a proliferation potential which is lost in the differentiation process.

Characterization by qPCR of untransformed induced hepatic cells (iHep) showed these cells express markers of hepatic differentiation (hepatoblast-associated alpha fetoprotein (AFP), hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4A), albumin (Alb) and asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1)) at generally comparable levels compared to the control HepG2 hepatocellular carcinoma cell line (Fig. 4B). Upon transformation of iHep (iHep 4T), the expression of most markers was decreased (except for cholangiocyte-associated cytokeratins 19 and 7) suggesting either that transformation induced dedifferentiation of the cells or that transformation occurred more efficiently in less differentiated progenitors. When injected intrahepatically, iHep 4T cells formed circumscribed tumors with entrapped liver parenchyma and mixed sarcomatoid

components (Fig. 4C left). Tumor cells were highly mitotic, undifferentiated, pleomorphic and occasionally hyperchromatic with some polynucleated cells and ill-defined cell borders (Fig. 4C right). AFP staining was weakly positive *in vitro* when compared to the control HuH-6 hepatoblastoma cell line but negative *in vivo* (Fig 4D, top), Alb expression was strongly positive *in vitro* and weakly positive *in vivo* (Fig. 4D, center) and HepPar1 staining was negative *in vitro* and *in vivo* (Fig. 4D, bottom). Pathology examination suggests that iHep 4T tumors resemble undifferentiated embryonic sarcoma of the liver [27].

Interestingly, as observed with fibroblastic 4T cell lines, the intrahepatic injection of iHep formed tumors in all animals with similar kinetics. The addition of 5×10^6 autologous PBMCs and granulocytes was enough to partially or completely reject iHep 4T tumors in NSG-SGM3 mice (Fig. 4E). These results suggest it is possible to generate hepatic-like tumors and that these tumors are immunologically detected in Auto-AT mice.

iPSC-derived NSC tumors recapitulate high grade glioblastoma and are partially rejected in Auto-AT mice

To further explore the flexibility of our models we initiated the transformation of iPSC-derived neural stem cells (iNPC) and astrocytes (iAstro). Cells were differentiated as shown in Fig 5A and characterized for their expression of differentiation markers nestin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) respectively (Fig. S3). The transformation of iNSC and iAstro lead to the generation of highly aggressive tumors when injected orthotopically in NSG-SGM3 mice (Fig. 5B). As few as 1.5×10^3 iAstro cells were enough to consistently generate tumors within 3-4 weeks. iNSC 4T tumors also formed highly undifferentiated tumors in NSG-SGM3 mice (Fig. 5B top), however the histopathology was inconclusive in characterizing them as classical GBM. They were nonetheless highly proliferative tumors with prominent growth along Virchow-Robin spaces but with a limited diffuse infiltration and a distinctive accumulation near the dentate gyrus in all animals (Fig 5B top). iAstro 4T tumors were also highly proliferative and displayed a more conspicuous diffuse infiltration, parenchymal entrapment and ventricular and leptomeningeal dissemination along with extensions in the Virchow-Robin space. Variable anaplastic features and a significant involvement of reactive astrocytes were also observed (Fig

5B middle and bottom). Morphologically, iAstro 4T tumors were polymorphic and harbored multiple characteristic structures such as myxoid material, pre-necrotic cells, karyorrhexic nuclei, cellular monstrosities/giant cells and some regions akin to giant cell and epithelioid GBM. Immunophenotypically, iAstro 4T tumors were strongly vimentin- and moderately cytokeratin AE1/AE3-positive (Fig. 5C left column) and lacked expression for MAP2 and S100 (Fig. 5C). Olig2, CD56, desmin and cytokeratin 19 were also found to be negative in these tumors (data not shown). Consistent with a previous study using a similar transformation approach, *in vivo* tumors lacked GFAP expression despite *in vitro* expression [28](Fig. S3).

When injected in Auto-AT mice, both iNSC and iAstro 4T orthotopic tumors were highly infiltrated by hCD45 cells (Fig. 5D) which were mostly CD8 T cells (Fig S5). Little or no infiltration was observed in surrounding tissue suggesting a specific T cell-mediated anti-tumor response. As observed with our other tumor types, iNSC and iAstro 4T tumors were partially rejected (Fig. 5E and S5). These results demonstrate it is possible to transform iPSC-derived neural cell lines and that these cells are infiltrated by autologous immune cells upon orthotopic injection in the brain of Hu-AT mice.

GD2 expression by iNSC tumors is not predictive of their immunogenicity against autologous anti-GD2 CAR T cells

We unexpectedly observed that iNSC specifically acquired expression of the tumor specific antigen GD2 disialoganglioside and that such expression was maintained after cellular transformation (Fig.6A). Moreover, iNSC 4T tumors also retained GD2 expression *in vivo* while iAstro 4T tumors were negative. The reason for such expression is unknown but it allowed us to test whether tumor-autologous chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) could be generated against GD2 and specifically kills these tumor cells. Due to low CAR transduction efficiency in T cells (approximately 20%), we used high effector:targets ratios (2.5:1, 10:1, 20:1) that resulted in high background cytotoxicity for T cells alone. Surprisingly, while donor #1 iNSC 4T showed high levels of GD2 expression, CAR-specific cytotoxicity was barely improved vs. T cell control (Fig.6C top). However, no significant cytotoxicity was observed in GD2 negative cells from the same donor (in this case iPSC-derived endothelial cells). At the opposite, donor 2

showed a significant CAR-specific killing (Fig.6C bottom) despite that only about 5% of the target cells were expressing GD2 (Fig. 6A). Higher T cell cytotoxicity was however observed in both iNSC and GD2 negative primary fibroblasts. Although these results need to be repeated with iNSC 4T cells derived from other iPSC clones and donors, these preliminary results suggest GD2 expression is insufficient to predict effective killing by anti-GD2 CAR T cells.

Discussion

In this study, we presented new models for the preclinical testing of cancer immunotherapeutic approaches by generating genetically-defined tumor cell lines from primary or iPSC-derived cells combined with autologous immune humanization of mice. In addition to be highly homogeneous to assure high reproducibility, these naive tumors have not undergone immunoediting events that could interfere with primary immune rejection. While these models may represent a limitation for studying cancer resistance, they could be highly advantageous for whoever is interested in evaluating the intrinsic efficacy of novel immunotherapies or validate new targets.

In the transformation process of primary and iPSC-derived cell lines, we observed that the aggressive 4T transformation approach (SV40ER/HRas^{V12}/hTERT) systematically lead to fast-growing, aggressive and highly undifferentiated tumors. However, we noted the inability of this approach to transform quiescent cells *in vitro*, such as terminally differentiated iHep and GFAP-rich iAstro cells, leading to undifferentiated tumor phenotypes. Indeed, we observed that only experimental conditions containing residual cycling cells were permissive to transformation by our oncogenes, in opposition to mostly cycling fibroblasts cultures who were more uniformly transformed. While this could be an artefact of non-physiologic cell culture conditions this observation supports the hypothesis that most cancer cells originate from the stem or progenitor cell compartment rather than terminally differentiated quiescent cells [29]. Also, in accordance with the cancer stem cell hypothesis, transformed iAstro 4T cells expressed the GBM cancer

stem cell associated marker CD133 [30] *in vitro* (Fig S4), with resulting tumors being CD133 negative by immunohistochemistry (data not shown).

Going forward, we propose that alternate tailoring of driver genetic alterations could improve different aspects of tumor phenotype and maintain tumor cells at a higher level of differentiation so to steer these models towards the desired histopathology such as the driver mutations IDH1, ATRX and EGFR in glioblastoma or CTNNB1, NFE2L2, APOB and ALB in hepatocellular carcinomas [31].

Concerning autologous immune recognition of tumors, all cell lines generated with the 4T transduction approach were immunogenic to various degrees *in vivo*. One possibility is that non-human proteins such as the viral SV40 large and small T antigens, which express immune-dominant epitopes [32], are mainly recognized, but further studies are needed to confirm this hypothesis. However, it is also possible that such a broad transformation approach, which systematically lead to poor differentiation phenotypes, as demonstrated with our iHep and iAstro 4T tumors, induces immunogenic tumor antigens.

Our models were effective in mounting autologous immune response mediated mostly by effector T cells as other effector types are poorly reconstituted in most humanized models. NK cells, for instance, require exogenous [33] or transgenic addition of IL-15 [34] or IL-2 [35] for their development and maturation in HSC-reconstituted mice. In this study, however, we suspect NK cells to be non-essential to tumor recognition and elimination for many reasons. First, while CD3⁺CD56⁺ NK cells were identified in some Auto-AT animals, none were detected within tumors. Also, the inability of BLT mice in the NSG background to reconstitute functional NK cells [36] did not prevent them from mounting a functional anti-tumor response. Finally, *in vitro* cytotoxicity assays between fibroblast-derived tumors and NK cells were negative (data not shown).

Finally, the high activation/exhaustion profiles of T cells observed in AT models suggests mice were at an early stage of GVHD which prevented us from tracking tumor growth long-term. Using newly developed MHC knockout mouse strains could help circumvent this problem in the future [37, 38]. However, this approach would require closer reconstitution monitoring as these models display decreased human reconstitution with PBMCs [39].

In conclusion, we generated highly accessible and flexible autologous models of tumor-immune cell interactions which should facilitate the evaluation and development of cancer immunotherapies. Moreover, recent developments in the differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells capable of immune reconstitution in mice (ref) suggest it will soon be possible to generate multiple tumor cell types along with their autologous immune cell counterparts.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation and culture of skin fibroblasts

Skin fibroblasts were first isolated from either adult skin biopsies or fetal skin segments for Hu-AT or Hu-BLT models respectively. Skin tissues were obtained from consented healthy adult donors or after surgical abortion at around week 20 of pregnancy in accordance with the Bureau d'Éthique à la Recherche du CHU Sainte-Justine. In both cases, the tissue was cleaned out to preserve only the dermis and epidermis, triturated into 1-5mm² pieces and digested with collagenase D (Roche) for one hour at 37°C with agitation. The whole mixture was then centrifugated at 400 g for 5 minutes and washed with DMEM (Wisent) twice. The whole product of digestion was seeded in T150 flasks in DMEM with 10% FBS and 0.2% primocin (Invivogen). Subsequent passages were also maintained in DMEM with 10% FBS and 0.2% primocin.

iPSC reprogramming

Healthy human donor PBMCs or skin fibroblasts were reprogrammed into iPSCs using the integration-free based Sendai virus (Cytotune 2.0 kit from Life Technologies). Low passage primary fibroblasts were used to increase reprogramming efficiency. Following transduction, emerging colonies were manually picked and cultured under feeder-free conditions using

Geltrex-coated dishes and Essential 8 medium (Life Technologies). iPSC clones were maintained in culture for at least 15 passages to ensure stable pluripotency before characterization was conducted by the iPSC – cell reprogramming core facility of CHU Sainte-Justine: Colony immunofluorescent staining against human SSEA-4, Sox2, OCT4 and TRA1-60 overnight at 4°C with the pluripotent Stem Cell 4-marker Immunocytochemistry Kit (Life Technologies) followed by Alexa-488 or -594 fluorescent secondary staining for 30 minutes at room temperature and DAPI nuclear counterstaining (data not shown).

Hepatocyte differentiation

Differentiation of human iPSCs into hepatocyte-like cells (HLC) was achieved according to our 30-day long, previously described protocol mimicking liver development (Raggi et al. submitted). In brief, iPSCs were differentiated on laminin-coated plates through consecutive stages (primitive streak, mesendoderm, definitive endoderm, posterior foregut, hepatoblasts and, eventually, HLCs) by the sequential supplementation with growth factors and small molecules acting on FGF, Wnt, BMP and TGF β signaling pathway.

NSC and Astrocyte differentiation

Neural Stem Cells (NSC) and Astrocytes were differentiated from hiPSCs by first using the PSC Neural Induction Medium (NIM) (Gibco). Briefly, 70-80% confluent hiPSCs were dissociated into single cell with TrpLE Express Enzyme (Gibco) and seeded on Geltrex matrix (Gibco) at 15-25% confluence in NIM for 7 days. Resulting Neural stem cells (NSCs) were then expanded for at least 3 passages in StemPro NSC SFM (Life Technologies). Resulting cells were considered NSC after validation of nestin expression by immunofluorescence. NSCs were maintained in StemPro NSC SFM for further transformation (see below) or differentiated further into the astrocyte lineage. To do so, $8,75 \times 10^4$ NPCs were plated on Geltrex in a 6 well plate in StemPro NSC SFM for 2 days before switching to astrocyte differentiation medium consisting of DMEM with 1% N-2 supplement (Gibco), 1% GlutaMAX-I supplement (Gibco) and 1% FBS (Wisent) for 40 days with medium change every 3-4 days. Astrocytes were characterized *in vitro*

by immunofluorescence for the expression of GFAP and Vimentin. Briefly, cells were seeded in Geltrex coated Lab Tek chamber slides (Nunc) and fixed 5 days later in 3.7% formaldehyde before permeabilization and blocking using PBS with 0.3M Glycine (Wisent), 1% BSA (Sigma), 2.5% Goat Serum (Sigma) and 0.1% Triton X-100 (Sigma) for 30 minutes at room temperature. Primary anti-GFAP(Dako) or anti-Vimentin antibodies were used at 1/200 concentration overnight at 4°C and secondary AF488-conjugated anti-mouse Ig (Life Technologies) at 1/500 for 1 hour at room temperature. GFAP-expressing astrocyte populations were subsequently transformed (see below). Flow cytometry was done using anti-CD133/1-PE (Miltenyi Biotec, clone AC133) and anti-GD2-APC (Biolegend, clone 14G2a).

Lentivirus production

All lentiviral particles were produced by overnight PEI transfection of 293T/17 cells (ATCC CRL-11268) in complete RPMI with 10% FBS with 2nd (pPAX2) or 3rd (pMDL and pRSV-Rev) generation packaging plasmids along with a plasmid encoding the VSV-G envelope. SV40ER was subcloned from pBABE SV40ER from William Hahn (Addgene #10891) into a lentiviral transfer plasmid containing a Neomycin resistance gene (SV40ER-Neo), RasV12 lentiviral transfer plasmid containing a puromycin resistance gene (RasV12-puro) was obtained from Francis Rodier (CHUM, Université de Montréal), hTERT lentiviral transfer plasmid was generated as previously described [21], mPlum was subcloned from pQC mPlum XI from Connie Cepko (Addgene #37355)[22] into a lentiviral transfer plasmid containing puromycin selection gene and firefly luciferase IRES-GFP (luc/GFP) and Anti-GD2 chimeric antigen receptor lentiviral vectors were generated by Élie Haddad's laboratory (CHU Sainte-Justine). Medium was changed after overnight incubation with a low volume of DMEM 10% FBS and viral particle-containing medium was harvested 30 hours later, filtered through 0.22 µm syringe filter and concentrated by ultracentrifugation or frozen as is in -80°C freezer. GFP lentiviral transfer plasmids are used for every viral production for transfection, transduction and antibiotic selection control.

Cellular transformation

Primary fibroblasts and astrocytes or iPSC-derived cells lines were transformed with lentiviral particles in a sequential matter. For fibroblast-derived tumors, cells were transduced overnight with medium containing SV40ER-Neo viral particles. Three days later, G418 selection is started at 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ThermoFisher) and maintained until control GFP-transduced cells are eliminated. Cells were subsequently transduced with RasV12-puro lentivirus in a similar way. Puromycin (ThermoFisher) selection was started three days post-transduction at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ again with GFP-transduced cells as control. Cells were then transduced overnight with medium containing hTERT lentiviral particles. 2 days later, cells were transduced overnight with mPlum viral particles. All transductions were done in presence of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene. Cells were subsequently expanded and sorted on FACSARIAII (BD Biosciences) in the APC channel for the expression of mPlum. For hepatocyte, astrocyte and NPC-derived tumor cells, lentiviral suspensions were used as well as luc/GFP instead of mPlum. However, the initial overnight SV40ER transduction was made at day 16 of the hepatocyte differentiation protocol (see above), and differentiation was pursued. Cells were passaged on day 32 and RasV12-puro transduction was done once the cells were 70-80% confluent. Three days later, concomitant G418 and puromycin selection started, still at 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, until individual controls for each antibiotic were eliminated. Cells were subsequently transduced with hTERT then luc/GFP and sorted on FACSARIAII (BD Biosciences) for GFP expression.

Mouse reconstitution

All *in vivo* experiments were conducted in conformity with institutional committee for good laboratory practices for animal research (protocol #669). All mice used in this study were of the NSG and NSG-SGM3 (expressing human IL3, GM-CSF and SCF) background, originally obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and housed in the animal facility at the CHU Sainte-Justine Research Center under pathogen-free conditions in sterile ventilated racks. For adoptive transfer (Hu-AT) experiments, human adult peripheral blood was harvested from healthy donors after informed consent and immune cell isolation using Ficoll-Paque gradient (GE Healthcare). Buffy coat was harvested for PBMCs while granulocytes were isolated from the gradient pellet: Ficoll-Paque was aspirated and the pellet was broken and resuspended in 38

mL of sterile deionized water for 20 seconds for RBC lysis before addition 2 mL of sterile 20X PBS solution. PBMCs and granulocytes were counted and mixed at 1:1 ratio before injection into mice. 5×10^6 PBMCs and 5×10^6 granulocytes for a total of 1×10^7 WBC were injected intraperitoneally (i.p.) into NSG-SGM3 in 200 μ L total volume. Age and sex-matched NSG-SGM3 without i.p. injections are used as no-AT controls.

For BLT-reconstituted mice (Hu-BLT), 6-8-week-old NSG mice were sublethally irradiated with 2 Gy total body irradiation using a Faxitron CP-160 before surgical implantation of 1-2mm³ human fetal thymus under the kidney capsule and intravenous injection of 5×10^5 CD34+ hematopoietic stem cells (HSC) isolated from autologous fetal liver as previously described [23]. Fetal (16-21 weeks) tissues were obtained after written informed consent (ethical committee of CHU Sainte-Justine, CER#2126). Hematopoietic engraftment was assessed by flow cytometry at 4 and 8 weeks by staining 50 μ L of peripheral blood collected from the saphenous vein. The following antibodies were used (mouseCD45-FITC from BD bioscience and 7-AAD, humanCD45-PE/Cy7, humanCD19-PE, humanCD3-APC and humanCD14-APC/Cy7 from Biolegend) and cells analyzed on the LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences). Only mice with high reconstitution at week 8-10 (35-75% human CD45, >20% CD3) were used in this study. Age and sex-matched non-reconstituted NSG mice are used as negative control. In all cases, mice showing signs of GVHD were removed from analysis.

Mouse orthotopic injections and monitoring

All injections and surgical procedures were undergone under aseptic conditions in the CHU Sainte-Justine animal facility. For the subcutaneous injections of fibroblast-derived tumors, 5×10^5 cells were injected in 100 μ L of RPMI medium on each flank of isoflurane-anesthetized and previously shaved mice. *In vivo* growth monitoring was done twice weekly on the Q-Lumi *In Vivo* imaging system (MediLumine, Montreal) by fluorescent tracking of mPlum-expressing tumor cells. Fluorescence signal was standardized internally for each picture and normalized for defined parameters using FIJI macros for picture processing. Tumor signal analysis was measured semi-manually also using FIJI macros and expressed in fluorescence integrated density or by caliper measurements. For checkpoint inhibitor studies, three 6 mg/kg

doses of Nivolumab anti-human PD-1 antibody (graciously offered by Bristol-Myers Squibb, New York) were injected i.p. over one week. Tumors were excised upon sacrifice and tumor weight and volume were recorded and compared to control tumors in each experiment. Normal growth was defined by tumors bigger than one standard deviation (SD) below control mean. Tumor growth inhibition (TGI) characterized palpable, harvestable tumors smaller than one SD below control mean. Tumors were considered eliminated (TE) when unpalpable or too small to be harvested at sacrifice. Mice were sacrificed when tumors reached a maximum of 1500 mm³ or showed signs of distress.

Intracranial injection of astrocyte- or NPC-derived tumors were done using a stereotaxic apparatus (Stoelting). Briefly, mice were anesthetized with 2.5% isoflurane and the cranium exposed by performing a 5-6 mm incision on the scalp. A burr hole was made 2mm posterior and 1mm right of the bregma. A 10 μ L Hamilton syringe was then inserted into the hole at a 3mm depth and 1 μ L of tumor cell suspension (containing 1.4×10^3 cells) was slowly injected (over a period of 10 seconds). The syringe was maintained for one minute in the hole before being slowly withdrawn to avoid gushing. The hole was then closed with Vetbond tissue adhesive (3M) before suturing the scalp. Mice were treated with buprenorphine daily for 2 days following surgery and monitored for distress signs. *In vivo* monitoring of tumor growth was done at regular intervals by bioluminescence tracking of firefly luciferase-expressing tumor cells. To do so, a 30 mg/mL solution of D-luciferin (PerkinElmer 122799) was injected i.p. at a dose of 150 mg/kg and imaged after 10 minutes without filters on the Q-Lumi *In Vivo* Imaging System. Signal normalization and analysis was done automatically for all time points using FIJI macros and expressed in radiance (photons \cdot s⁻¹ \cdot sr⁻¹ \cdot cm⁻²) integrated density (Area \cdot mean intensity).

Intrahepatic injections of iPSC-derived hepatic cells were done as follows: Briefly, mice were anesthetized with 2.5% isoflurane and a 15 mm incision was made underneath the ribcage on the left ventral flank. A small incision was made in the peritoneal lining to expose the left hepatic lobe. Using a glass capillary, a 10 μ L (containing 5×10^5 to 1×10^6 cells) injection was made at about 2 mm depth in the liver lobe. Incisions were sutured, and the animal was treated with buprenorphine daily for 2 days following procedure. *In vivo* monitoring of tumor growth

was done at regular intervals by bioluminescence tracking of firefly-luciferase expressing tumor cells as described above.

Histological analysis and staining

Whole organs or tumor tissues were placed in 4% formaldehyde for at least 48 hours before dehydration, paraffin inclusion, and sectioning. Routine hematoxylin eosin saffron (HES) staining was performed and analyzed by a pathologist. Subsequent immunohistological staining of samples were done following clinical protocols by CHU Sainte-Justine's clinical histology department. For immunofluorescent staining, whole organs or tumor tissues were flash frozen on dry ice after harvest. 6-10 μm -thick sections were made on a cryostat (Leica) and deposited on gelatinized slides and immediately fixed and permeabilized in 95% EtOH. Immunofluorescent staining was performed against human CD45 (Cell signaling, clone D9M8I), human CD8 (Biolegend, clone HIT8a), SV40 LargeT antigen (Santa Cruz, clone Pab 101), and GD2 (Biolegend, clone 14G2a) with AlexaFluor 488 or 594 secondary antibodies and DAPI counterstain.

Immune infiltrate characterization

Tumors were excised from mice and peripheral blood was harvested at sacrifice. Tumors were digested using the human Tumor Dissociation Kit (with enzymes H and A only to avoid epitope losses) and the GentleMACS Octo Dissociation with heaters (Miltenyi). Cells were then filtered on 70 μm MACS SmartStrainers (Miltenyi) and washed as per manufacturer's protocol using RPMI (Wisent) with 10% FBS. Cells were then stained with antibodies for analysis by flow cytometry of tumor infiltrating immune cells (hTIICs) against the following targets: humanCD3-AF700, humanCD33-BV510 and humanCD25-BV711 from Biolegend and mouseCD45-PE/Cy7, humanCD45-BUV395, humanCD19-PE/CF594, humanCD4-BB515, humanCD8-BV421, humanCD14-APC/H7, humanCD56-BV786, humanCD127-BB700, humanPD-1-BUV737 and humanTim3-PE from BD Biosciences. Blood samples from the same animals were also stained with the same antibody panel before red blood cell lysis using BD

Pharm Lyse lysis buffer (BD Biosciences). All results were acquired using a BD LSRFortessa (BD Biosciences). Data analysis was done on FlowJo V10 (FlowJo, LLC) and the FlowSOM algorithm in FlowJo [24].

CAR-T cell cytotoxicity assay

Fresh T cells were isolated from peripheral blood after Ficoll-Paque density gradient separation (GE Healthcare) by using EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (Stemcell Technologies). Cells were activated using Dynabeads™ Human T-activator CD3/CD28 (Gibco) at a 1:1 ratio with 30 µg/mL of recombinant IL-2 and transduced 24 hours post-activation with anti-GD2 CAR-encoding lentivirus at a multiplicity of infection of 10 with 6 µg/mL of protamine sulfate (Millipore Sigma). Cells were expanded for 14 days with medium supplementation every 2 days. CAR expression was assessed by flow cytometry using biotin-SP AffiniPure Goat anti-Mouse IgG, F(ab')₂ fragment specific antibody (Jackson ImmunoResearch laboratories) and Streptavidin-PE (Biolegend). Target cells were stained with PKH26 (Sigma-Aldrich) and seeded the day before effector cells were added at the specified ratios of CAR⁺-T cell: target in RPMI with 10% FBS (Wisent) and left in contact for 24 hours. Wells were then emptied, and cells detached with 0.25% trypsin (Wisent) for 5 minutes before adding 5 volumes of PBS +10% FBS and 2.21mM EDTA and 0.1% 7-AAD stain. Plates were processed using HTS-enabled LSRFortessa (BD Biosciences) for live target cell counting.

Statistical analysis

Student's t-test, one and two-way ANOVA with Šídák's multiple comparison post-tests were done using GraphPad Prism 8.0. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

BIBLIOGRAPHY

1. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(1):40-51. doi: 10.1038/nbt.2786. PubMed PMID: 24406927.
2. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British journal of cancer.* 2001;84(10):1424-31. doi: 10.1054/bjoc.2001.1796. PubMed PMID: 11355958; PubMed Central PMCID: PMC2363645.
3. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803. PubMed PMID: 15032581.
4. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486. PubMed PMID: 21436444.
5. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(3):215-33. doi: 10.1038/nrd3626. PubMed PMID: 22301798.
6. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer cell.* 2015;28(6):690-714. doi: 10.1016/j.ccell.2015.10.012. PubMed PMID: 26678337.
7. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731-8. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731. PubMed PMID: 14978070.
8. Balmain A, Harris CC. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):371-7. doi: 10.1093/carcin/21.3.371. PubMed PMID: 10688857.
9. Hackam DG, Redelmeier DA. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2006;296(14):1731-2. doi: 10.1001/jama.296.14.1731. PubMed PMID: 17032985.
10. Fu J, Sen R, Masica DL, Karchin R, Pardoll D, Walter V, et al. Autologous reconstitution of human cancer and immune system in vivo. *Oncotarget.* 2017;8(2):2053-68. doi: 10.18632/oncotarget.14026. PubMed PMID: 28008146; PubMed Central PMCID: PMC5356779.
11. Jespersen H, Lindberg MF, Donia M, Söderberg EMV, Andersen R, Keller U, et al. Clinical responses to adoptive T-cell transfer can be modeled in an autologous immune-humanized mouse model. *Nature Communications.* 2017;8(1):707. doi: 10.1038/s41467-017-00786-z.
12. Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature.* 2018;560(7718):325-30. doi: 10.1038/s41586-018-0409-3. PubMed PMID: 30089904; PubMed Central PMCID: PMC6522222.
13. Ben-David U, Beroukhim R, Golub TR. Genomic evolution of cancer models: perils and opportunities. *Nature reviews Cancer.* 2018. doi: 10.1038/s41568-018-0095-3.

14. Wang M, Yao LC, Cheng M, Cai D, Martinek J, Pan CX, et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J*. 2018;32(3):1537-49. doi: 10.1096/fj.201700740R. PubMed PMID: 29146734; PubMed Central PMCID: PMC5892726.
15. Zitvogel L, Pitt JM, Daillere R, Smyth MJ, Kroemer G. Mouse models in oncoimmunology. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(12):759-73. doi: 10.1038/nrc.2016.91. PubMed PMID: 27687979.
16. King M, Pearson T, Shultz LD, Leif J, Bottino R, Trucco M, et al. A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clinical immunology*. 2008;126(3):303-14. doi: 10.1016/j.clim.2007.11.001. PubMed PMID: 18096436.
17. Marodon G, Desjardins D, Mercey L, Baillou C, Parent P, Manuel M, et al. High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.gamma c-/- mice. *European journal of immunology*. 2009;39(8):2136-45. doi: 10.1002/eji.200939480.
18. Kooreman NG, de Almeida PE, Stack JP, Nelakanti RV, Diecke S, Shao N-Y, et al. Alloimmune Responses of Humanized Mice to Human Pluripotent Stem Cell Therapeutics. *Cell reports*. 2017;20(8):1978-90. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.003.
19. Denton PW, Krisko JF, Powell DA, Mathias M, Kwak YT, Martinez-Torres F, et al. Systemic administration of antiretrovirals prior to exposure prevents rectal and intravenous HIV-1 transmission in humanized BLT mice. *PloS one*. 2010;5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008829.
20. Wahl A, Victor Garcia J. The use of BLT humanized mice to investigate the immune reconstitution of the gastrointestinal tract. *J Immunol Methods*. 2014;410:28-33. doi: 10.1016/j.jim.2014.06.009. PubMed PMID: 24952245; PubMed Central PMCID: PMC4163067.
21. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999;400(6743):464-8. doi: 10.1038/22780. PubMed PMID: 10440377.
22. Moquin-Beaudry G, Colas C, Li Y, Bazin R, Guimond JV, Haddad E, et al. The Tumor-Immune Response Is Not Compromised by Mesenchymal Stromal Cells in Humanized Mice. *J Immunol*. 2019;203(10):2735-45. doi: 10.4049/jimmunol.1900807. PubMed PMID: 31578272.
23. Putra J, Ornvold K. Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver: a concise review. *Archives of Pathology and Laboratory ...* 2015.
24. Rich JN, Guo C, McLendon RE, Bigner DD, Wang XF, Counter CM. A genetically tractable model of human glioma formation. *Cancer research*. 2001;61(9):3556-60.
25. Nature V-JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011.
26. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401. doi: 10.1038/nature03128.
27. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Cell S-S. Comprehensive characterization of cancer driver genes and mutations. *Cell*. 2018.
28. Tatum AM, Mylin LM, Bender SJ, Fischer MA, Vigliotti BA, Tevethia MJ, et al. CD8+ T cells targeting a single immunodominant epitope are sufficient for elimination of established SV40 T antigen-induced brain tumors. *J Immunol*. 2008;181(6):4406-17. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4406. PubMed PMID: 18768900; PubMed Central PMCID: PMC2631553.

29. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(1):25-34. doi: 10.1084/jem.20082013. PubMed PMID: 19103877; PubMed Central PMCID: PMCPMC2626663.
30. Herndler-Brandstetter D, Shan L, Yao Y, Stecher C, Plajer V, Lietzenmayer M, et al. Humanized mouse model supports development, function, and tissue residency of human natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(45):E9626-E34. doi: 10.1073/pnas.1705301114. PubMed PMID: 29078283; PubMed Central PMCID: PMCPMC5692533.
31. Katano I, Takahashi T, Ito R, Kamisako T, Mizusawa T, Ka Y, et al. Predominant Development of Mature and Functional Human NK Cells in a Novel Human IL-2–Producing Transgenic NOG Mouse. *The Journal of Immunology*. 2015;194(7):3513-25. doi: 10.4049/jimmunol.1401323.
32. Wege AK, Melkus MW, Denton PW, Estes JD, Garcia JV. Functional and phenotypic characterization of the humanized BLT mouse model. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008;324:149-65. doi: 10.1007/978-3-540-75647-7_10. PubMed PMID: 18481459.
33. Ashizawa T, Iizuka A, Nonomura C, Kondou R, Maeda C, Miyata H, et al. Antitumor Effect of Programmed Death-1 (PD-1) Blockade in Humanized the NOG-MHC Double Knockout Mouse. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(1):149-58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0122.
34. Brehm MA, Kenney LL, Wiles MV, Low BE, Tisch RM, Burzenski L, et al. Lack of acute xenogeneic graft- versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression. *FASEB J*. 2019;33(3):3137-51. doi: 10.1096/fj.201800636R. PubMed PMID: 30383447; PubMed Central PMCID: PMCPMC6404556.
35. King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J, et al. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clinical and experimental immunology*. 2009;157(1):104-18. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03933.x.
36. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*. 2003;22(16):4212-22. doi: 10.1093/emboj/cdg417.
37. Beier KT, Samson ME, Matsuda T, Cepko CL. Conditional expression of the TVA receptor allows clonal analysis of descendants from Cre-expressing progenitor cells. *Developmental biology*. 2011;353(2):309-20. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.03.004.
38. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):786-98. doi: 10.1038/nri3311. PubMed PMID: 23059428; PubMed Central PMCID: PMC3749872.
39. Gassen S, Callebaut B, Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry Part A*. 2015;87(7):636-45. doi: 10.1002/cyto.a.22625.

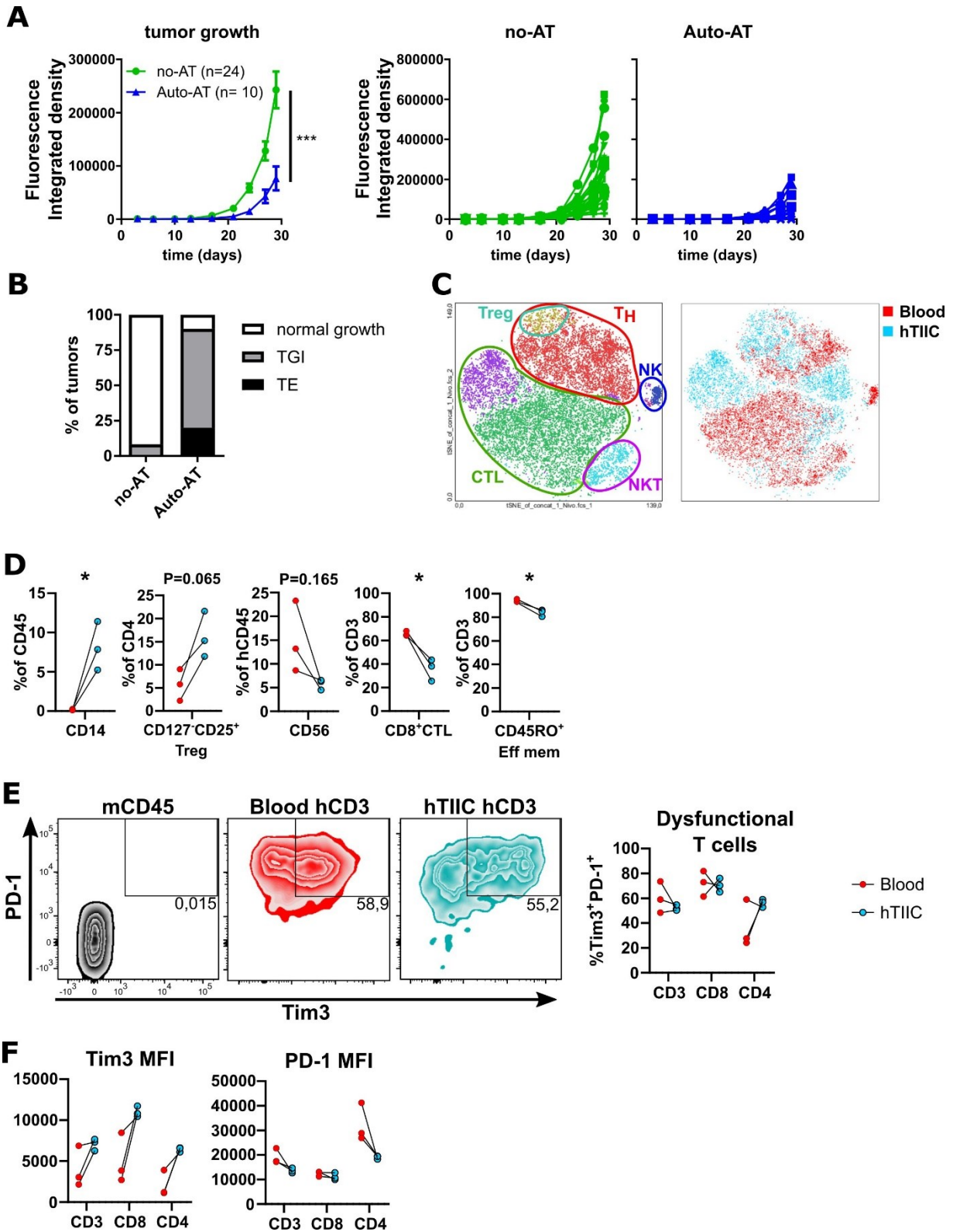


Figure 1. Naïve human skin fibroblast-derived tumors are recognized by autologous immune cells in Hu-AT mice.

Fig. 1 Engineered human skin fibroblast-derived tumors are recognized by autologous immune cells in Auto-AT mice. (A) Growth curves for 4T transformed adult dermal skin fibroblasts (left) and individual growth for all tumors without immune humanization (middle panel, no-AT, green) and with autologous Hu-AT (right panel, Auto-AT, blue) expressed in fluorescence integrated density. Shown is the mean \pm SEM (B) Tumor rejection assessment at sacrifice. TE = Tumor elimination, TGI = tumor growth inhibition. (C) Characterization of the human immune infiltrate by flow cytometry. tSNE Dimensional reduction visualization with unsupervised clustering using FlowSOM module for FlowJo and manual labelling of subtypes (left). Differential clustering between hTIIC and blood human CD45⁺ cells shows little overlap signifying differential marker expression levels (right). (D) Manual quantification of differentially represented human immune populations between blood and tumor samples. (E) Exhaustion/dysfunction gating strategy (left) and quantification (right) showing no significant change in total CD3, CD8⁺ and CD4⁺ T cell populations dysfunction frequency between blood and tumor. (F) Differential expression levels of dysfunction markers Tim3 and PD-1 on human T cell populations in blood vs. tumor samples shown by mean fluorescence intensity quantification. In panels (C, right), (D), (E) and (F), red = Blood human immune cells, and light blue = hTIIC. n= number of tumors, 2 tumors per mouse.

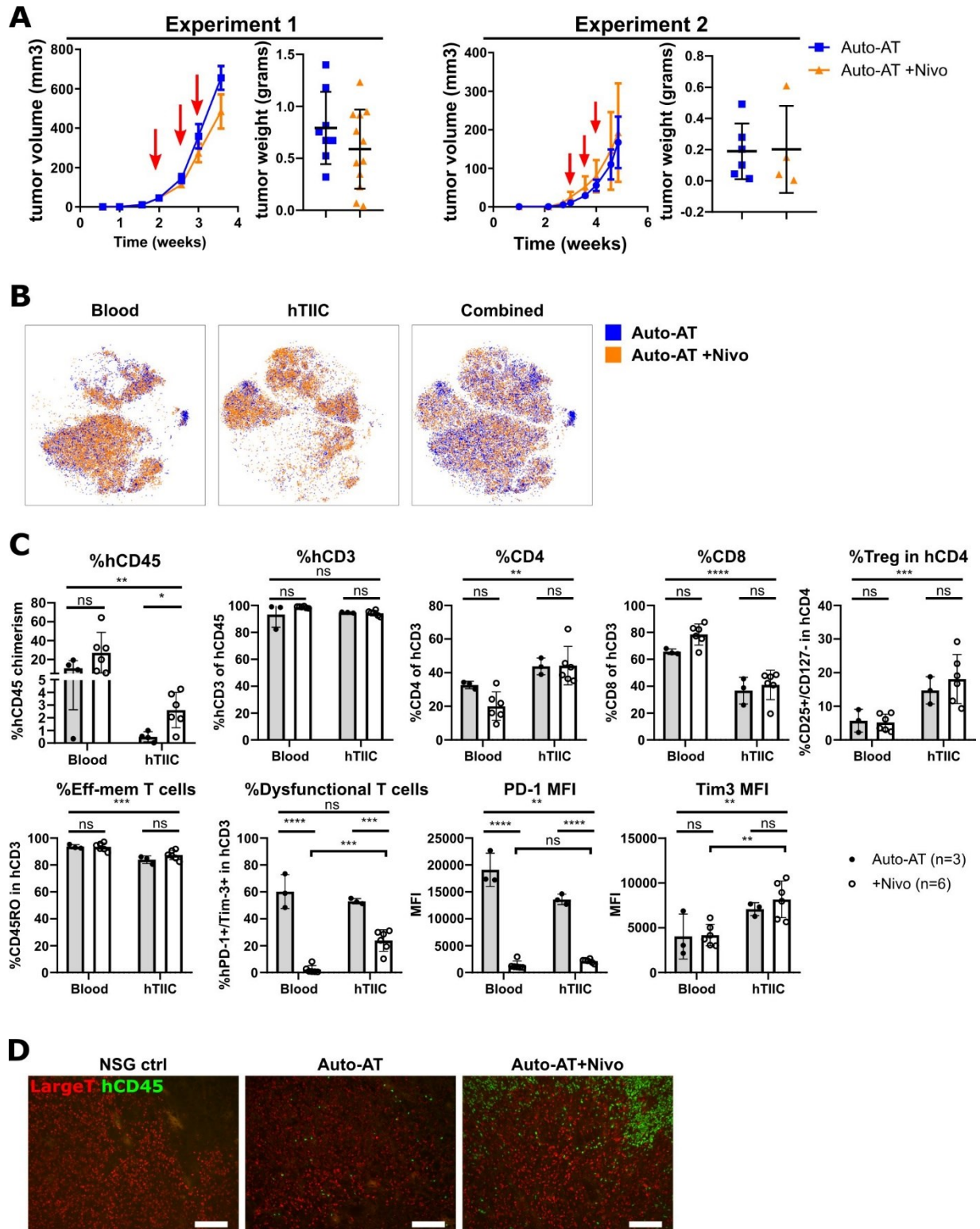


Figure 2. Nivolumab significantly improves immune cell infiltration in a 4T human skin fibroblast tumor Hu-AT model.

Fig. 2 Nivolumab significantly improves immune cell infiltration in fibroblastic tumors in the Auto-AT mice. (A) Effect of Nivolumab administration in Auto-AT tumor-bearing mice. 2 experiments showing tumor growth (left panel, Mean±SEM) and tumor weight at sacrifice (right, Mean±SD) for each experiment. Red arrows indicate i.p. injections of 6 mg/kg Nivolumab. n= number of tumors, 2 tumors per mouse (B) tSNE dimensional reduction of human immune cells by flow cytometry. Blood (left), tumor infiltrating (middle) and combined (right) human immune cells in Auto-AT mice with (orange) or without (blue) Nivolumab show nearly complete overlap of all populations, indicating no significant population shift is observed. (C) Flow cytometric quantification of human immune population frequencies (top row) and T cell phenotype (bottom row) in blood and tumors of Auto-AT alone (grey bars and full dots) or with Nivolumab treatment (hollow bars and dots). Mean±SD. One tumor per mouse was processed. (D) Representative images of human immune infiltrate within s.c. fibroblastic tumor samples for NSG-SGM3 control (left), Auto-AT alone (middle) and Auto-AT +Nivolumab (right). Red = Large T, green = human CD45, Scale bars = 200µm.

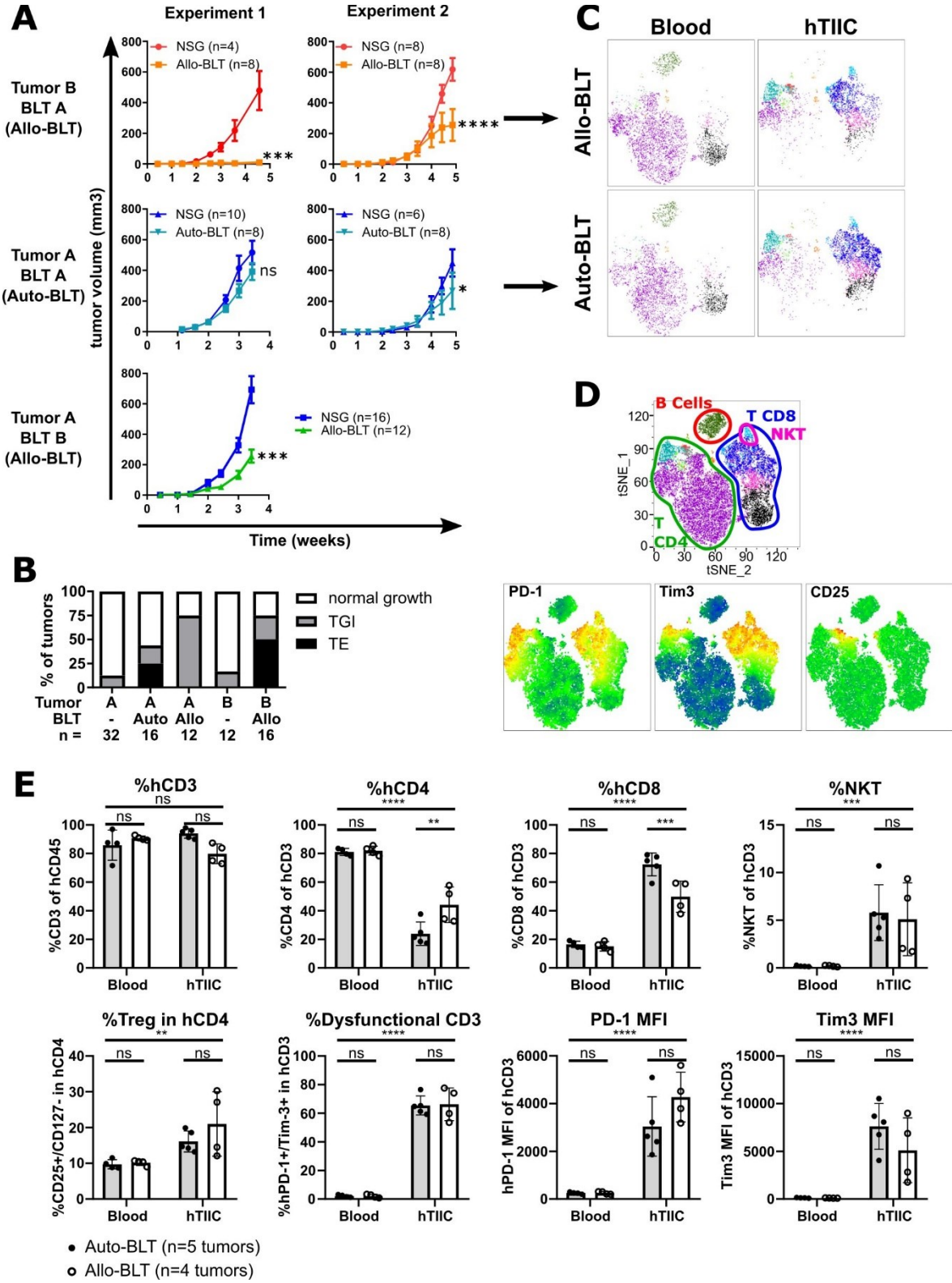


Figure 3. Human skin fibroblast-derived tumors are recognized by autologous immune cells in Hu-BLT mice.

Fig. 3 Human skin fibroblast-derived tumors are recognized by autologous immune cells in Hu-BLT mice. (A) Growth curves for repeated experiments showing fetal skin fibroblast-derived tumors from two different donors exposed to allogeneic (top and bottom) and autologous (middle) Hu-BLT immune reconstitution. Shown as mean \pm SEM, n= number of tumors, 2 tumors per mouse. (B) Tumor rejection assessment at sacrifice for each condition presented in (A). TE = Tumor elimination, TGI = tumor growth inhibition showing Auto-BLT to be less proficient at rejecting tumors than Allo-BLT. (C) tSNE dimensional-reduction plots of human blood (Left) or tumor infiltrating immune cells (hTIIC, right) for Allo-BLT (top) and Auto-BLT (bottom) flow cytometry samples. All immune cells are from the same donor. (D) Population annotation of human immune populations in BLT-humanized mice. Combined results and population annotation from panel (C) (top) and expression of exhaustion markers PD-1 and Tim3 (bottom left and center) and Treg-associated marker CD25 (bottom right). All these markers are enriched in hTIIC samples. (E) quantification of effector populations (top row) in blood and hTIIC samples of Auto-BLT (grey bars, full circles) and Allo-BLT (empty bars and circles) samples. Enrichment of CD8⁺ cells and concomitant decrease in hCD4⁺ T cells in Auto-BLT was observed. Quantification of immunosuppressive Treg (bottom far left) and dysfunctional T cells (bottom center-left), and expression levels of PD-1 (bottom center-right) and Tim3 (bottom far right). No significant variation between immunosuppressive and dysfunction markers between Auto- and Allo-BLT samples was observed.

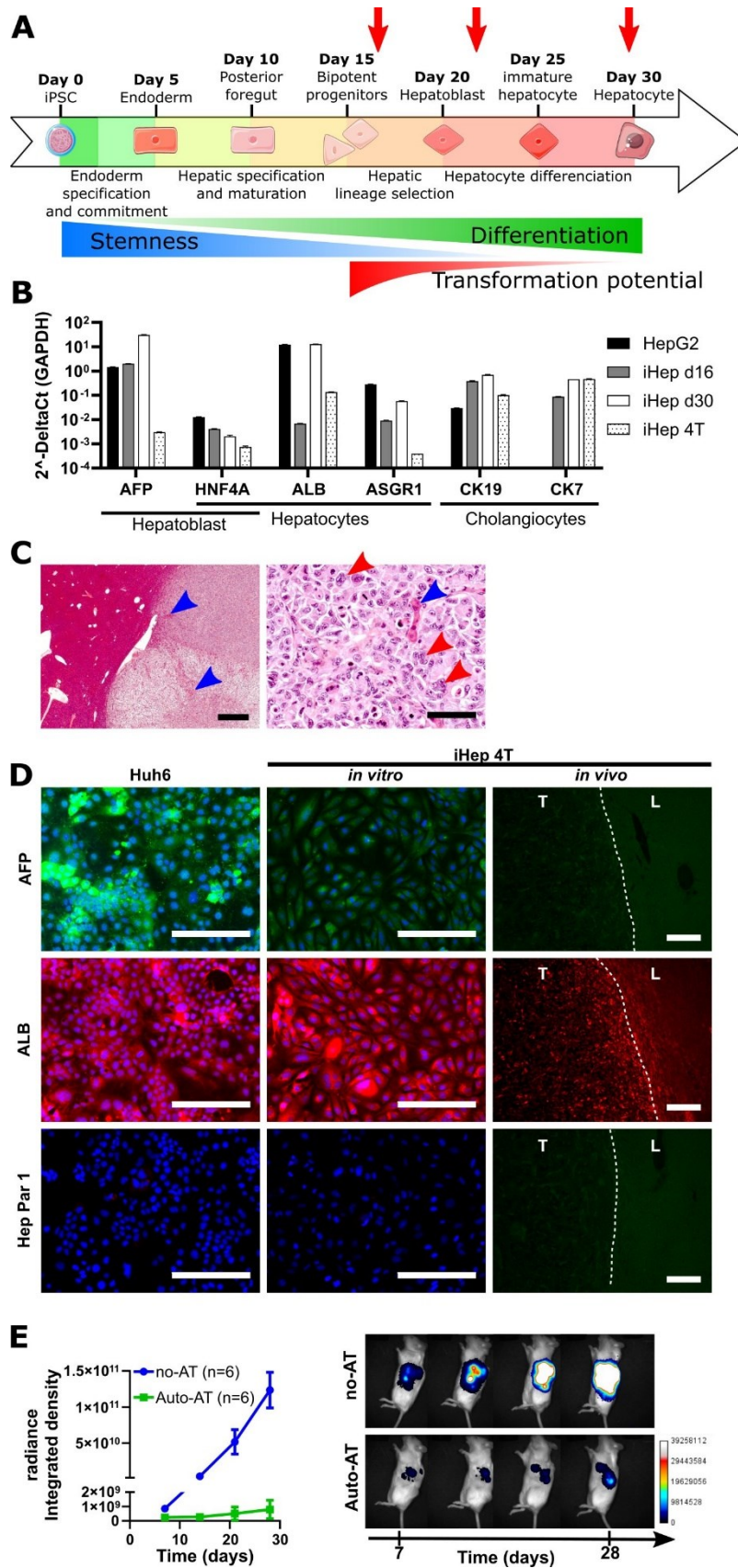


Figure 4. Generation of iPSC-derived hepatic tumors

Fig. 4. iPSC-derived hepatic tumors are recognized in Auto-AT mice. (A) Schematic of the iPSC differentiation protocol used to generate hepatic-like cells (iHep). Red arrows indicate timepoints for initiation of cellular transformation by SV40ER transduction. (B) RT-qPCR gene expression analysis for HepG2, untransformed iHep at days 16 and 30 of differentiation and 4T transformed iHep. AFP = Alpha fetoprotein, HNF4A = Hepatic nuclear factor 4 alpha, ALB = albumin, ASGR1 = asialoglycoprotein receptor 1, CK19 = cytokeratin 19, CK7 cytokeratin 7. (C) Histology of an iHep 4T tumor at low and high magnifications of hematoxylin eosin saffron (HES) staining. High magnification (left) shows border of well-circumscribed tumor with entrapped liver parenchyma (blue arrowheads) and varying tumor density. High magnification photomicrograph (right) again shows parenchymal entrapment (blue arrowheads), polynucleated cells (red arrowheads), numerous mitoses, hyperchromatic nuclei, and generally highly pleomorphic cells and nuclei. (D) Immunofluorescent staining for AFP, ALB and Hepatocyte paraffin 1 antibody (Hep Par 1) of HuH6 hepatoblastoma cell line *in vitro* and iHep 4T cell line *in vitro* and *in vivo*. Huh6 are positive for AFP and ALB but negative for Hep Par 1. *In vitro* iHep 4T are weakly positive for AFP, negative for Hep Par1 and positive for ALB and *in vivo* iHep 4T are negative for AFP and Hep Par 1 and weakly positive for ALB. Tumor (T) and liver parenchyma (L) separated by dotted line (right). (E) Mean \pm SEM of *in vivo* iHep 4T tumor elimination by Auto-AT. Integrated density of intrahepatic tumor-associated luciferase signal (left) and representative longitudinal *in vivo* bioluminescence (right). Scale bar in C, left = 1 mm and center = 100 μ m. All other scale bars = 200 μ m.

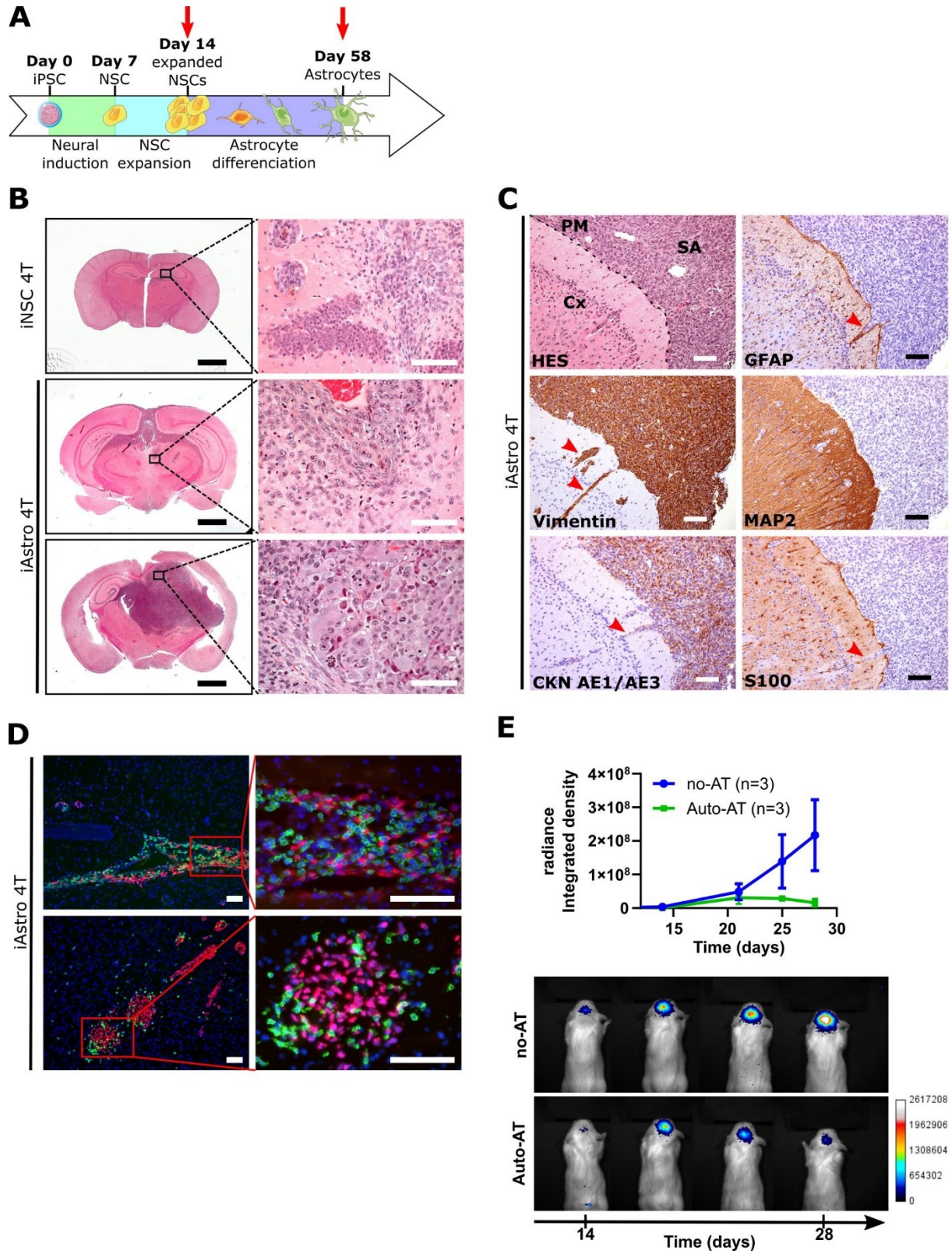


Figure 5. Generation of iPSC-derived CNS tumors.

Fig. 5. iPSC-derived central nervous system tumors are eliminated in Auto-AT mice.

(A) Schematic of iPSC differentiation approach for the generation of neural stem cell (NSC) and astrocytic cell populations. Red arrows indicate populations transformed using the 4T approach. (B) Histology of one iNSC 4T tumor (top) and two representative iAstro-derived tumors (middle and bottom). High magnification photomicrographs on right show poorly differentiated tumor cells with brisk mitotic activity with little (top) or more conspicuous (middle) diffuse infiltration, or epithelioid/giant cell differentiation (bottom). (C) Subarachnoid focus of a representative iAstro 4T tumor (same as in B, middle panels) stained with hematoxylin eosin saffron (HES), vimentin, cytokeratin AE1/AE3, glial fibrillary acidic protein (GFAP), microtubule-associated protein 2 (MAP2) and S100 protein, showing tumor cell immunoreactivity for vimentin and cytokeratin, and negative staining for GFAP, MAP2 and S100. Dotted line represents pia mater (PM) with cortex on the left (Cx) and tumor-invaded subarachnoid space (SA), and red arrowheads indicate tumor-infiltrated Virchow-Robin spaces. (D) Human immune infiltrate identification within tumor samples iAstro 4T tumors at day 29 post tumor and Auto-AT showing human immune infiltrate specifically within tumors. Red = SV40 Large T, Green = hCD45, Blue = DAPI. (E) Mean \pm SEM graph of *in vivo* luciferase signal quantification of iAstro 4T tumors with and without Auto-AT (top) with sample images of longitudinal *in vivo* luciferase imaging (bottom). Scale bar in B, left = 2 mm, all other scale bars = 100 μ m.

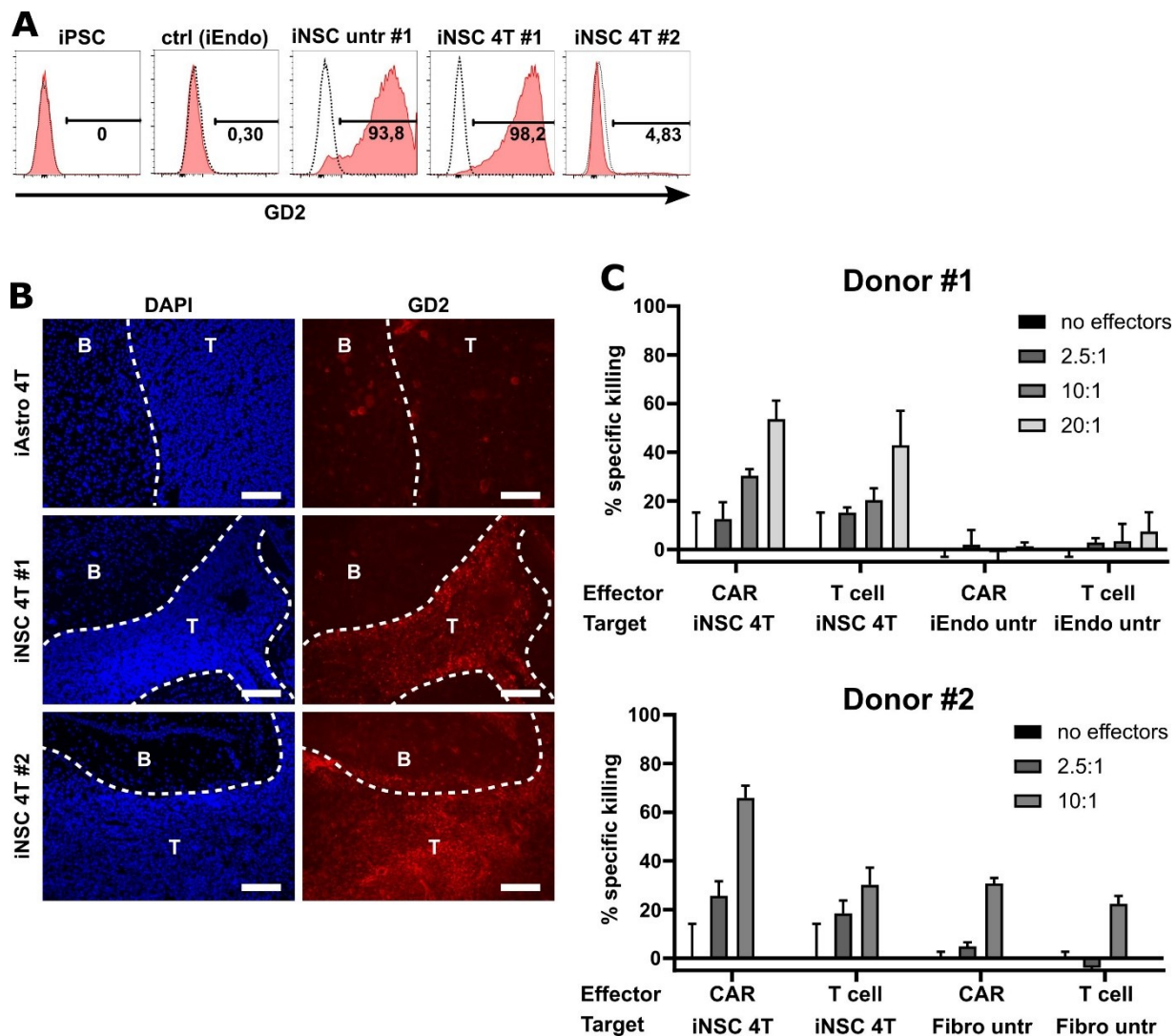


Figure 6. Expression of the tumor specific antigen GD2 by iNSC tumor cells is not predictive of autologous anti-GD2 CAR T cells efficacy *in vitro*.

Figure 6. Expression of the tumor specific antigen GD2 by iNSC tumor cells is not predictive of autologous anti-GD2 CAR T cells efficacy *in vitro* (A) Flow cytometric assessment of GD2 expression in different steps of iPSC differentiation and transformation showing specific expression of GD2 in normal and transformed iNSC for donor #1 and very low expression in iNSC 4T from donor #2. (B) Immunofluorescent staining of *in vivo* iAstro (top) and iNSC tumors showing no expression of GD2 in iAstro 4T tumor (top) and specific expression of GD2 in iNSC tumors (T) from both donors #1 (center) and #2 (bottom). Blue = DAPI counterstain, red = GD2, dotted line = tumor edge, B = brain parenchyma, T = tumor tissue. (C) 24h cytotoxicity assays with 3 (donor #1, top) or 2 (donor #2) T cell:target ratios. For CAR effectors, T cells with 20% and 16% CAR⁺ cells respectively for donors #1 and #2 were used. All conditions are autologous and expressed as triplicate mean \pm SD of %live target cell loss versus no effector control average.

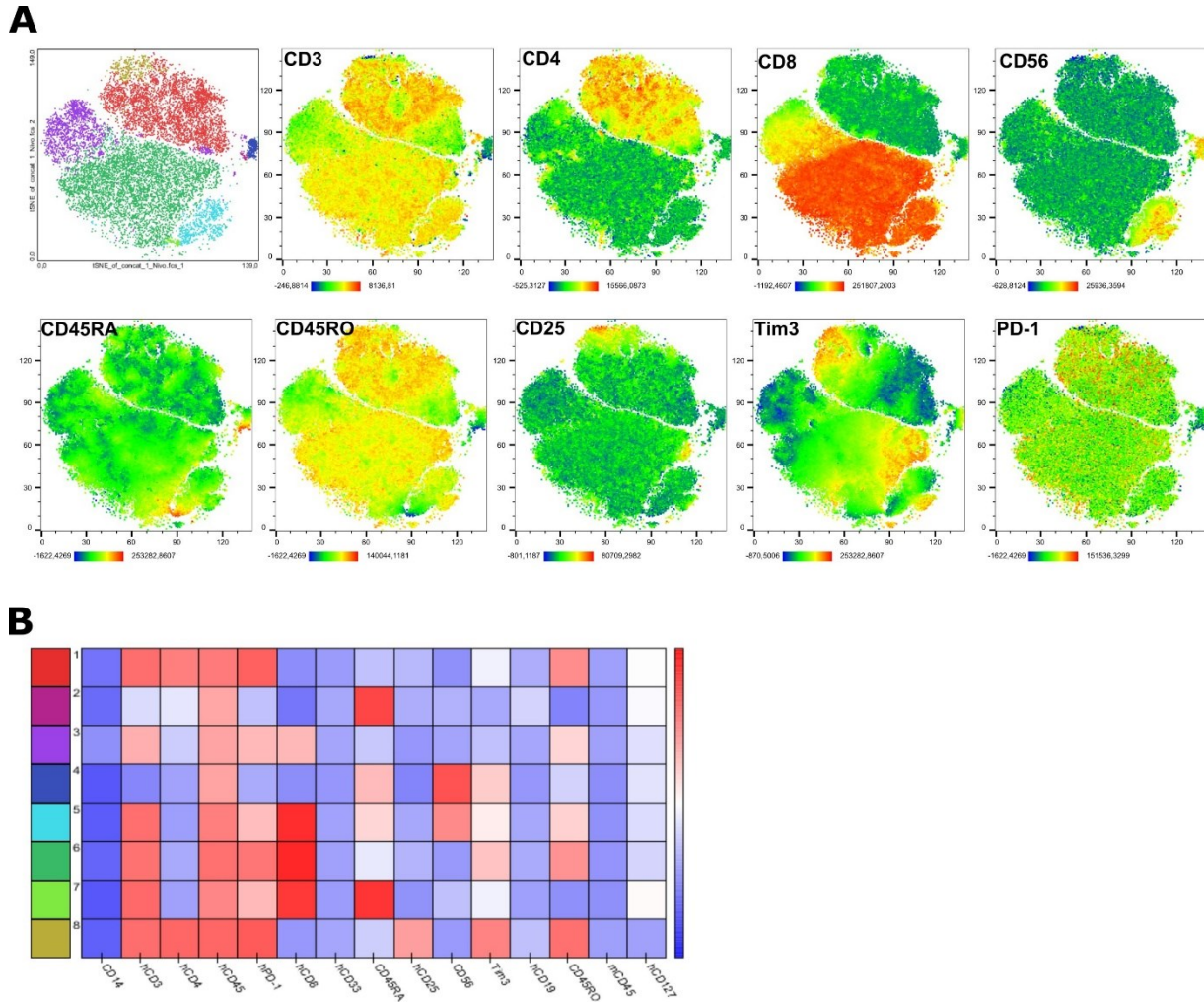


Fig S1. Human immune population clustering and gene expression in Auto-AT \pm Nivolumab mice blood and tumors. (A) tSNE dimensional reduction plots of human immune compartment of Auto-AT mice blood and tumors showing unbiased cluster identification (top leftmost) and flow cytometry protein detection heatmaps. (B) Cluster protein expression heatmap for reference clusters in (A) top leftmost panel.

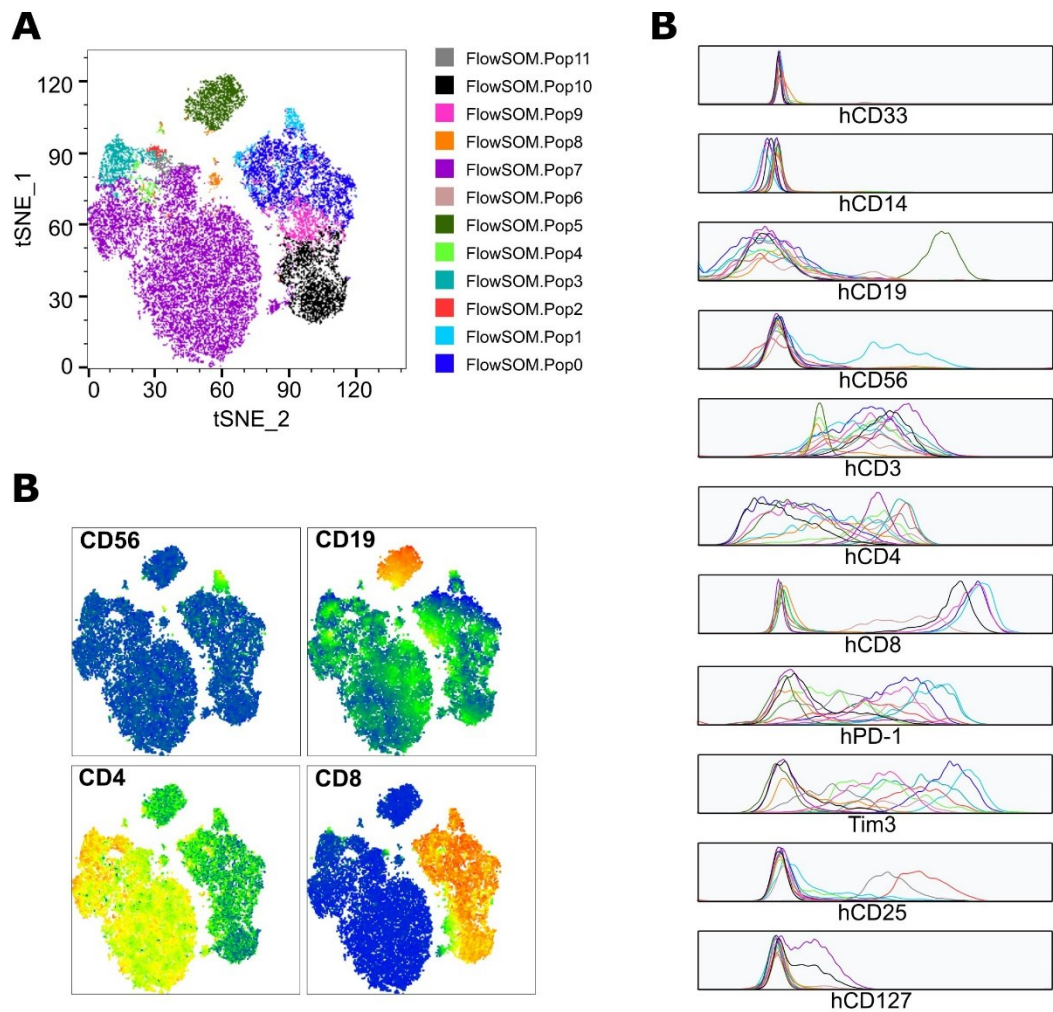


Fig S2. Auto-BLT human immune cell clustering. (A) tSNE dimensional reduction plot with cluster annotation as obtained by FlowSOM unsupervised clustering tool in FlowJo. (B) Detailed fluorescence histograms for differential gene expression of individual clusters. (C) Gene expression heatmap for principal cell population clusters.

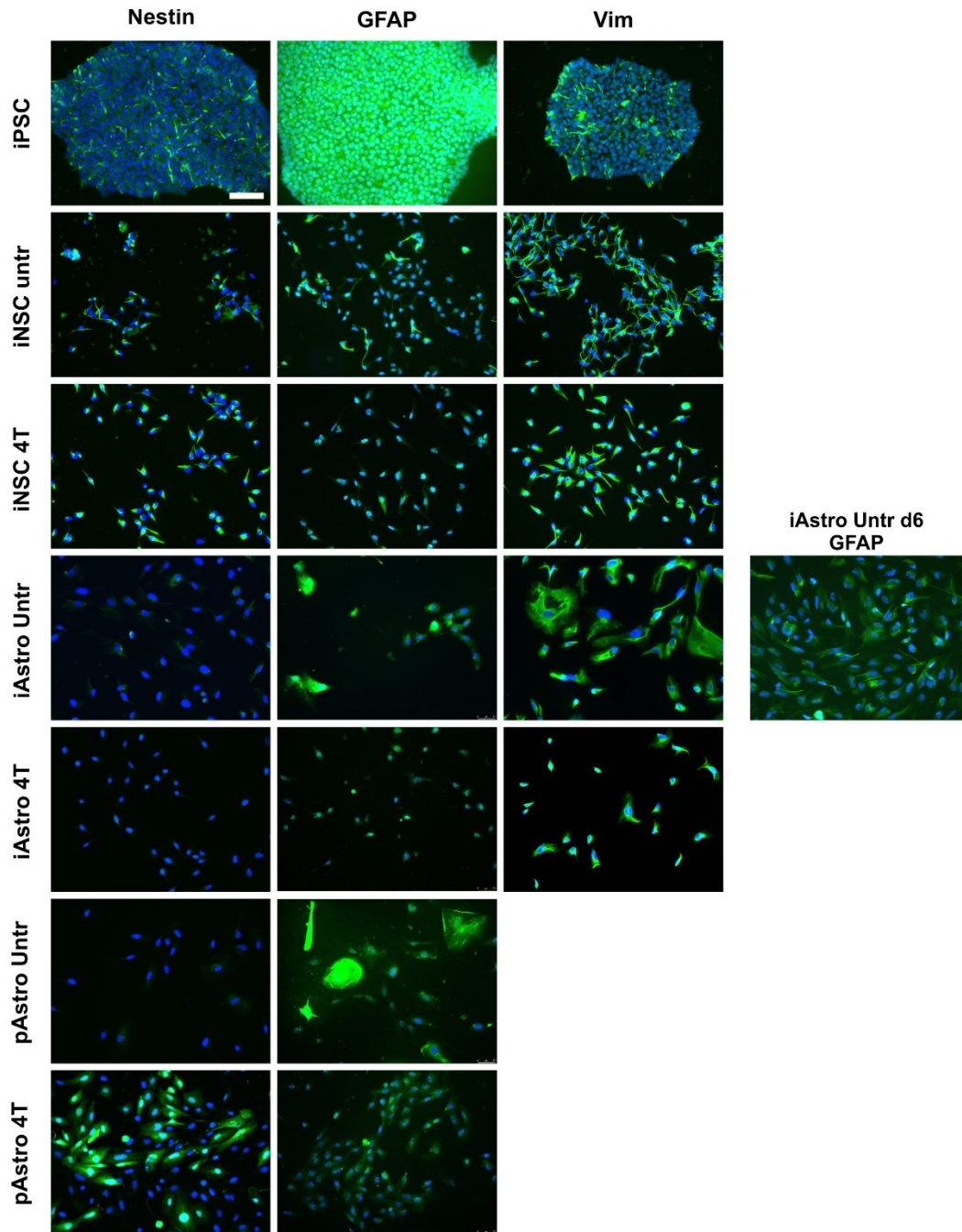


Fig S3. iPSC astrocytic differentiation molecular characterization. Immunofluorescent staining for nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin in multiple cell populations. Identical acquisition parameters were employed for each staining in all samples. Note the absence of NSC-associated nestin in Astro populations except, curiously for pAstro 4T. GFAP expression in iPSC population is unexpected. iNSC GFAP signal possibly attributable to spontaneous differentiation and general decrease of GFAP expression in 4T cell lines is observed. Vimentin is strongly expressed by all populations upon differentiation and is maintained after 4T transformation. iNSC = iPSC-derived NSC, iAstro = iPSC-derived astrocytes, pAstro = primary astrocytes. Scale bar = 200 μ m

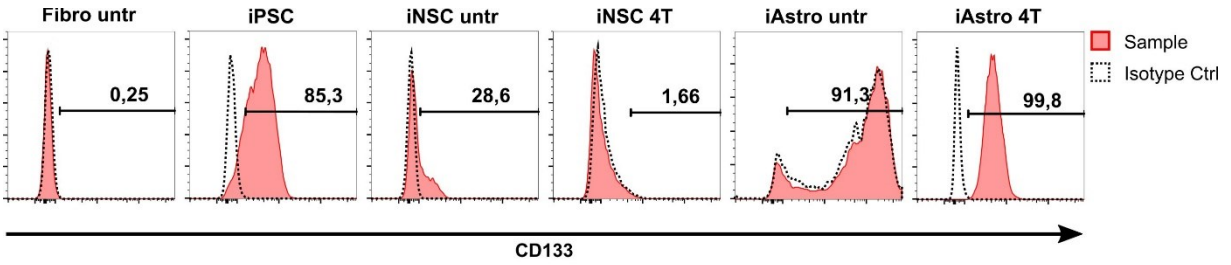


Fig S4. CD133 expression in iPSC-derived astrocytic lineages. Glioblastoma cancer stem cell marker CD133 expression assayed by flow cytometry against CD133/1 epitope. no significant expression detected in primary fibroblasts from original donor (Fibro untr), transformed iNSC or untransformed iAstro. a low-expressing subpopulation was observed in untransformed iNSC and a strong expression was observed in iPSC and transformed iAstro. Red = anti-CD133 staining, dotted line = isotype control.

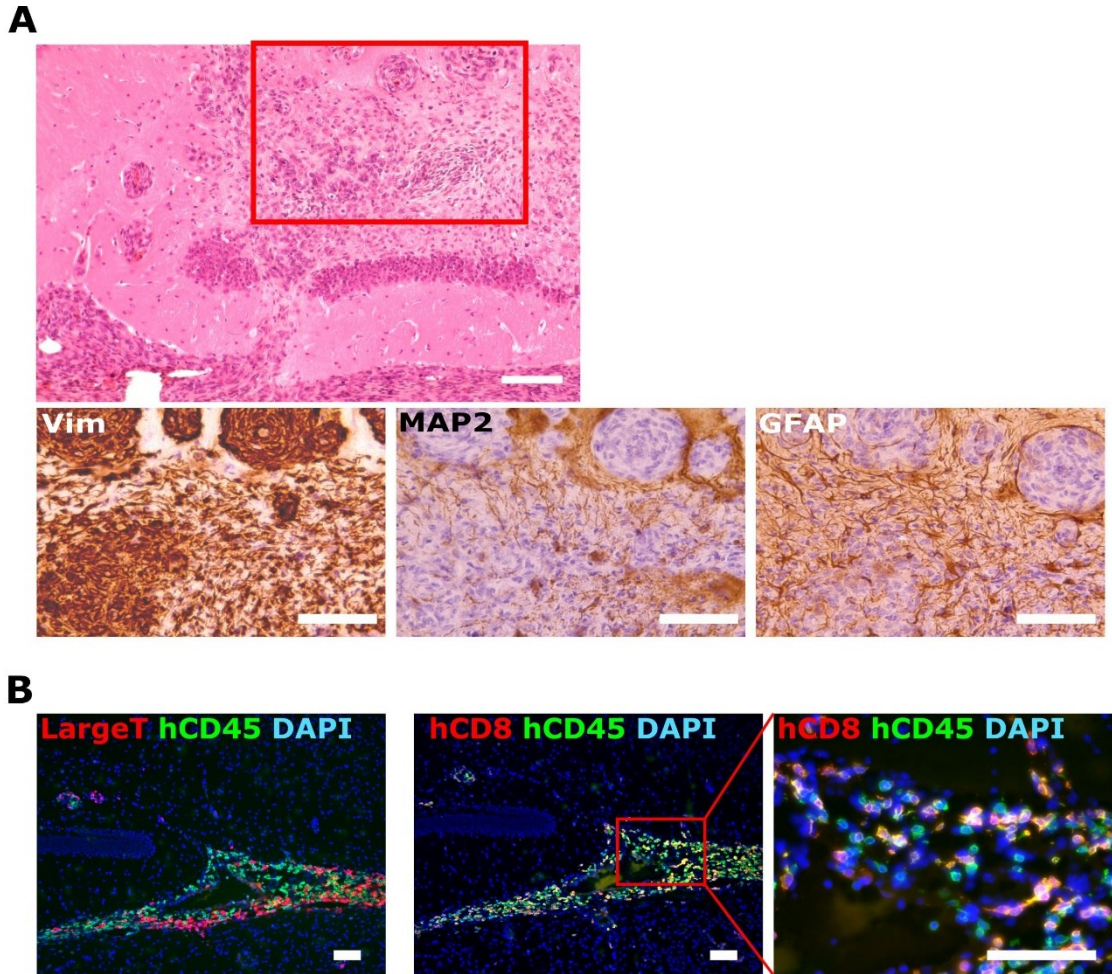


Fig S5. iNSC 4T in vivo phenotype. (A) Representative photomicrograph of iNSC 4T tumor in vivo showing tumor growth near the dentate gyrus (top) and high magnification of Vimentin, MAP2 and GFAP immunostainings (bottom). red rectangle = high magnification region. (B) Immunofluorescent staining of tumor infiltration showing specific accumulation of hCD45 (green) cells within tumor masses (left, red) with a high proportion of CD8 positive T cells (middle and right, red). Scale bars = 100 μ m

SUPPLEMENTARY DATA

Table1. Flow cytometry antibodies for immune characterization.

Target	Fluorochrome	Clone	Provider	Cat. No.
mCD45	PE-Cy7	30-F11	BD Biosciences	552848
hCD45	BUV395	HI30	BD Biosciences	563792
hCD19	PE-CF594	2H7	BD Biosciences	562322
hCD3	AF700-BD	SP34-2	BD Biosciences	557917
hCD4	BB515	RPA-T4	BD Biosciences	564419
hCD8	BV421	RAP-T8	BD Biosciences	562428
hCD33	BV510	P67.6	Biolegend	366610
hCD14	APC-H7	M ϕ P9	BD Biosciences	560180
hCD56	BV786	NCAM16.2	BD Biosciences	564058
hCD25	BV711	M-A251	Biolegend	356138
hCD127	BB700	HIL-7R-M21	BD Biosciences	566399
hPD-1	BUV737	EH12,1	BD Biosciences	565299
Tim-3	PE	7D3	BD Biosciences	565570
CD45RA	BV650	HI100	BD Biosciences	563963
CD45RO	PE-Cy5	UCHL1	BD Biosciences	561888

2.1.1 Compléments au premier article

L'article présenté plus haut étant toujours en préparation, certains aspects demeurent à compléter en prévision de la soumission finale. Au niveau expérimental, certains volets sont en cours de validation pour confirmer les résultats présentés précédemment. D'abord, nous répétons présentement le processus de différenciation hépatocytaire ainsi que la caractérisation des tumeurs iHep 4T. Une nouvelle tentative de transformation tardive des cellules iHep sera menée afin de valider que le potentiel de transformation tumorale des cellules quiescentes est inefficace comparativement aux cellules progénitrices. Les expériences de rejet immunitaire par transfert adoptif autologue et la validation moléculaire et histologique des nouvelles tumeurs sera aussi faite.

L'expérience de Nivolumab n'ayant pas démontré d'effet significatif sur la croissance de tumeurs fibroblastiques, nous avons validé l'expression de PD-L1 dans ces tumeurs afin de déterminer la susceptibilité à ce type de traitement. Les tumeurs étant positives par immunohistochimie, nous avons pu conclure que ce traitement n'était pas suffisant pour potentialiser la réponse anti-tumorale. Nous tenterons de répéter cette approche avec d'autres tumeurs afin de comparer leur sensibilité au Nivolumab, notamment à l'aide des tumeurs iHep 4T

Finalement, l'essai de cytotoxicité des CAR anti-GD2 contre les iNSC 4T sera aussi répété afin d'avoir un meilleur taux de transduction des lymphocytes T pour l'expression du CAR permettant d'utiliser un nombre plus faible de cellules effectrices, ce qui devrait diminuer le bruit de fond et vérifier l'efficacité de la réponse CAR versus la réponse T. Aussi, les contrôles n'exprimant pas GD2 (iEndo untr dans un cas, fibroblastes primaires dans l'autre) seront harmonisés (iEndo untr pour les 2 donneurs) et validés de nouveau. Une nouvelle différenciation et transformation des NPC sera aussi faite afin de valider le phénotype d'expression variable de GD2 entre les donneurs et les clones.

Une fois ces expériences complétées, l'article sera dans un premier temps soumis au périodique *Cancer Discovery*.

2.2 Deuxième article : impact des MSC sur la croissance tumorale

Moquin-Beaudry G., Colas C., Li Y., Bazin R., Guimond J. V., Haddad E., and Beauséjour C. (2019) The tumor immune response is not compromised by mesenchymal stromal cells in humanized mice.

Article original publié dans *The Journal of Immunology* le 15 novembre 2019

À la suite de la description des modèles générés avec notre approche et de certaines applications potentielles dans l'article précédent, nous avons tenté d'appliquer cette méthodologie pour investiguer l'impact des MSC sur la croissance tumorale dans un contexte immunitaire humain autologue. Dans cette étude publiée dans le périodique *Journal of Immunology*, nous utilisons les modèles d'humanisation immunitaire par transfert adoptif et par approche BLT autologues ou allogéniques à des tumeurs dérivées de fibroblastes primaires. Nous tentons d'évaluer si les MSC ont un impact sur la croissance tumorale en absence ou en présence d'un système immunitaire ainsi que d'établir si leurs propriétés immunomodulatrices affectent l'infiltrat tumoral de façon significative. Ces travaux permettent de déterminer si les MSC issus de cordon ombilical à usage thérapeutique sont risqués pour l'émergence ou la progression de foyers pré-tumoraux de nature fibroblastique via leur potentiel immunomodulateur. Il s'agit d'une première démonstration d'une évaluation du potentiel pro- ou anti-tumoral de MSC en présence d'un système immunitaire humain.

THE TUMOR IMMUNE RESPONSE IS NOT COMPROMISED BY MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN HUMANIZED MICE

Gaël Moquin-Beaudry^{1,2}, Chloé Colas¹, Yuanyi Li¹, Renée Bazin³, Jean V. Guimond⁴, Elie Haddad^{1,5}, and Christian Beauséjour^{1,2*}

¹ Centre de recherche du CHU Ste-Justine

² Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal

³ Direction de l'Innovation, Affaires Médicales et Innovation, Héma-Québec

⁴ CIUSSS du Centre-Sud-de-l'Ile-de-Montréal, Québec, Canada

⁵ Département de pédiatrie, Département de microbiologie, immunologie et infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal

* Correspondence:

Christian Beauséjour PhD

CHU Ste-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine

Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

(Phone) 514-345-4931 x4385

e-mail: c.beausejour@umontreal.ca

Running head: The impact of MSCs on tumor growth

DOI : 10.4049/jimmunol.1900807

ABSTRACT

Therapeutic uses of mesenchymal stromal cells (MSCs) have emerged over the past decade. Yet, their effect on tumor growth remains highly debated, particularly in an immune competent environment. Here, we wanted to investigate the impact of human umbilical cord MSCs (hUC-MSCs) on tumor growth in humanized mice generated by the adoptive transfer of peripheral blood mononuclear cells (Hu-AT) or the co-transplantation of hematopoietic stem cells and human thymic tissue (Hu-BLT). Our results showed that the growth and immune rejection of engineered human fibroblastic tumors was not altered by the injection of hUC-MSCs in immune-deficient or humanized mice respectively. This was observed whether tumor cells were injected subcutaneously or intravenously and independently of the injection route of the hUC-MSCs. Moreover, only in Hu-BLT mice did hUC-MSCs have some effects on the tumor immune infiltrate, yet without altering tumor growth. These results demonstrate that hUC-MSCs do not promote fibroblastic tumor growth and neither do they prevent tumor infiltration and rejection by immune cells in humanized mice.

164 words

Key words: MSCs, humanized mice, cord blood, adoptive transfer, tumor

Key points

1. Engineered fibroblastic tumors are efficiently recognized in humanized mice.
2. hUC-MSCs have a negligible impact on the tumor immune infiltrate and growth.
3. hUC-MSCs have no effect independently of the injection site.

INTRODUCTION

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have emerged as interesting therapeutic tools for a number of ailments such as acute graft-versus-host-disease (GVHD) (1-3), diabetes (4), organ transplant (5), inflammatory(6), cardiovascular(7) and bone and cartilage diseases (8-10) among many others (11), which have led to over 600 completed or active clinical trials as of April 2019 according to the U.S. National Institute of Health (clinicaltrials.gov). However, despite clear guidelines provided by the International Society for Cellular Therapy for the characterization of MSCs (12), the breadth of isolation approaches and cell sources of these heterogeneous cells have led to confusing reports in the literature on the biological properties of MSCs.

Umbilical cord Warton's Jelly has been identified as an excellent source of MSCs (hUC-MSCs) both from a logistical and a functional standpoint (13-16). The simple, non-invasive harvesting procedure, the high proliferation potential (17-19), the high stemness (17, 20, 21) and the inability to transform into tumor-associated fibroblasts in vitro (22) make hUC-MSCs excellent candidates for off-the-shelf allogeneic cell therapies. hUC-MSCs have been demonstrated to be effective for wound healing, inflammation and disease management both in pre-clinical and clinical settings (3, 23-26). The proposed mechanisms linked to these beneficial physiological effects implicate the ability of MSCs to home to sites of inflammation (27), deploy a strong immunomodulatory phenotype (13, 14, 28), have low intrinsic immunogenicity (low HLA-I, absence of HLA-DR, CD80 and CD86 costimulatory molecules) (29) and a capacity to promote tissue repair mostly via paracrine mechanisms (30). Indeed, MSCs have been shown to secrete a multitude of soluble factors that contribute to their immunosuppressive capacities, such as lactate, indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase, prostaglandin E2, nitrous oxide, transforming growth factor β 1, hepatocyte growth factor and interleukin 10 among others (31, 32). These factors along with cell-to-cell contact mechanisms have been shown to inhibit the proliferation, maturation and function of B cells, T cells, NK cells, macrophages and dendritic cells and to regulate the function of regulatory T cells (33-38). While these features can be desirable therapeutic tools, most have been associated to cancer development. Indeed, all aforementioned soluble factors have independent pro-tumoral properties (39-45) and demonstrated to contribute to the formation of an immunosuppressive microenvironment fueling cancer incidence and growth (46, 47).

However, debate is still on regarding the impact of MSCs on tumor growth. Many studies have shown pro-tumoral effects while just as many have demonstrated the opposite (48, 49). The unavailability of good humanized animal models allowing to study the interaction between a human tumor and autologous immune cells has prevented researchers from measuring the potential impact of MSCs on tumor growth through alterations of the immune response. This should be a major concern considering the known immunomodulatory properties of MSCs. Hence, using two distinct humanized mouse models that combine genetically defined immune-naïve tumors with autologous or allogeneic immune humanization of immunodeficient mice, we here demonstrate that the injection of hUC-MSCs has negligible effect on cancer cell growth and immune rejection of primary fibroblast-derived tumors.

RESULTS

The injection of hUC-MSCs does not affect the growth of subcutaneous fibroblastic tumors in Hu-AT mice

To evaluate if the immunomodulatory effect of hUC-MSCs has an impact on tumor growth, we first developed a humanized mouse model combining tumorigenic conversion of dermal fibroblasts derived from a healthy donor and adoptive transfer of white blood cells (WBCs) collected from the same (Auto-AT) or a different (Allo-AT) donor (Fig. 1A and S1). We generated engineered tumors for two reasons. First, to measure the impact of MSCs on tumor rejection in an autologous environment, and second to avoid working with patient-derived cell lines whose acquired immune resistance mechanisms could have interfered with the effect of MSCs. In brief, AT of 1×10^7 WBC was done the day before mice received subcutaneous (s.c.) injection of 5×10^5 tumor cells and the first of two intraperitoneal (i.p.) injection of 2.5×10^6 hUC-MSCs (on day 0 and 17, see Fig. 1B). Their capacity to inhibit the proliferation of activated T cells *in vitro* is shown in Fig. S3A. Moreover, *in vivo* imaging confirmed that roughly one third of NIR790-labelled hUC-MSCs persisted for over 24 days following their i.p. injection in NSG-SGM3 mice (Fig. S3B). Using this model, we observed that tumor growth was delayed by both allogenic and autologous immune cells (Fig. 1C, 1D), but that hUC-MSCs did not have an

impact on tumor growth (Fig. 1C-1E). Tumor size, either expressed in volume (mm^3) or by fluorescence integrated intensity was not significantly changed at the time of sacrifice (Fig. 1F). Moreover, the proportion of mice receiving hUC-MSCs that had completely or partially eliminated tumors was comparable to that of non-injected mice (Fig. 1G). Using flow cytometry and immunofluorescence we also analyzed immune cells infiltration in partially rejected tumors available at the time of sacrifice (Fig. 1H and 1I). While we found that all tumors were massively infiltrated by immune cells, no statistical difference was found in the tumor immune infiltrate (CD45, CD3, CD8) in mice injected or not with hUC-MSCs.

The injection of hUC-MSCs does not affect the growth of metastatic-like tumors in Hu-AT mice

Our observation that the i.p. injection of hUC-MSCs had no effect on the growth of s.c. tumors led us to hypothesized that a greater proximity, and perhaps cell contact, between tumors and hUC-MSCs might be necessary to impact tumor growth. To address this question, we used a metastatic-like model whereby tumor cells (1×10^6) are first injected i.v. to colonize the lungs and liver. Within 24h, 1×10^6 hUC-MSCs were then injected i.v. alongside the i.p. injection of 1×10^7 autologous WBCs. Using fluorescence *in vivo* imaging we confirmed that more than half of the hUC-MSCs persisted over 21 days following their i.v. injection in NSG-SGM3 mice and that cells were mostly localized in the lungs and liver (Fig. S3C). Tumor burden was monitored over time by *in vivo* imaging and no significant variation in growth was detected between groups that received hUC-MSCs or not (Fig. 2A-C). Moreover, the injection of hUC-MSCs did not interfere with the ability of autologous immune cells to prevent/delay tumor growth in Auto-AT groups (Fig. 2A-C). When fluorescence signal intensity between lungs and liver was analyzed individually, we observed a greater reduction in tumor-associated fluorescence in lung compared to liver suggesting the AT of WBCs is more efficient at preventing or rejecting lung tumors (Fig. 2C), but this effect was also unimpaired by hUC-MSCs. Upon sacrifice of mice, these results were confirmed by the indirect quantification of tumor burden by measuring lungs and liver masses (weight and weight-to-body-weight ratio) of mice with and without auto-AT (Fig. 2D). Of note, simultaneous fluorescence imaging of tumor masses (mPlum) and labelled-

hUC-MSCs confirmed that hUC-MSCs were mostly excluded from the tumor core despite their close vicinity (Fig. S3D).

Human immune landscape of metastatic-like tumors is unchanged by hUC-MSCs in Hu-AT mice

To better assess whether hUC-MSCs altered the human immune landscape in mice, a 13-color flow cytometry panel was designed to characterize the circulating and tumor-infiltrating human immune populations. Manual gating of t-distributed stochastic embedding (tSNE) dimensionality reduction plots of total human CD45⁺ cells allowed the identification of two major T cell populations as shown by most cells expressing CD3 and CD4 or CD8 (Fig. 3A and C). The FlowSOM unsupervised clustering algorithm allowed for the automatic identification of 10 metaclusters based on expression of cell surface marker (Fig 3A). While a clear distinction between blood and tumor-infiltrating immune cells (TIIC) cluster distribution can be observed, we found no distinction between and within metaclusters in hUC-MSCs-treated animals (Fig. 3B). Further analysis revealed an enrichment in tumor infiltrating compared to circulating CD3⁺CD4⁺PD-1^{hi}Tim3^{hi} dysfunctional CD4 T cells (FlowSOM.pop2 red cluster, Fig. 3B and 3C), CD3⁺CD8⁺hPD-1^{hi}Tim3^{hi} dysfunctional CD8 T cells (outer sections of FlowSOM.pop0 blue cluster, Fig. 3B and 3C) and CD3⁺CD4⁺hCD25⁺CD127⁻ regulatory T cells (outer rim of FlowSOM.pop2 red cluster, Fig. 3B and 3C). Of note, is the near complete absence of CD56⁺ clusters (FlowSOM.pop5, 8 dark green and teal clusters, Fig. 3B and 3C) in TIIC. Quantification also showed that hUC-MSCs induced no significant increase in the proportion of circulating CD4 or CD8 T cell subpopulations in blood or TIICs (Fig. 3D). However, we observed a marked increase in the proportion of T regulatory cells in TIICs compared to blood regardless of the injection of hUC-MSCs (Fig. 3D). The proportion of dysfunctional T cells (CD3⁺hPD-1⁺Tim3⁺) was also unchanged following the injection of hUC-MSCs in both blood and TIICs with no bias towards either CD4 or CD8 (Fig. 3D and data not shown). However, PD-1 and Tim3 expression levels on CD3⁺ cells were higher in tumors than in blood, with or without the presence of hUC-MSCs (Fig. 3D). Overall these results demonstrate that the immune cells landscape is greatly altered by the tumor environment but not by the injections of hUC-MSCs.

The injection of hUC-MSCs does not affect the growth of tumors in Hu-BLT mice

To confirm the results obtained in Hu-AT mice, we next setup a distinct humanized tumor-immune model by using Hu-BLT mice which allows for a robust, diversified and continuous renewing of functionally mature T cells compared to what is observed following AT (56, 57). Briefly, Hu-BLT mice were generated by the co-transplantation of human fetal liver hematopoietic stem cells along with autologous fetal thymus tissue in NSG mice (Fig.4A). Using this model, we prepared tumorigenic cell lines from fetal skin fibroblasts derived from two healthy donors (herein referred as tumor A and B, see Fig.4A). Of note, despite using the same set of defined oncogenes to generate these two cell lines, resulting tumors had different *in vivo* phenotypes suggesting cells were further transformed during *in vitro* expansion. We first observed that following the s.c. injection of 5×10^5 cells, tumor A had a slow growth rate, as determined by *in vivo* imaging using fluorescence integrated density, and was eliminated in Hu-BLT mice (Fig. 4B). On the other hand, tumor B showed a faster growth rate and was not fully rejected despite being massively infiltrated by human immune cells (Fig. 4C and Fig. 5). Independently of the donor, the i.p. injection of 2.5 million hUC-MSCs (on day 0 and 14 after tumor inoculation) had no significant effect on tumor growth and the immune-rejection rate (Fig 4B and 4C). These results were confirmed by the direct quantification of tumor masses at the time of sacrifice (Fig. 4D). Similarly, the proportion of mice that had completely or partially eliminated tumors in Hu-BLT mice was unchanged by the injection of hUC-MSCs and this for both tumors (Fig. 4E). Overall, our results in Hu-BLT mice confirm our observations in Hu-AT mice and again suggest the injection of hUC-MSCs does not promote tumor growth nor does it interfere with their immune rejection.

Human immune landscape of tumors in Hu-BLT mice

To assess whether hUC-MSCs altered the human immune landscape in Hu-BLT mice, we used our 13-color cytometry panel combined with tSNE analysis to identify critical populations variations in blood or TIICs. Hu-BLT mice allowed for the identification of a third defined cell cluster (B cells) in addition to the CD4 and CD8 T cells clusters, which were the only ones

present in Hu-AT models (see Fig. 3A and 5A). At time of sacrifice (15 weeks post immune reconstitution), no CD33⁺, CD14⁺ or CD56⁺ populations were detected in Hu-BLT mice (Data not shown). Cell distribution between blood and TIICs was different as shown by the near absence of B cells in tumor samples and variations in the distribution of T cell populations (Fig. 5B). For example, we observed an enrichment in the dysfunction markers PD-1 and Tim3, an increase of CD25 and a reduction of CD127 in TIICs (Fig.5B and C). Moreover, while the distribution of immune cells was mostly unaffected by the injection of hUC-MSCs in blood, we observed some significant variations in TIICs (Fig. 5B, 5D and S6B). For instance, a significant increase in the proportion of CD8⁺ T cells, but not CD4⁺ T cells, was observed within TIICs in the presence of hUC-MSCs (Fig. 5D). Similarly, regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) were significantly decreased within TIICs in the presence of hUC-MSCs (Fig. 5D). Finally, while the proportion of dysfunctional T cells (CD3⁺PD-1⁺Tim3⁺) was higher in TIICs than in peripheral blood, the injection of hUC-MSCs had no impact on this population (Fig. 5D). However, we observed that mice injected with hUC-MSC exhibited a significant increase in PD-1 and Tim3 expression in the hCD3⁺ compartment, a phenotype that was mostly observed in CD4 T cells (Fig. 5D and data not shown). Overall these results demonstrate that the immune cells landscape is somewhat altered by the injections of hUC-MSCs in Hu-BLT mice.

DISCUSSION

The effect of MSCs on tumor growth has not reached a consensus with many studies showing contradictory results (48). In fact, in most cases where MSCs were shown to promote human tumor growth, they were co-injected s.c. with tumor cells in an immune-deficient host and thus stimulated growth independently of their immunomodulatory properties. Instead, in a clinical setting, MSCs are likely to be injected in immune competent hosts either locally or systemically. For this reason, we thought it would be more relevant to evaluate the impact MSCs may have on tumor growth when injected at a distinct site from tumors cells and in immune competent mice. To this end, we developed two humanized mouse models (Hu-AT and Hu-BLT) using engineered naïve tumors that we showed are infiltrated and either totally or partially rejected by autologous or allogenic immune cells. We speculate some tumors were not fully

rejected because of their growth kinetic, with the fast-growing tumors being more resistant (Fig 4B and C). While this remains to be demonstrated, differences in tumor growth rate may indicate that secondary mutations have occurred during the *in vitro* expansion period, leading to the emergence of more resistant tumor cell subpopulations. Of note, in our Hu-AT mouse model we observed better immunological clearance of lung compared to liver metastatic tumors. The reason for this is unknown but could be the result of more immune cells reaching the lungs early after their injection.

One advantage of our humanized autologous tumor-immune cancer models is that it can be derived easily from any healthy donor cells or tissues. Moreover, we believe our models to be more appropriate than patient-derived xenograft (PDX) to study the immunomodulatory properties of MSCs as PDX tumors were shown to be already resistant to autologous or partially matched immune cells (58, 59). Our model thus allows to study changes in tumor immunogenicity or immune functions in an autologous setting and study mechanisms of immune-editing. Although we have not investigated the landscape of the neoantigens recognized by autologous T cells in our models, it is likely that exogenous neoantigens such as SV40 large and small T, mPlum or luciferase proteins could have fueled an HLA-I-mediated immune response (60). Alternatively, the transformation process may have activated the expression of noncoding regions acting as tumor-specific antigens as recently described (61). While only fibroblastic tumors were used in this study, our model is compatible with the study of tumors from non-mesenchymal origin if, for example, patient-derived fibroblasts were to be dedifferentiated or reprogrammed into epithelial-like cells prior to transformation.

In this study we observed that the injection hUC-MSCs (either *i.p.* or *i.v.*) had no effect on the growth of fibroblastic tumors in both humanized models. Similar results were observed using two different low passage freshly thawed populations of hUC-MSCs (data not shown). This was surprising given the robust *in vitro* immunosuppressive capabilities of both hUC-MSCs lines presented in this study (Fig. S3A). We suspect this effect is due to the already suppressive tumor microenvironment in emerging tumors to which hUC-MSC contribution would be redundant. Indeed, fibroblast-derived tumors could be more immunosuppressive by virtue of their mesenchymal origin. Doses of injected hUC-MSCs is also unlikely to be responsible for these results as the doses used in this study were considerably higher than ones

commonly used clinically (16-83 times higher). Indeed, while patient i.v. dosage typically ranges from $1-2 \times 10^6$ MSCs/kg (1, 62), we used an equivalent of 3 or 8×10^7 hUC-MSCs/kg depending if cells were injected i.p. or i.v. respectively. Surprisingly, hUC-MSCs survived several weeks following their injection in mice (Fig. S3B and C). The reasons for this are unclear but may be related to our analyses being done in NSG-SGM3 mice expressing human cytokines (SCF, GM-CSF and IL-3), which could have promoted the survival of hUC-MSC when compared to non-transgenic NSG mice. Moreover, our non-invasive and highly sensitive labelling approach (NIR 790 dye), which does not require to culture MSCs in vitro prior to their injection, may have extended survival in mice.

In depth analysis of tumor infiltrating cells using flow cytometry and tSNE dimensional reduction plots revealed a marked difference between circulating and TIIC profiles with for example a higher proportion of Tregs and dysfunctional T cells in tumors vs blood both in Hu-AT and Hu-BLT models (Fig. 3D and Fig.5D). Surprisingly, the injection of hUC-MSCs had almost no effect on the tumor immune infiltrate with cluster distribution and population overlap being very similar between groups. However, only in the Hu-BLT model did the injection of hUC-MSC result in an increase in infiltrating CD8 T cell frequency combined with a decrease in the proportion of Tregs (Fig 5D). Such a decrease in Tregs was very surprising given MSCs were previously shown to increase Treg recruitment and function (15, 63-66). However, this decrease was still insufficient to alter the tumor growth profile of hUC-MSC recipients. Similarly, while the injection of hUC-MSCs had no effect on the proportion of dysfunctional T cells, we observed an increase in the expression levels of PD-1 and Tim3 within T cells in Hu-BLT mice (Fig. 5D), although this was attributable to variations in the CD4⁺ and not CD8⁺ compartment (data not shown), suggesting that CD8 T cytotoxic effector cells were globally unaffected by hUC-MSCs. While both mouse models have shown convincing tumor rejection capabilities, differences in the immune cells source and reconstitution are likely responsible for the above described dissimilarities.

One limitation of our mouse models is that not all human immune cells were adequately represented with for examples macrophages, dendritic, NK and myeloid cells being virtually absent. Reconstitution in humanized mice also does not support robust myeloid and NK cell engraftment in absence of human cytokines such as IL-15(67). Despite the injection of both

PBMCs and granulocytes in Hu-AT mice, persistence of immune cell types other than T cells was very low or undetectable at time of sacrifice. While some circulating CD14⁺ monocytes were generally present in Hu-BLT mice, these cells were not detected within tumors.

Overall, our study showed that the injection of hUC-MSCs has a minor impact on the tumor immune landscape with no significant consequences on fibroblastic tumor growth in humanized mouse models. These results suggest that transient therapies using hUC-MSCs should not, as a side effect, promote tumor growth of pre-cancerous fibroblastic cells in patients.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation and culture of skin fibroblasts

Skin fibroblasts were isolated aseptically from either adult skin biopsy or fetal skin segments in accordance with the ethic committee from the CHU-SJ. In both cases, skin was cleaned out to preserve only the dermis and epidermis, triturated into 1-5 mm² pieces and digested with collagenase D (Roche) for one hour at 37°C with agitation. The whole mixture was then centrifugated at 400xg for 5 minutes and washed with DMEM (Wisent) twice. The digested skin was seeded in 150 cm² flasks in DMEM with 10% FBS and 0.2% primocin (Invivogen). Subsequent passages are also maintained in DMEM with 10% FBS and 0.2% primocin.

Viral production

Lentiviral particles were produced by transfecting 2nd (pPAX2) or 3rd (pMDL and pRSV-Rev) generation packaging plasmids along with the vesicular stomatitis virus envelope (VSV-G) plasmid in 293T/17 cells (ATCC cat#CRL-11268) with polyethyleimine (PEI) in RPMI (Wisent) supplemented with 10% FBS. SV40ER cDNA was subcloned from pBABE SV40ER from William Hahn (Addgene #10891) into a lentiviral transfer plasmid containing a Neomycin resistance gene (SV40ER-Neo), Ha-Ras^{V12} lentiviral transfer plasmid containing a puromycin resistance gene (Ras^{V12}-puro) was obtained from Francis Rodier (CHUM, Université de

Montréal), hTERT lentiviral transfer plasmid was generated as previously described (50), mPlum was subcloned from pQC mPlum XI from Connie Cepko (Addgene #37355)(51) into a lentiviral transfer plasmid containing the puromycin selection gene. Firefly luciferase IRES-GFP (luc/GFP) was generated by Élie Haddad's laboratory (CHU Sainte-Justine) by inserting the firefly luciferase into a modified pHRSIN destination vector. Particle-containing medium was harvested 30 hours later, filtered through 0.22 µm syringe filter and concentrated by ultracentrifugation or frozen as is in -80°C freezer.

Cellular transformation

Primary skin fibroblasts were transformed using a three successive lentiviral transduction (as described in Fig. S1). Cells were first transduced overnight with SV40ER-Neo viral particles. Three days later, 300 µg/mL G418 (ThermoFisher) selection was applied and maintained until control GFP-transduced cells were eliminated. Cells were subsequently transduced with Ras^{V12}-puro lentiviral particles and 2 µg/mL Puromycin (ThermoFisher) selection was applied three days post-transduction. Cells were then transduced with hTERT lentiviral particles without antibiotic selection. Finally, cells were transduced overnight with mPlum viral particles. All transductions were carried in presence of 8 µg/mL Polybrene (Sigma-Aldrich). Transformed cells were subsequently expanded and sorted using a FACSARIAII (BD Biosciences) in the APC channel for the expression of mPlum. For metastatic studies, cells were also transduced with luciferase-IRES-GFP viral particles and FACS sorted for mPlum⁺/GFP⁺ expression.

Mouse immune reconstitution

All *in vivo* experiments were conducted in conformity with institutional committee for good laboratory practices for animal research (protocol #669). All mice used in this study were of the NOD/SCID/IL2R γ ^{null} (NSG) or NSG-SGM3 (expressing human IL3, GM-CSF and SCF) background, originally obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and housed in the animal care facility at the CHU Sainte-Justine Research Center under pathogen-free conditions in sterile ventilated racks. For adoptive transfer (Hu-AT) experiments, human adult

peripheral blood was harvested from healthy donors after informed consent and immune cell isolated using Ficoll-Paque gradient (GE Healthcare). Buffy coat was harvested for PBMCs while granulocytes were isolated from the gradient pellet. Briefly, Ficoll-Paque was aspirated and the pellet was broken and resuspended in 38 mL of sterile deionized water for 20 seconds for red blood cells (RBC) lysis before adding 2 mL of sterile 20X PBS solution. PBMCs and granulocytes were counted and mixed at 1:1 ratio before injection into mice. 5×10^6 PBMCs and 5×10^6 granulocytes, for a total of 1×10^7 WBC, were injected intraperitoneally (i.p.) in 200 μ L total volume after initial pilot experiments to determine the proper dose (Fig. S2). Age and sex-matched mice without i.p. injections were used as no-AT controls. In all cases, mice showing signs of GVHD were removed from analysis.

For BLT-reconstituted mice (Hu-BLT), 6-8 week old NSG mice were sublethally irradiated with 2Gy total body irradiation using a Faxitron CP-160 before surgical implantation of 1-2mm³ human fetal thymus under the kidney capsule and intravenous injection of CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSC) isolated from autologous fetal liver as previously described (52). Fetal (16 to 21 weeks) tissues were obtained after written informed consent (ethical committee of CHU Sainte-Justine, CER#2126). Hematopoietic engraftment was assessed by analyzing peripheral blood obtained from the saphenous vein. 50 μ L of blood was stained for flow cytometry using conjugated antibodies (mouse CD45-FITC from BD bioscience and 7-AAD, humanCD45-PE/Cy7, humanCD19-PE, humanCD3-APC and humanCD14-APC/Cy7 from Biolegend) and analyzed on LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences). Only mice with high reconstitution at week 8-10 (35-75% human CD45, >20% CD3) were used in this study. Age and sex-matched non-reconstituted NSG mice were used as control.

hUC-MSC isolation, characterization and injection

Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (hUC-MSCs) used in this study were obtained from the Héma-Québec/Hospital Ste-Justine biobank (BaRCCO). hUC-MSCs were extracted from the Wharton's jelly of two different umbilical cords (obtained from consenting mothers) using a proprietary explant culture method developed by Tissue Regeneration Therapeutics Inc. (TRT) and cultured in a chemically defined MSC culture

medium (TheraPEAK MSCGM-CD, Lonza) as previously described (53, 54). All procedures for cell expansion and banking were carried using detailed standard operating procedures developed for clinical grade MSC preparation. Each lot was made of up to 75 cryovials containing 13×10^6 (lot 1, passage 1) or 7.5×10^6 (lot 2, passage 2) cells. Phenotypic characterization of each lot was done by flow cytometry using the BD Stemflow™ hMSC Analysis kit and the endothelial cell marker CD31 (all reagents from BD Bioscience) and showed that the 2 lots of hUC-MSC met the ISCT phenotypic criteria for MSCs (>95% positive for CD44, CD73, CD90, CD105 and <2% positive for the hematopoietic markers) and were <2% positive for CD31. The functional activity of freshly thawed hUC-MSCs from each lot was assessed in the inhibition of activated T cell proliferation assay, as also described previously (53, 54). hUC-MSCs were thawed in RPMI (Wisent) immediately before injection in mice. Fluorescent MSCs were labelled and tracked as per manufacturer recommendations. In brief, freshly thawed cells were diluted at 1×10^6 cells/mL and CellBrite™ NIR790 Cytoplasmic Membrane Dye (Biotium, cat.30079) was added at the concentration of 1 μ M and incubated at 37°C for 20 minutes with frequent agitation. Cells were then washed thrice in serum-free RPMI (Wisent) before being resuspended in cold serum-free RPMI (Wisent) for injection in mice. 1×10^6 MSCs in 300 μ l were injected i.v. or 2.5×10^6 MSCs in 200 μ l were injected i.p. Cell imaging was done using the Q-Lumi *In Vivo* imaging system (MediLumine, Montreal) with near-infrared filters (Ex.769-41nm, Em.832-37nm).

Mouse orthotopic injections and monitoring

For subcutaneous tumor, 5×10^5 transformed fibroblasts were injected in 100 μ L of RPMI (Wisent) to form a bulge under the skin of anesthetized mice previously shaved and wet with alcohol. Two injections per mouse (one on each side) were performed. *In vivo* growth monitoring was done twice weekly using the Q-Lumi *In Vivo* imaging system (MediLumine, Montreal) by fluorescent tracking of mPlum-expressing tumor cells (Ex. 562-40nm, Em. 641-75nm). Fluorescence signal was standardized internally for each picture and normalized using FIJI macros for picture processing. Analysis of tumor signal was also measured semi-manually using FIJI macros and expressed in fluorescence integrated density. Tumor growth was also characterized at sacrifice and compared to control tumors in each experiment. Normal growth

is defined by tumors bigger than one standard deviation below control mean. Tumor growth inhibition (TGI) characterized as palpable, harvestable tumors smaller than one standard deviation below control mean. Tumors were considered eliminated (TE) when unpalpable or too small to be harvested at sacrifice. For metastatic tumors, 1×10^6 luciferase-expressing cells were slowly injected i.v. (tail vein) in 300 μ L of RPMI (Wisent) to avoid embolism and imaged weekly 10 minutes after the injection of 150 mg/kg of D-luciferin using the Q-Lumi *In Vivo* imaging system without filters. Signal normalization and analysis was done automatically using FIJI macros and expressed in radiance ($\text{photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{sr}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) integrated density (Area \cdot mean intensity). All injections and surgical procedures were undergone under aseptic conditions in the CHU Sainte-Justine animal facility.

Tumor histology

Tumor tissues were flash frozen on dry ice after harvest. 10 μ m-thick sections were made on a cryostat (Leica) and deposited on gelatinized microscopy slides and immediately fixed and permeabilized in 95% EtOH. Immunofluorescent staining was done against human CD45 (Cell signaling Rabbit #13917) and human CD8 (Biolegend, mouse 300901) with AlexaFluor 488 or 594 secondary antibodies and DAPI counterstain.

Characterization the of tumor immune infiltrate

Tumors were excised, and blood was collected from mice at the time of sacrifice. Tumors were digested using the human Tumor Dissociation Kit and GentleMACS Octo Dissociation with heaters (Miltenyi). Cells were then filtered on 70 μ m MACS SmartStrainers (Miltenyi) and washed as per manufacturer's protocol using RPMI (Wisent) with 10% FBS. Cells were then labelled with antibodies for analysis by flow cytometry of tumor infiltrating immune cells (TIILs). The following antibodies were used: humanCD3-AF700, humanCD33-BV510 and humanCD25-BV711 from Biolegend and mouseCD45-PE/Cy7, humanCD45-BUV395, humanCD19-PE/CF594, humanCD4-BB515, humanCD8-BV421, humanCD14-APC/H7, humanCD56-BV786, humanCD127-BB700, humanPD-1-BUV737 and humanTim3-PE from BD Biosciences. Blood samples were collected, red blood cells lysed using the BD Pharm Lyse

lysis buffer (BD Biosciences) and cells stained with the same antibody panel. All data were acquired on BD LSRFortessa (BD Biosciences). Data analysis was done on FlowJo V10 (FlowJo, LLC) and the FlowSOM algorithm in FlowJo (55).

Statistical analysis

Student's t-test, one and two-way ANOVA with Šídák's multiple comparison post-tests were done using GraphPad Prism 8.0. For subcutaneous tumors, n= number of tumors, 2 tumors per mouse. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the flow cytometry and animal facility for providing technical support and to Renée Dicaire for handling clinical samples. This work was supported by a grant from la Fondation Charles Bruneau to C.M.B. and E. H. G.M.B. was supported by a studentship from the Canadian Institute of Health Research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.M.B, C.C. and Y.L. performed experiments. G.M.B. and C.B. designed the studies, R.B. provided cells, E.H. provided material, reagents and expertise. J.V.G. provided material, G.M.B. and C.B. wrote the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. Zhao K, Lou R, Huang F, Peng Y, Jiang Z, Huang K, et al. Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(1):97-104. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.09.030. PubMed PMID: 25300866.
2. Blanc LK, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Lancet R-H. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet*. 2008.
3. Wu KH, Chan CK, Tsai C, Chang YH, Sieber M, Chiu TH, et al. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2011;91(12):1412-6. doi: 10.1097/TP.0b013e31821aba18. PubMed PMID: 21494176.
4. Figliuzzi M, Bonandrini B, Silvani S, Remuzzi A. Mesenchymal stem cells help pancreatic islet transplantation to control type 1 diabetes. *World journal of stem cells*. 2014;6(2):163-72. doi: 10.4252/wjsc.v6.i2.163.
5. Pileggi A, Xu X, Tan J, Ricordi C. Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials. *Current opinion in organ transplantation*. 2013;18(6):672-81. doi: 10.1097/MOT.0000000000000029.
6. Duijvestein M, Vos AW, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 2010;59(12):1662-9. doi: 10.1136/gut.2010.215152.
7. Mathiasen A, Jørgensen E, Qayyum A, Haack-Sørensen M, Ekblond A, Kastrup J. Rationale and design of the first randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intramyocardial injection of autologous bone-marrow derived Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure (MSC-HF Trial). *American Heart Journal*. 2012;164(3):285-91. doi: 10.1016/j.ahj.2012.05.026.
8. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(13):8932-7. doi: 10.1073/pnas.132252399. PubMed PMID: 12084934; PubMed Central PMCID: PMC124401.

9. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation*. 2013;95(12):1535-41. doi: 10.1097/TP.0b013e318291a2da. PubMed PMID: 23680930.
10. Liu Y, Wu J, Zhu Y, Han J. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. *Clinical and experimental medicine*. 2014;14(1):13-24. doi: 10.1007/s10238-012-0218-1.
11. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplantation*. 2016;25(5):829-48. doi: 10.3727/096368915X689622.
12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.
13. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(11):2865-74. doi: 10.1634/stemcells.2007-1028.
14. Girdlestone J, Limbani VA, Cutler AJ, Navarrete CV. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions. *Cytotherapy*. 2009;11(6):738-48. doi: 10.3109/14653240903079401.
15. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunology and cell biology*. 2010;88(8):795-806. doi: 10.1038/icb.2010.47. PubMed PMID: 20386557.
16. Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World journal of stem cells*. 2014;6(2):195-202. doi: 10.4252/wjsc.v6.i2.195.
17. Hsieh J-YY, Fu Y-SS, Chang S-JJ, Tsuang Y-HH, Wang H-WW. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem cells and development*. 2010;19(12):1895-910. doi: 10.1089/scd.2009.0485.
18. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2005;23(2):220-9. doi: 10.1634/stemcells.2004-0166.
19. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2007;25(6):1384-92. doi: 10.1634/stemcells.2006-0709.
20. Fong C-YY, Chak L-LL, Biswas A, Tan J-HH, Gauthaman K, Chan W-KK, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem cell reviews*. 2011;7(1):1-16. doi: 10.1007/s12015-010-9166-x.

21. Subramanian A, Fong C-YY, Biswas A, Bongso A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PloS one*. 2015;10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0127992.
22. Subramanian A, Shu-Uin G, Kae-Siang N, Gauthaman K, Biswas A, Choolani M, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells do not transform to tumor-associated fibroblasts in the presence of breast and ovarian cancer cells unlike bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(6):1886-95. doi: 10.1002/jcb.24057.
23. Fong CY, Tam K, Cheyyatraivendran S, Gan SU, Gauthaman K, Armugam A, et al. Human Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds. *Journal of cellular biochemistry*. 2014;115(2):290-302. doi: 10.1002/jcb.24661. PubMed PMID: 24038311.
24. Zhang Z, Lin H, Shi M, Xu R, Fu J, Lv J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27 Suppl 2:112-20. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07024.x. PubMed PMID: 22320928.
25. Shi M, Zhang Z, Xu R, Lin H, Fu J, Zou Z, et al. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(10):725-31. doi: 10.5966/sctm.2012-0034.
26. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PloS one*. 2008;3(1). doi: 10.1371/journal.pone.0001451.
27. Qiu Y, Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord blood migrate in response to complement C1q. *Cytotherapy*. 2012;14(3):285-95. doi: 10.3109/14653249.2011.651532.
28. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PloS one*. 2010;5(2). doi: 10.1371/journal.pone.0009016.
29. Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13(12):1477-86. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.08.048.
30. Yin S, Ji C, Wu P, Jin C, Qian H. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: bioactive ways of tissue injury repair. *American journal of translational research*. 2019;11(3):1230-40.
31. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HLL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*. 2016;7. doi: 10.1038/cddis.2015.327.

32. Selleri S, Bifsha P, Civini S, Pacelli C, Dieng MM, Lemieux W, et al. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget*. 2016;7(21):30193-210. doi: 10.18632/oncotarget.8623.
33. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Advances in cancer research*. 2010;107:57-117. doi: 10.1016/S0065-230X(10)07003-X.
34. Castro-Manrreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem cells and development*. 2014;23(11):1217-32. doi: 10.1089/scd.2013.0363.
35. Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem cells and development*. 2010;19(5):607-14. doi: 10.1089/scd.2009.0345.
36. Salem HK, cells T-C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells*. 2010.
37. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British journal of haematology*. 2005;129(1):118-29. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.
38. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(1):212-22. doi: 10.1634/stemcells.2007-0554.
39. Chen J-Y, Li C-F, Kuo C-C, Tsai KK, Hou M-F, Hung W-C. Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Research*. 2014;16(4). doi: 10.1186/s13058-014-0410-1.
40. Li F, Zhang R, Li S, Liu J. IDO1: An important immunotherapy target in cancer treatment. *International Immunopharmacology*. 2017;47:70-7. doi: 10.1016/j.intimp.2017.03.024.
41. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars in Immunopathology*. 2013;35(2):123-37. doi: 10.1007/s00281-012-0342-8.
42. Choudhari S, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*. 2013;11(1). doi: 10.1186/1477-7819-11-118.
43. Zhang L, Zhou F, ten Dijke P. Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends in biochemical sciences*. 2013;38(12):612-20. doi: 10.1016/j.tibs.2013.10.001.

44. Owusu B, Galemno R, Janetka J, Klampfer L. Hepatocyte Growth Factor, a Key Tumor-Promoting Factor in the Tumor Microenvironment. *Cancers*. 2017;9(12):35. doi: 10.3390/cancers9040035.
45. Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Current opinion in oncology*. 2013;25(6):637-45. doi: 10.1097/CCO.0000000000000006.
46. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486.
47. Haynes NM. Immunosuppression and Cancer. *Encyclopedia of Cancer*. 2015:1-7. doi: 10.1007/978-3-642-27841-9_3012-2.
48. Klopp A, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2011;29(1):11-9. doi: 10.1002/stem.559.
49. Lee HY, Hong IS. Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Science*. 2017;108(10):1939-46. doi: 10.1111/cas.13334.
50. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*. 2003;22(16):4212-22. doi: 10.1093/emboj/cdg417.
51. Beier KT, Samson ME, Matsuda T, Cepko CL. Conditional expression of the TVA receptor allows clonal analysis of descendants from Cre-expressing progenitor cells. *Developmental biology*. 2011;353(2):309-20. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.03.004.
52. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):786-98. doi: 10.1038/nri3311. PubMed PMID: 23059428; PubMed Central PMCID: PMC3749872.
53. Chabot D, Lewin A, Loubaki L, Bazin R. Functional impairment of MSC induced by transient warming events: Correlation with loss of adhesion and altered cell size. *Cytotherapy*. 2018;20(8):990-1000. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.05.010.
54. Chabot D, Tremblay T, Pare I, Bazin R, Loubaki L. Transient warming events occurring after freezing impairs umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells functionality. *Cytotherapy*. 2017;19(8):978-89. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.04.005. PubMed PMID: 28606762.
55. Gassen S, Callebaut B, Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry Part A*. 2015;87(7):636-45. doi: 10.1002/cyto.a.22625.
56. Marodon G, Desjardins D, Mercey L, Baillou C, Parent P, Manuel M, et al. High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.gamma c-/- mice. *European journal of immunology*. 2009;39(8):2136-45. doi: 10.1002/eji.200939480.

57. Denton PW, Nochi T, Lim A, Krisko JF, Martinez-Torres F, Choudhary SK, et al. IL-2 receptor γ -chain molecule is critical for intestinal T-cell reconstitution in humanized mice. *Mucosal Immunology*. 2012;5(5):555-66. doi: 10.1038/mi.2012.31.
58. Wang M, Yao L-C, Cheng M, Cai D, Martinek J, Pan C-X, et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *The FASEB Journal*. 2017. doi: 10.1096/fj.201700740R.
59. Fu J, Sen R, Masica DL, Karchin R, Pardoll D, Walter V, et al. Autologous reconstitution of human cancer and immune system in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(2):2053-68. doi: 10.18632/oncotarget.14026.
60. Tatum AM, Mylin LM, Bender SJ, Fischer MA, Vigliotti BA, Tevethia MJ, et al. CD8⁺ T cells targeting a single immunodominant epitope are sufficient for elimination of established SV40 T antigen-induced brain tumors. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(6):4406-17. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4406.
61. Laumont CMM, Vincent K, Hesnard L, Audemard É, Bonneil É, Laverdure J-PP, et al. Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Science translational medicine*. 2018;10(470). doi: 10.1126/scitranslmed.aau5516.
62. Connick P, Kolappan M, Patani R, Scott MA, Crawley C, He X-L, et al. The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. *Trials*. 2011;12(1):62. doi: 10.1186/1745-6215-12-62.
63. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Experimental hematology*. 2008;36(3):309-18. doi: 10.1016/j.exphem.2007.11.007.
64. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of immunology research*. 2015;2015:394917. doi: 10.1155/2015/394917.
65. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90(4):516-25.
66. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 2007;92(7):881-8. doi: 10.3324/haematol.11240.
67. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(4):1395-403. doi: 10.1084/jem.180.4.1395.

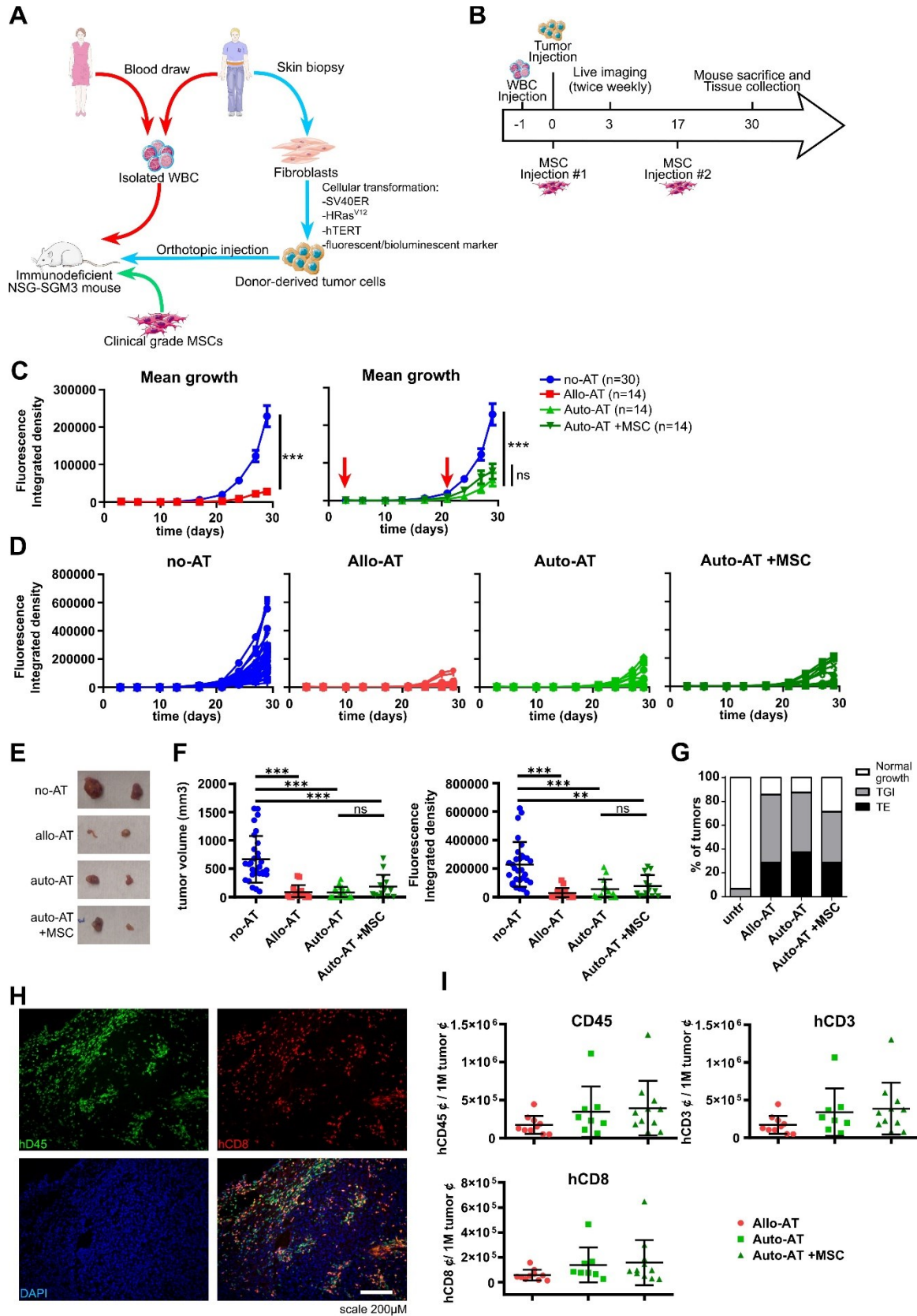


Fig.1 Moquin-Beaudry et al.

Figure 1. Injection of hUC-MSCs does not affect the growth of subcutaneous tumors in Hu-AT mice. (A) Schematic view of the experimental procedure and (B) Timeline of experiments. (C) Mean tumor growth without immune reconstitution (no-AT, blue) or with allogeneic adoptive transfer (Allo-AT, left panel, in red) or autologous adoptive transfer without hUC-MSCs (Auto-AT, right panel, light green) or with hUC-MSCs (Auto-AT +MSC, right panel, dark green). The red arrows indicate i.p. injection of 2.5×10^6 MSCs. Mean \pm SEM. (D) Growth curve for individual tumors in the groups of panel C. (E) Representative photos of tumors for each group at sacrifice. (F) Quantification of volume (left) and fluorescence intensity (right) for all tumors at sacrifice. Each dot representing an individual tumor, mean \pm SD. (G) Tumor rejection assessment for each condition. TE: tumor elimination (black bar); TGI: tumor growth inhibition (grey bar) and normal tumor growth (white bar). (H) Representative immunofluorescence photos of the tumor immune infiltrate. Green: human CD45 (Top left); Red: human CD8 (Top right); Blue: DAPI (Bottom left) and merge (Bottom right). Scale 200 μ m. (I) Quantification of immune infiltrate for AT conditions per million tumor cells for human CD45 (Top left), CD3 (Top right) and CD8 (Bottom left). Each dot representing counts from an individual tumor.

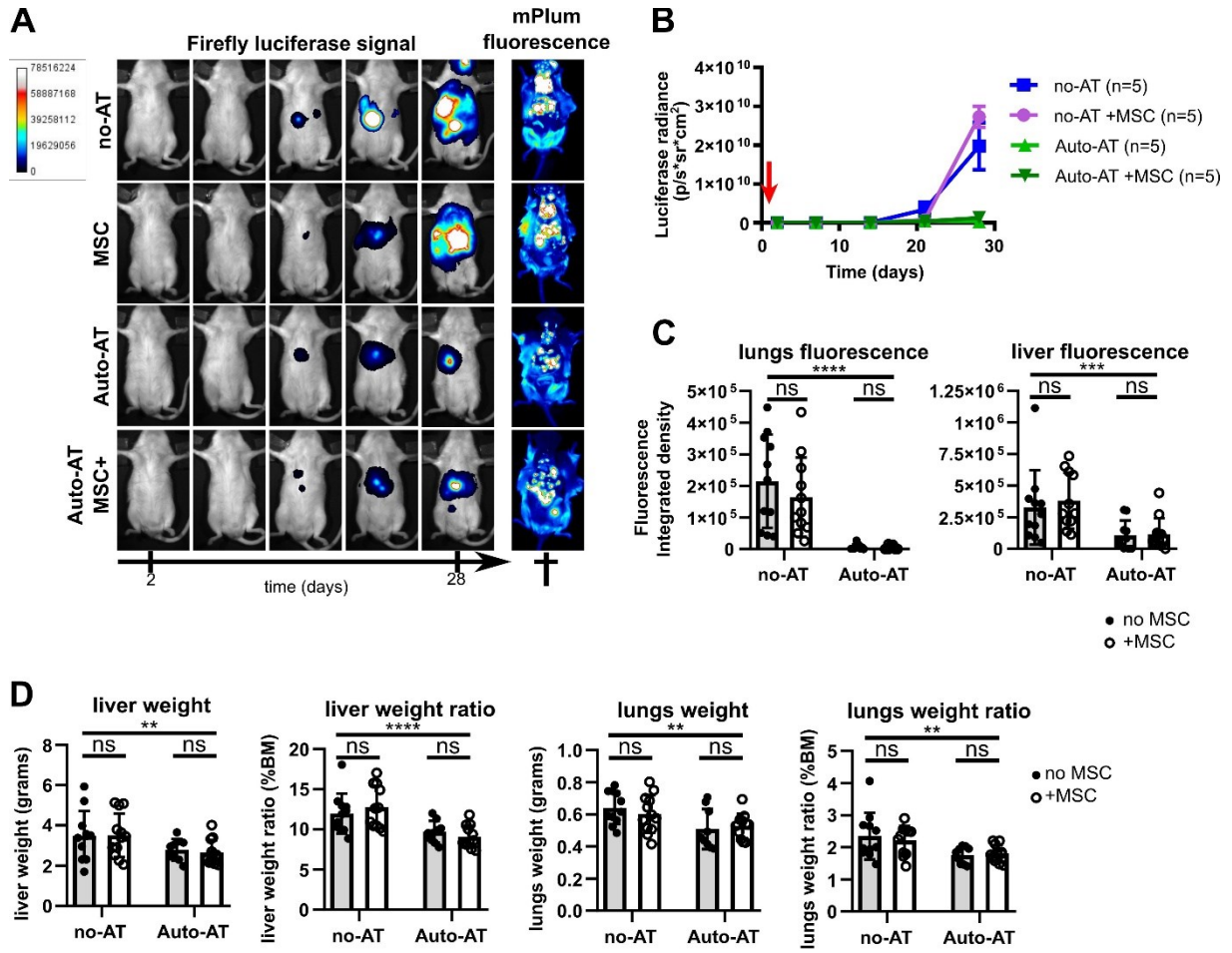


Fig.2 Moquin-Beaudry et al.

Figure 2. hUC-MSCs do not affect the growth of metastatic-like tumors in Hu-AT mice. (A) Tumor cells were injected i.v. and time-lapse *in vivo* images of lung and liver tumor growth were detected by luminescence (luciferase) in mice without immune reconstitution (no-AT), injected i.v. with 1×10^6 MSCs (MSC), following autologous adoptive transfer of 1×10^7 WBC (Auto-AT) or with adoptive transfer of WBC and the injection of MSCs (Auto-AT + MSC). Also shown are images of tumors by fluorescence (mPlum) at sacrifice. (B) Quantification of tumor growth luminescence over time. The red arrow indicates the i.v. injection of hUC-MSCs. $n=5-6$ mice per group from one of two experiments, $\text{mean} \pm \text{SEM}$. (C) Quantification of tumor size by fluorescence at sacrifice in the lungs (left) and liver (right). (D) Measurement of liver weight and weight to body mass ratio, lungs weight and weight to body mass ratio for tumors from all groups. Each dot representing the size of an individual tumor

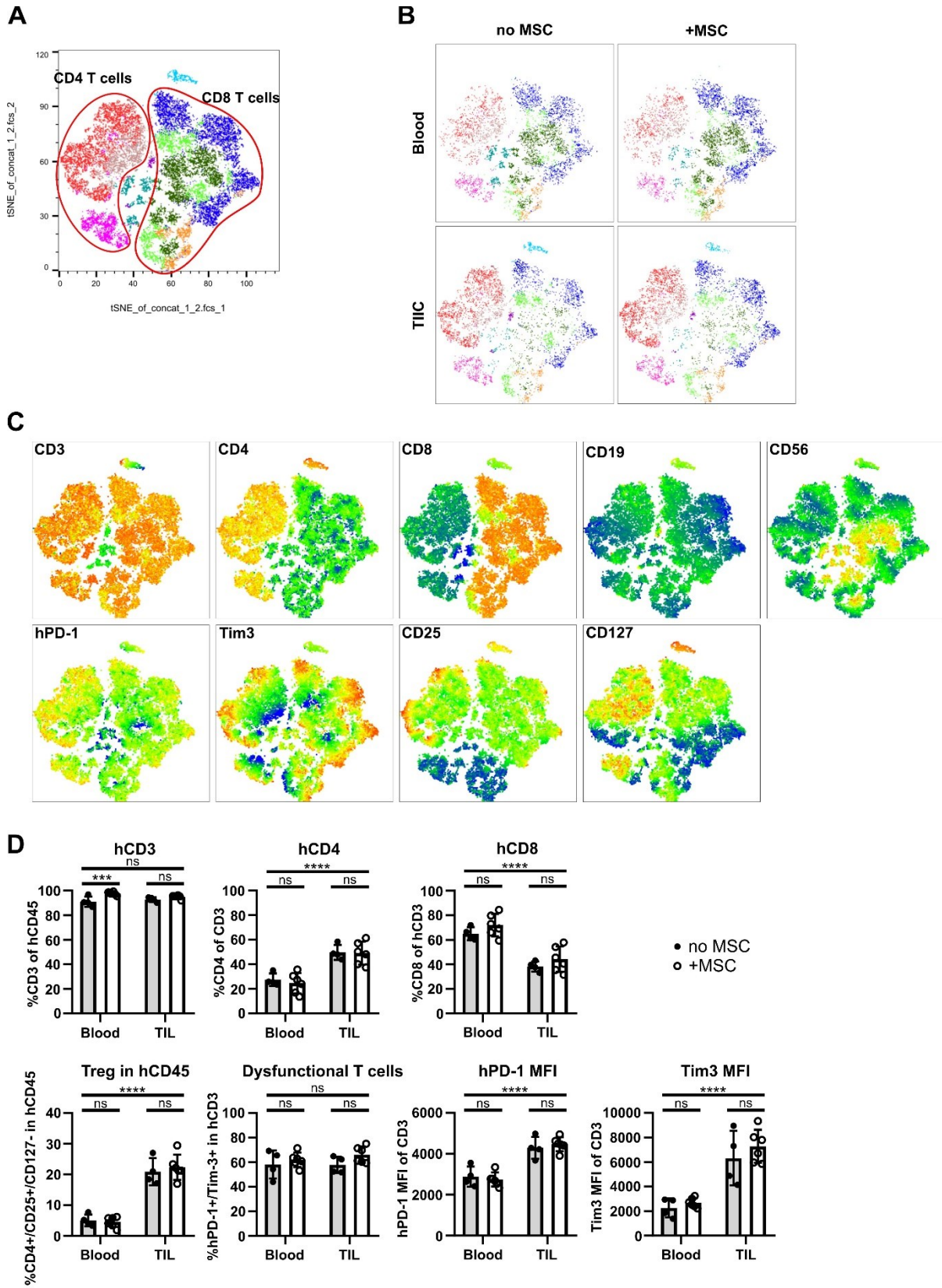


Fig.3 Moquin-Beaudry et al.

Figure 3. Human immune landscape of metastatic-like tumors is unchanged by the injection of hUC-MSCs in autologous Hu-AT mice. (A) Annotated tSNE plot of total human CD45 cells with unsupervised population clustering (color map) of flow cytometry data. (B) Population distribution by origin (Blood vs TIIC) and treatment (no MSC vs MSC) using the same color mapping as in (A). (C) Expression heatmap for cellular populations (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56) (top) and phenotype (hPD-1, Tim3, CD25, CD127) (bottom) from hCD45⁺ cells. (D) Quantification of CD3 frequency in hCD45, CD4 in CD3, CD8 in CD3, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T reg cells in hCD45, PD-1⁺Tim3⁺ exhausted/dysfunctional cells in CD3, PD-1 and Tim3 expression level by mean fluorescence intensity (MFI). Full circles/grey columns: without MSCs; hollow circles/white columns: with MSCs, mean±SD. n=1 tumor per mouse with 4-6 mice per group were analyzed.

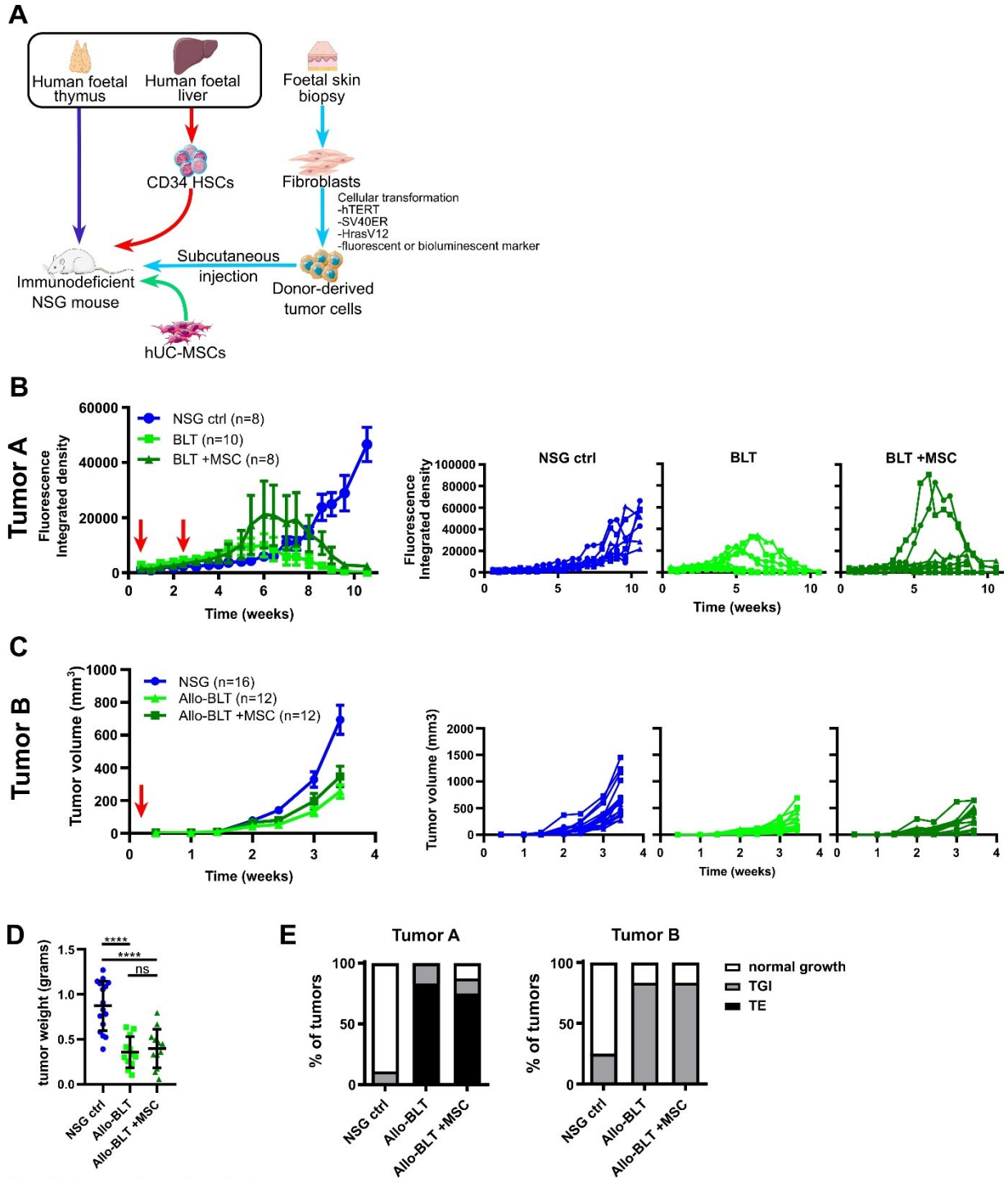


Fig.4 Moquin-Beaudry et al.

Figure 4. Impact of hUC-MSCs on tumor growth in hu-BLT mice. (A) Schematic of experimental design. (B) Mean±SEM (left panel) and individual (right panels) tumor growth curves for tumor A without immune reconstitution (NSG ctrl), with BLT reconstitution (BLT) or with BLT reconstitution and the i.p. injection of 2.5×10^6 hUC-MSCs (BLT +MSC). Red arrows indicate hUC-MSCs injections. (C) Same as in (B) but using a second tumor cell line (tumor B) and BLT donor. Of note, because tumor B grew faster, hUC-MSCs were injected only once. (D) Quantification of tumor weight at sacrifice. Each dot representing an individual tumor, mean±SD. (E) Tumor rejection assessment for each condition. TE: tumor elimination (black bar); TGI: tumor growth inhibition (grey bar) and normal tumor growth (white bar).

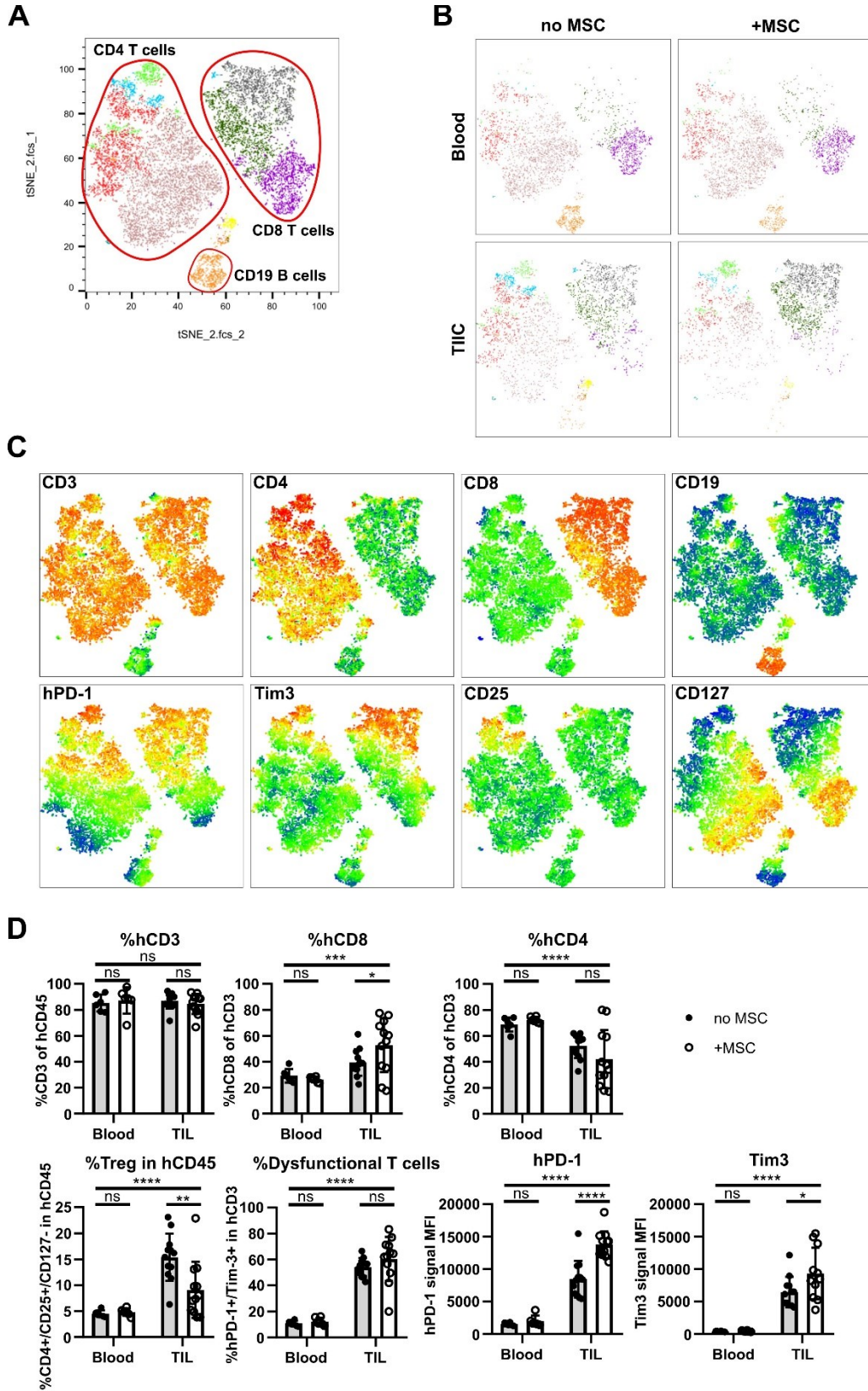


Fig.5 Moquin-Beaudry et al.

Figure 5. Effect of hUC-MSCs on the human immune landscape of tumors in Hu-BLT mice. (A) Annotated tSNE plot of total human CD45 cells with unsupervised population clustering (color map) of flow cytometry data. (B) Population distribution by origin (Blood vs TIIC) and treatment (no MSC vs MSC) same color mapping as in (A). (C) Expression heatmap for cellular populations (CD3, CD4, CD8, CD19) (top) and phenotype (hPD-1, Tim3, CD25, CD127) (bottom) of hCD45⁺ cells. (D) Quantification of CD3 frequency in hCD45, CD4 in CD3, CD8 in CD3, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells in hCD45, PD-1⁺Tim3⁺ exhausted/dysfunctional cells in CD3 and PD-1 and Tim3 expression levels by mean fluorescence intensity (MFI). Full circles/grey columns: without MSCs; hollow circles/white columns: with MSCs. Mean±SD.

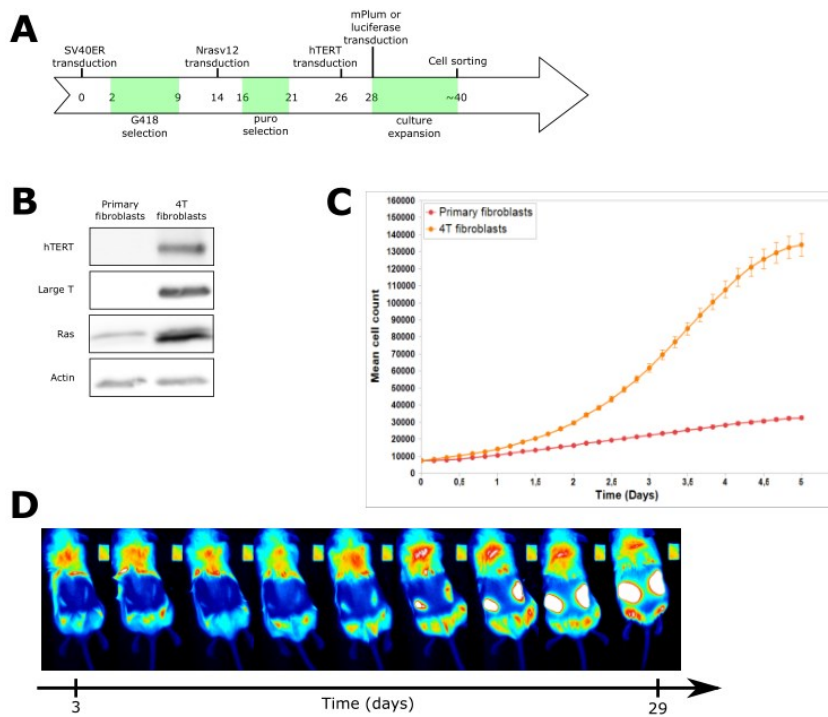


Fig S1. Primary fibroblast transformation process. (A) Lentivirus-based transformation protocol timeline. (B) Validation of transgene expression by Western Blot. 4T fibroblasts: fibroblast population expressing all 4 transgenes. (C) Differential *in vitro* growth curves of primary and transformed 4T fibroblasts. (D) Sample time-lapse *in vivo* imaging of tumor formation in NSG mice

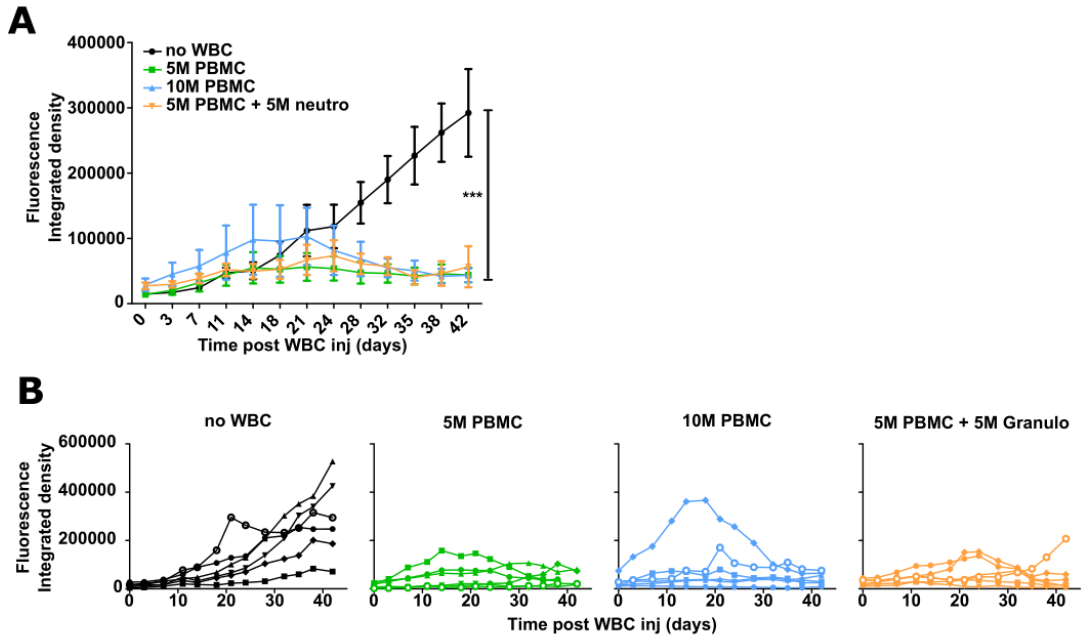


Fig S2. WBC dosage for AT experiments. (A) Mean±SEM and (B) detailed growth curves for different WBC regimens to assess their tumor rejection efficacy. Black: without AT; green: 5×10^6 PBMCs; light blue 10^7 PBMCs; orange: 5×10^6 PBMCs + 5×10^6 granulocytes. n=6 tumors/group.

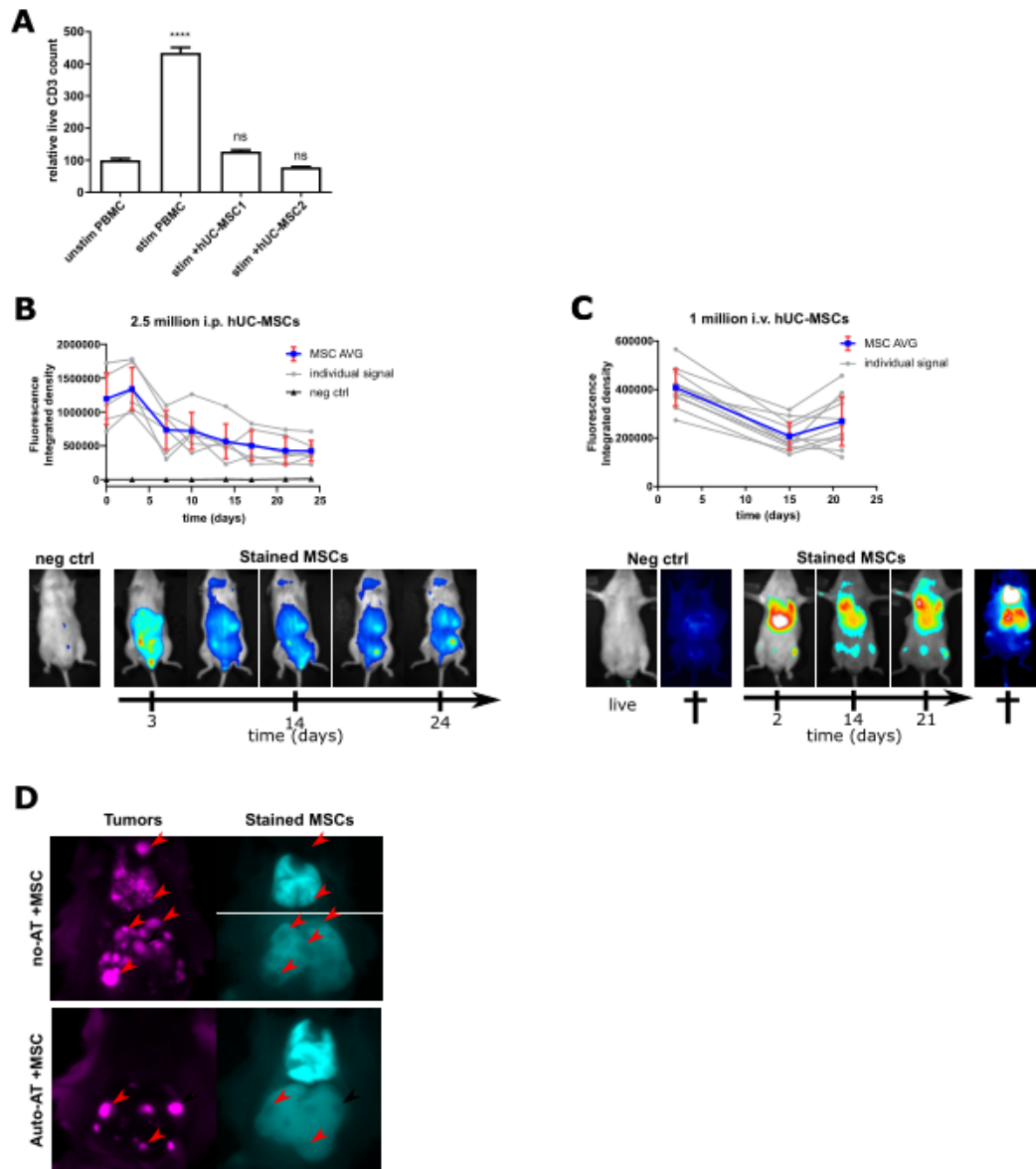


Fig S3. hUC-MSC validation. (A) *In vitro* hUC-MSC immunomodulatory potential assessment by T cell proliferation inhibition. Statistical analysis relative to unstim PBMC condition. (B) *In vivo* persistence of 2.5×10^6 NIR fluorescent-stained hUC-MSCs after i.p. injection. Signal quantification (top) and sample images (bottom). Mean \pm SD. (C) *In vivo* persistence of 1×10^6 NIR fluorescent-stained hUC-MSCs after i.v. injection. Signal quantification (top) and sample images (bottom). Mean \pm SD. (D) Tumor/hUC-MSC colocalization in metastatic-like tumor model. Tumor (left) and hUC-MSC (right) fluorescent signal with red arrowheads highlighting tumor mass positions in the absence (top) or presence (bottom) of autologous AT. Exposition for no-AT +MSC hUC-MSC signal in the lung and liver was adjusted independently for clarity.

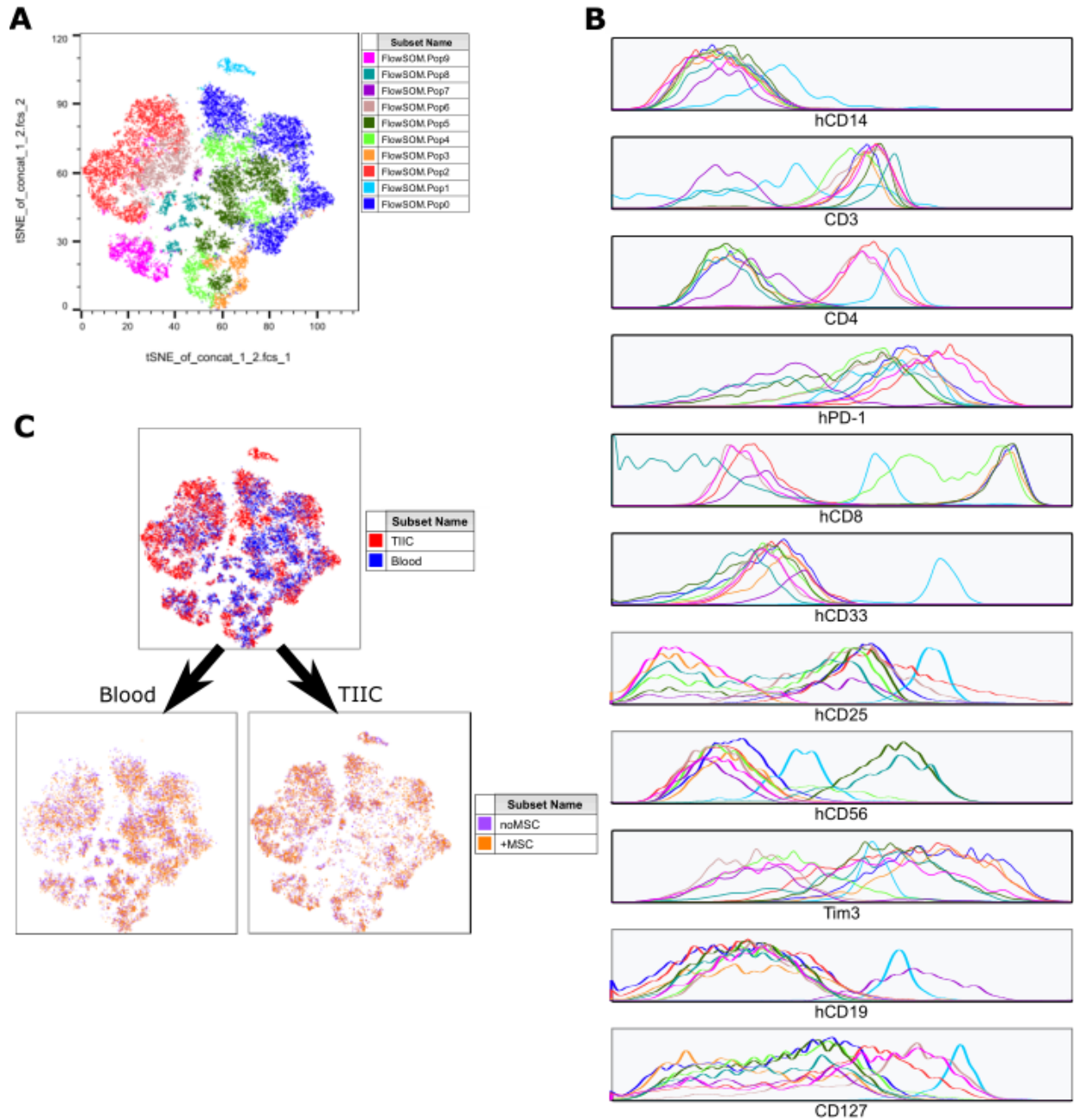


Fig S4. Complementary gene expression profile for Auto-AT human lymphocyte clustering. (A) Reference tSNE dimensional reduction plot of Auto-AT hCD45+ cells and (B) detailed gene expression profile for all population clusters generated using the FLOWSOM plugin in FlowJo (bottom). Each line color corresponds to its equivalent population in the tSNE plot. (C) Differential clustering between blood and TIICs (top) and differential clustering of TIICs with or without hUC-MSCs in blood (bottom left) or TIICs (bottom right). Signal overlap indicates no difference in population distribution.

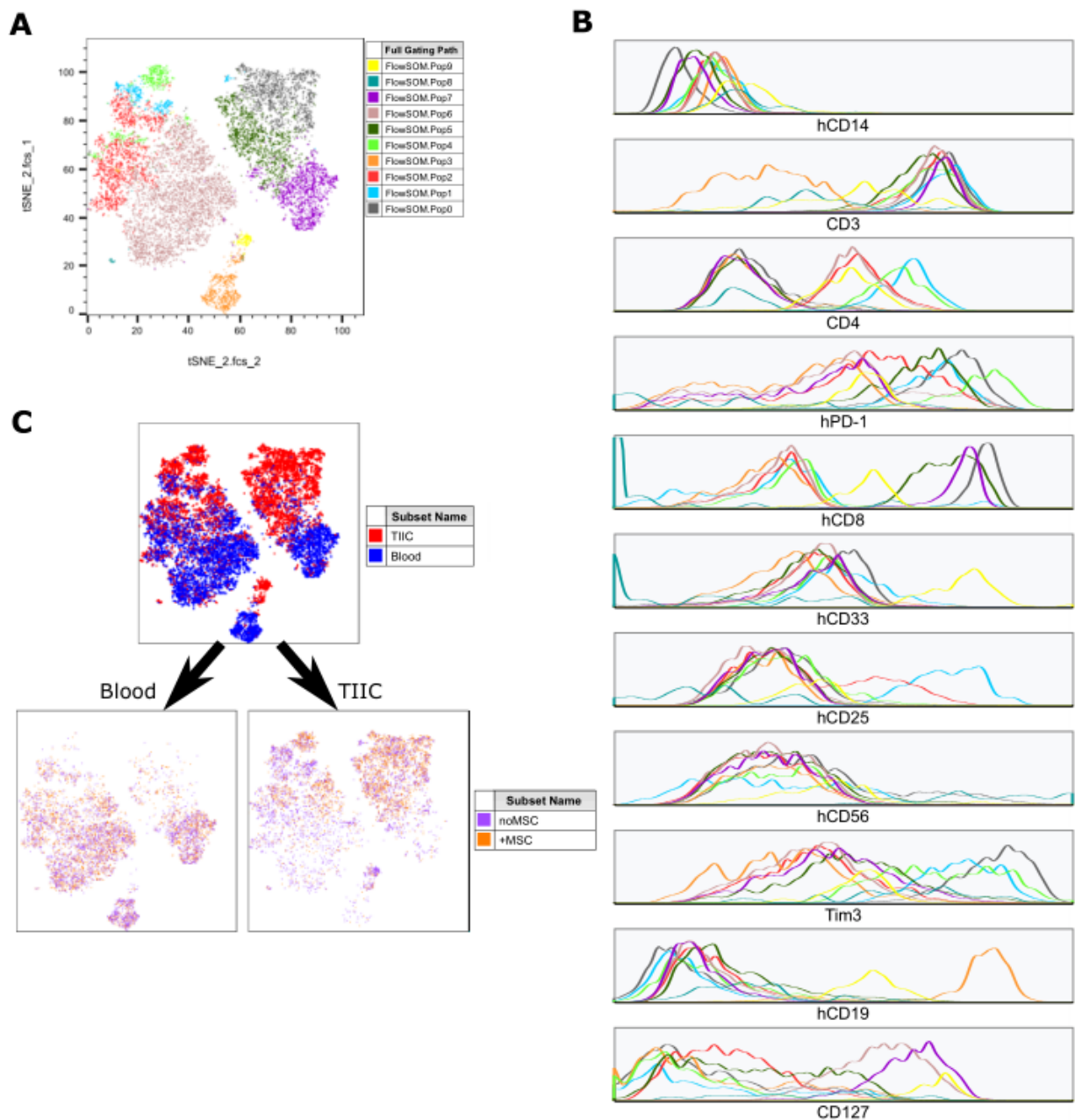


Fig S5. Complementary gene expression profile for BLT human lymphocyte clustering. (A) Reference tSNE dimensional reduction plot of BLT hCD45+ cells (top) and detailed gene expression profile for all population clusters generated using the FLOWSOM plugin in FlowJo (bottom). Each line color corresponds to its equivalent population in the tSNE plot. (C) Differential clustering between blood (blue) and TIICs (red) (top) and differential clustering of TIICs without (purple) or with hUC-MSCs (orange) in blood (bottom left) or TIICs (bottom right). Signal overlap indicates no difference in population distribution.

Chapitre 3 : Discussion et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse représentent le point de départ pour une réflexion et un processus d'amélioration des modèles précliniques utilisés en immuno-oncologie. Évidemment, la nature même d'un modèle implique un détachement avec la réalité clinique et des efforts considérables doivent être déployés pour générer des modèles qui sont représentatifs, mais aussi flexibles, robustes et aussi simples d'utilisation que possible afin d'en favoriser la diffusion. Nous estimons que nos travaux sont une contribution à ce progrès à plusieurs niveaux, bien qu'ils comportent toujours des lacunes à adresser. Nous aborderons dans cette section certaines de ces forces et lacunes ainsi que des pistes, explorées ou non à ce jour, pour parfaire notre approche.

3.1 Modèles actuels

Tout d'abord, commençons par situer notre approche par rapport aux modèles actuels. L'attrait fondamental des modèles que nous avons élaborés est la nature parfaitement autologue des interactions tumeur-SI. À notre connaissance, seuls quelques rares groupes ont démontré d'autres approches pour parvenir à cet objectif. Dans un premier temps, Fu *et al.* ont décrit l'utilisation de HSC CD34+ provenant de moelle osseuse de patients ayant subi une résection chirurgicale de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (HNSCC) [383]. Il s'agit d'une approche excessivement pertinente et rigoureuse pour la modélisation préclinique, mais comporte malheureusement des limitations logistiques, éthiques et biologiques considérables par rapport à l'approche décrite dans cette thèse. D'abord, notre approche prévoit le prélèvement du matériel biologique auprès de donneurs sains par des approches peu invasives pour les modèles par transfert adoptif. Cela facilite l'accès aux cellules nécessaires à la reconstitution immunitaire des souris et permet de facilement répéter les expériences pour un même donneur. Notre approche permet aussi de générer plusieurs lignées tumorales à partir d'un même donneur. Le transfert adoptif de globules blancs circulants offre aussi une reconstitution plus rapide et fonctionnelle que l'utilisation de HSC en absence de thymus autologue, puisque sans celui-ci, l'éducation des lymphocytes T humains dérivés de HSC est incomplète [384]. Les modèles de transfert adoptif de PBMC entraînent cependant des GVHD beaucoup plus rapidement,

réduisant considérablement la fenêtre d'étude. Alternativement, Jespersen *et al.* ont décrit la combinaison de PDX de mélanomes avec le transfert adoptif de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) originale ayant été propagée *in vitro* [385]. Cette approche ingénieuse permet bien de modéliser la réponse d'un patient donné à sa tumeur. Toutefois, la présélection de cellules T réactives à la tumeur et l'expansion *in vitro* de ces cellules en font un système « idéal » où toutes les cellules infusées (20 millions par souris) devraient être réactives aux tumeurs. Or, dans cette étude, la réactivité ne fut observée que lors de supplémentation considérable en IL-2 humain aux souris. Aussi, cette étude s'est vue incapable d'utiliser ce modèle pour évaluer l'effet d'agents immunomodulateurs puisque l'infusion des TIL était soit complètement inefficace ou curative. Les modèles que nous avons développés donnant des réponses plus nuancées, ils permettent d'évaluer la potentialisation de la réponse anti-tumorale à la suite de différents traitements. Aussi, il est intéressant de constater que, dans notre cas, l'injection de seulement 5 millions de PBMC totaux – à priori sans enrichissement de spécificité contre la tumeur – mène à un rejet tumoral partiel ou complet même en absence de supplément d'IL2. Ceci peut possiblement s'expliquer par le fait que les tumeurs générées par notre approche sont immunitairement naïves et n'ont pas subi de pression préalable favorisant l'acquisition de phénotypes immunosuppresseurs (immunoédition tumorale). Selon cette hypothèse, la croissance secondaire de tumeurs étant parvenues à évader la réponse immunitaire devrait être plus résistante à une nouvelle confrontation immunitaire.

Une lacune majeure de notre approche par rapport aux deux modèles présentés précédemment est la transformation artificielle des cellules pour générer les lignées tumorales. L'utilisation de PDX permet une excellente modélisation du contexte génétique complexe de tumeurs cliniques, de la variation inter-tumorale et, selon l'approche expérimentale, du microenvironnement tumoral normal. Bien qu'il s'agisse d'une approche artificielle, la transformation de cellules saines par transduction de proto-oncogènes permet toutefois d'obtenir des lignées tumorales génétiquement définies dont l'étude à long terme permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'évolution tumorale dans différents contextes (*in vitro* vs. *in vivo*, avec vs. sans pression immunitaire, etc.). Elles offrent aussi une grande flexibilité et un affranchissement de matériel biologique issu de patient – qui demeure toutefois un outil de validation indispensable. La méthode de transformation utilisée peut toutefois être améliorée.

Dans nos travaux, l'utilisation de l'approche dénommée 4T impliquant la transduction lentivirale des transgènes hTERT, SV40ER et HRas^{V12} s'est avérée être très robuste, mais peu représentative, menant à la formation de tumeur très dédifférenciées, agressives et faiblement invasives. Différentes approches pourraient être explorées afin d'améliorer les propriétés des lignées ainsi générées. Une première approche étudiée pour accélérer et standardiser la transformation tumorale de cellules primaires ou dérivées d'iPSC consiste à utiliser une technique d'insertion spécifique pour l'ajout des proto-oncogènes. En insérant les transgènes simultanément par recombinaison homologue à la suite d'une coupure d'ADN dans un site spécifique grâce à des endonucléases aux doigts de zinc ou avec Crispr/Cas9, on assure une expression standardisée des transgènes et aucune insertion aléatoire pouvant affecter le phénotype cellulaire. J'ai travaillé sur une telle approche pendant plusieurs années au laboratoire pour générer une cassette polycistronique permettant l'expression concomitante des trois proto-oncogènes d'intérêt et d'une protéine fluorescente au sein du site génomique AAVS1, un site *Safe harbor* n'affectant pas le phénotype cellulaire (**Figure 3.1**). Ce design permet la sélection des clones ayant bien intégré la cassette au site d'intérêt et d'exprimer les gènes d'intérêt dans un ratio stœchiométrique. La mise au point de cet outil a toutefois malheureusement dû être mise de côté temporairement pour des raisons de temps à la suite de plusieurs tentatives infructueuses d'insertion dans les cellules primaires, malgré des preuves d'insertion dans des lignées contrôle.

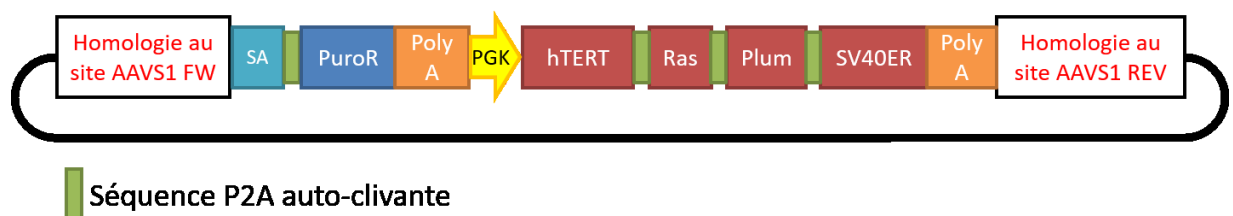


Figure 3.1 Design de cassette polycistronique pour transformation cellulaire

Schématisme de la cassette d'insertion au site AAVS1 pour la sélection des clones recombinants et l'expression des proto-oncogènes d'intérêt. Plasmide d'insertion original fourni par Yannick Doyon (Université Laval). SA : site accepteur d'épissage; PuroR : gène de résistance à la puromycine; Poly A : séquence initiatrice de polyadénylation; PGK : promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase 1; Plum : protéine fluorescente mPlum; P2A : séquence peptidique virale auto-clivante.

Cet outil permettrait dans un premier temps de déterminer quels niveaux d'expression des transgènes sont nécessaires pour mener à la transformation cellulaire et si le dosage de certaines de ces protéines permettent une transformation moins agressive. Ceci peut être fait en identifiant les insertions homo- vs hétérozygotes ou en faisant varier le promoteur d'expression. S'il s'avère que l'expression de cette cassette est suffisante pour mener à la transformation cellulaire, il serait aussi envisageable d'y substituer un promoteur inductible plutôt que le promoteur ubiquitaire PGK. Cela permettrait de générer une lignée cellulaire (primaire ou iPSC) pré-transformée stable pouvant être facilement transformée à la suite de la différenciation sans égard à la permissivité à la transduction ou à la transfection.

Une autre approche pour améliorer le processus de transformation serait d'adapter les oncogènes employés au type tumoral d'intérêt. L'approche 4T est robuste, mais aucunement spécifique. Or, la plupart des tumeurs possèdent des mutations souvent spécifiques selon le type de cancer, permettant de les classifier. Dans une récente publication, Bailey *et al.* ont identifié 299 gènes *drivers* – qui procurent un avantage sélectif et promeuvent l'émergence ou la croissance tumorale – suite à l'analyse bioinformatique de plus de 9 000 tumeurs de 33 types différents [386]. On y identifie plusieurs gènes mutés dans de nombreux cancers (p53 étant le plus représenté à 37,5%) et plusieurs spécifiquement mutés dans certains types ou familles de cancers. Notons par exemple l'implication d>IDH1, ATRX et EGFR notamment dans les cancers du SNC comme le glioblastome et les gliomes de bas grade [386, 387] ou de CTNNB1, NFE2L2, APOB et ALB dans les carcinomes hépatocellulaires du foie [386]. L'utilisation de ces données pour le développement de stratégies de transformation pourrait hypothétiquement améliorer la qualité phénotypique des tumeurs générées. La transduction lentivirale et la délétion ou l'insertion spécifique par CRISPR/Cas9 des formes associées aux tumeurs des gènes évoqués précédemment pourraient donc être utilisés pour raffiner la procédure de transformation tumorale dans nos modèles.

3.2 Processus de transformation

Certaines observations pertinentes ont aussi été faites par rapport au processus de transformation tumorale. Tout d'abord, nous avons observé que la transformation tumorale ne

pouvait s'opérer que sur des cellules en prolifération. Ainsi, les populations cellulaires quiescentes ou sénescents semblaient impossibles à transformer et s'avéraient donc incapables de réactiver le processus de mitose. Quatre exemples de ce phénomène peuvent être soulevés. Premièrement, l'ordre d'insertion des transgènes s'avère important : il est connu que la transduction de Ras oncogénique dans un premier temps mène à une crise mitogénique induisant la sénescence des cellules dont les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (voies p53 et p16 notamment) sont fonctionnels. Ce phénotype s'avère irréversible par l'addition de SV40ER, même si celui-ci inhibe efficacement les voies p53 et pRB (en aval de p16) [388, 389]. Cela suggère qu'une fois les mécanismes de sénescence enclenchés par un stress oncogénique, ceux-ci ne peuvent être renversés, contrairement à la sénescence réplivative [390]. La transformation cellulaire nécessite donc l'inhibition des voies de suppression tumorale par SV40ER avant l'ajout du signal oncogénique Ras.

Le second cas observé où le taux de prolifération semble influencer sur l'efficacité du processus de transformation concerne les fibroblastes de peaux provenant de différentes origines. Dans un premier temps, nous avons observé que les fibroblastes de peau adultes provenant de biopsies avaient un taux de croissance *in vitro* inférieur aux cellules isolées du derme fœtal. Bien que les deux populations soient prolifératives *in vitro* et permissives à la transformation, générant des lignées cellulaires capables de former des tumeurs *in vivo*, nous avons observé de façon constante une cinétique de croissance tumorale plus rapide et agressive chez les tumeurs issues de tissu fœtal, le plus souvent dû à un raccourcissement de la période de latence tumorale. Quelques facteurs pourraient expliquer cette observation et devraient être approfondis pour déterminer la source de ce phénomène. Nous suspectons que la transformation d'une population moins différenciée serait plus efficace et flexible, dû à une plus grande plasticité génétique grâce aux mécanismes épigénétiques déjà impliqués dans le processus de différenciation. Cela générerait des populations avec une plus grande capacité d'adaptation dans un nouvel environnement (*in vitro* vs. *in vivo*) et ainsi une plus courte latence relativement à cette adaptation. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions dans un premier temps évaluer des marqueurs de maturité sur les différentes populations transformées et non transformées par immunofluorescence, cytométrie en flux ou génotypage permettant d'établir si les populations d'origine sont significativement différentes. Cela permettrait aussi de déterminer si les lignées

transformées ont aussi des phénotypes moléculaires différents qui pourraient expliquer cette variation *in vivo*. L'expression de gènes de remodelage épigénétique par qPCR ou Western blot et le séquençage d'accessibilité de la chromatine (ATAC-seq) seraient aussi des pistes pour vérifier si des variations épigénétiques entre les populations mères et transformées pourraient être à la source de ce phénotype.

Troisièmement, la transformation des cellules hépatiques dérivées d'iPSC s'est avérée impossible en fin de différenciation. Les cellules cessant de proliférer au-delà du stade de progéniteurs, nous nous sommes avérés incapable d'initier leur transformation par l'ajout de SV40ER au-delà de ce point (**Figure 3.2**). Quelques hypothèses peuvent être suggérées pour expliquer ce résultat. D'abord, il est possible que l'arrêt de prolifération au-delà du stade de progéniteurs hépatiques lors de la différenciation terminale des cellules implique des mécanismes moléculaires indépendants de p53 et pRB, les cibles de SV40 LgT. Alternativement, il est possible que la différenciation *in vitro* induise une accumulation de p16 et que l'arrêt de croissance observé soit relié à un phénotype sénescence et non quiescent des cellules différenciées. L'expression de p16 étant corrélée avec l'irréversibilité du phénotype sénescence [390], cela expliquerait l'incapacité de SV40ER de promouvoir la prolifération cellulaire. L'investigation des niveaux d'expression de p16 par qPCR au fil de la différenciation permettrait de facilement répondre à cette hypothèse.

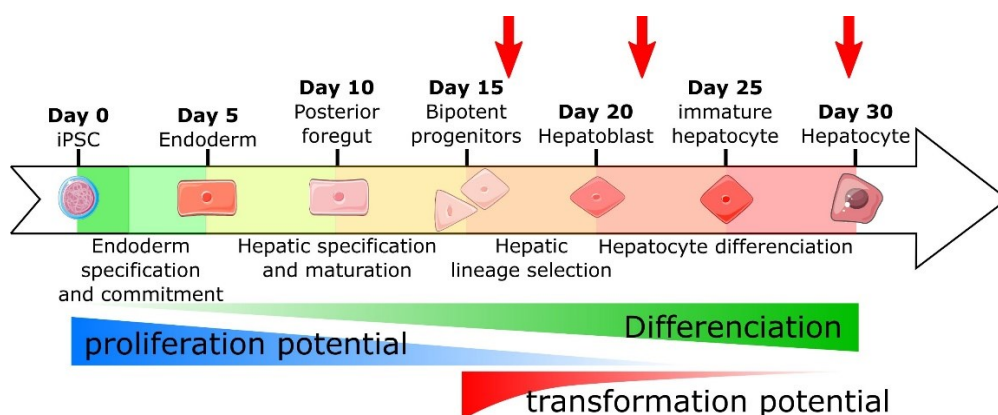


Figure 3.2 Potentiel de transformation tumorale des hépatocytes dérivés d'iPSC

Schéma de différenciation hépatocytaire des iPSC indiquant les tentatives d'initiation de la transformation tumorale par transduction avec SV40ER (flèches rouges). Alors que la transformation s'avère relativement efficace (suite à la page suivante)

à jour 16-17 (multiples colonies émergentes), elle l'est significativement moins dès jour 22 (rares colonies obtenues entre toutes les tentatives) et n'a jamais été observée à jour 30. À noter que les contrôles de transduction se sont toujours montrés comparables aux différents temps.

Le quatrième exemple de la nécessité pour les cellules de proliférer pour être transformées est la transformation des astrocytes primaires ou dérivés d'iPSC. Dans les deux cas, on retrouve deux sous-populations. La première est proliférative et exprime des niveaux faibles de GFAP – un marqueur d'astrocytes matures – et la deuxième est non-proliférative, et bien différenciée avec un cytoplasme étendu avec des projections cellulaires et riche en GFAP par immunofluorescence. Or, dans toutes les tentatives de transformation cellulaire, seule la première sous-population menait à l'obtention de colonies transformées exprimant des niveaux faibles de GFAP et une morphologie très indifférenciée. Le phénotype peu différencié obtenu à la suite de la transformation pourrait donc être dû principalement à la sous-population ayant été transformée plutôt qu'à un processus de dédifférenciation de cellules différenciées.

Ces exemples d'incapacité de cellules quiescentes ou sénescents à subir une transformation tumorale pourraient toutefois être le résultat d'artéfacts attribuables au processus de culture cellulaire *in vitro*. Pour confirmer cette hypothèse, nous croyons qu'il serait possible d'utiliser l'approche d'insertion spécifique de la cassette 4T, discutée précédemment, dans la population mère des cellules différenciées. Soit à l'aide de promoteurs spécifiques à la lignée différenciée ou d'un promoteur inductible; l'expression des transgènes pourrait être contrôlée et le potentiel de différenciation ainsi évalué. Nous croyons aussi qu'il serait possible d'injecter les cellules progénitrices non-transformées de façon orthotopique chez la souris (dans l'organe où elles seraient normalement retrouvées) et de laisser la différenciation s'opérer naturellement avant d'induire l'expression des transgènes *in vivo* pour voir si le potentiel de transformation est amélioré. Des approches de différenciation *in vivo* d'iPSC ont déjà été démontrées comme résultant en un phénotype plus mature que lors de différenciations *in vitro* pour des cellules souches neuronales et des cardiomyocytes [391, 392], il s'agit donc d'une approche envisageable pour d'autres types cellulaires.

À ce sujet, d'autres types cellulaires seraient aussi pertinents à étudier comme modèles tumoraux induits. Parmi ceux-ci, notons les mélanocytes afin de générer des mélanomes qui

sont des tumeurs largement ciblées en immuno-oncologie et pour lesquels des protocoles de différenciation sont présentement à l'essai au laboratoire. Alternativement, la transformation de cellules épithéliales du poumon [393], du petit intestin [394] ou des canaux pancréatiques [395], par exemple, pourraient servir à modéliser des carcinomes pulmonaires, adénocarcinomes du colon ou du pancréas respectivement. Aussi, bien que les tumeurs liquides (leucémies, lymphomes, myélomes) aient aujourd'hui des pronostics plutôt favorables, il demeure pertinent de modéliser ces cancers pour identifier des approches d'immunothérapie efficaces, peu toxiques et durables qui pourraient éviter le recours aux greffes de moelle. Puisque toutes ces tumeurs sont issues d'une même source cellulaire, la cellule souche hématopoïétique (HSC) CD34⁺, pour laquelle des protocoles de différenciation à partir d'iPSC ont été décrits [396], il devient aussi envisageable d'appliquer une approche similaire de transformation tumorale. La différenciation partielle ou complète de ces HSC en progéniteurs engagés dans différentes lignées permettrait probablement la modélisation de différents cancers hématologiques. L'obtention de HSC aurait aussi l'avantage énorme de permettre une reconstitution hématopoïétique sans avoir recours aux niches hématopoïétiques du donneur. On pourrait ainsi imaginer l'administration de HSC CD34⁺ dérivés d'iPSC d'un donneur initial à des souris immunodéficientes (modèle Hu-CD34) et l'administration de différentes lignées cancéreuses définies génétiquement (glioblastomes, carcinomes hépatiques, pulmonaires, pancréatiques, etc.) sans même avoir recours au donneur initial. Cette avenue est présentement à l'étude dans le laboratoire.

Finalement, nous avons émis l'hypothèse que la dérive génétique de nos différentes lignées au fil du temps pourrait expliquer une certaine variabilité intra- et inter-tumorale. L'aspect multi-lobulaire notamment des tumeurs sous-cutanées est un indice de la clonalité de cette croissance tumorale et donc du processus de sélection qui doit s'y dérouler. Afin de vérifier cette hypothèse, plusieurs approches pourraient être utilisées. Dans un premier temps, afin de mesurer l'ampleur du phénomène de façon longitudinale, une approche de « *barcoding* » moléculaire de la population transformée. Ceci peut être fait par la transduction des cellules avec une librairie lentivirale contenant des codes uniques soit avant la transformation (pour voir l'efficacité du processus de transformation) ou immédiatement après l'établissement de la lignée 4T pour fournir de l'information sur la clonalité de la population obtenue et son évolution au fil

du temps ou à la suite d'un passage *in vivo*. De façon plus poussée, le génotypage ou le séquençage de la population à différents temps ou à la suite d'un passage *in vivo* ou un traitement permettrait d'évaluer l'impact génétique de cet évènement. L'impact du système immunitaire sur le phénotype tumoral, notamment sur l'acquisition d'une résistance immunitaire pourrait aussi être évalué par des expériences de transplantation secondaires de tumeurs issues de souris NSG sans reconstitution ou Auto-AT dans de nouveaux hôtes Auto-AT. Cela permettrait de valider la présence d'un processus d'immunoédition tumorale dans ce modèle. En comparant ainsi des cellules issues de tumeurs primaires sensibles versus résistantes au SI face à un nouveau challenge immunitaire on pourrait dissocier la composante cellulaire de la composante microenvironnementale dans notre modèle.

3.3 Rejet tumoral

Tel que discuté précédemment, la capacité des modèles tumoraux générés dans nos travaux à être rejetés par un système immunitaire autologue soulève quelques interrogations. Qu'est-ce qui est reconnu par le système immunitaire dans ces tumeurs? Comment expliquer l'ubiquité et l'efficacité de la réponse contre les tumeurs 4T avec l'injection d'aussi peu que 5 millions de PBMCs, soit 2-3 millions de lymphocytes T? Est-ce que d'autres types cellulaires sont impliqués dans ce processus? En considérant que l'approche 4T pour la transformation des cellules primaires ou dérivées d'iPSC implique l'expression de transgènes ainsi que l'utilisation de lentivirus, il est probable que la méthode de transformation en soi soit responsable de la réponse anti-tumorale. Plusieurs protéines transgéniques exprimées par les cellules tumorales pourraient induire une réponse immunitaire : SV40 LgT et SmT, mPlum, la luciférase et la protéine fluorescente verte (GFP) coexprimée avec la luciférase dans certains de nos modèles. L'immunogénicité de GFP a été démontrée par plusieurs études [397] et une étude a décrit l'immunogénicité de la luciférase *firefly* utilisée dans nos travaux [398]. Ces dernières étant utilisées pour les modèles hépatiques, NSC/Astro et fibroblastiques systémiques, elles sont absentes des tumeurs sous-cutanées. Il est donc peu probable qu'elles soient les seules sources d'immunogénicité tumorale. Aucune information n'a toutefois pu être trouvée sur l'immunogénicité de mPlum ou de la protéine fluorescente rouge monomérique (mRFP) de

laquelle mPlum a été dérivée [399]. L'immunogénicité de SV40 LgT a aussi été décrite, principalement pour l'épitope immunodominant IV [400], mais aucune donnée spécifique n'a pu être trouvée pour SmT. Finalement, l'utilisation de vecteurs viraux pour la transduction des transgènes pourrait être une source d'immunogénicité. Toutefois, la présence de protéines virales dans ce contexte est transitoire et de relativement courte durée puisqu'aucun gène lentiviral n'est intégré au génome. Il est donc peu probable que cela contribue significativement au rejet observé. Outre l'implication directe du processus de transformation, il est probable que celui-ci mène aussi à l'expression d'antigènes associés aux tumeurs (TAA) et que ceux-ci augmentent au fil du temps à cause de l'instabilité génétique inhérente à la transformation cellulaire. Il serait présomptueux de spéculer sur la nature de ces TAA dans le cas présent, mais il pourrait s'agir de protéines de fusion dues à des translocations chromosomiales, de protéines mutées, de la réactivation de gènes embryonnaires ou de l'expression aberrante de régions normalement non-codantes [401]. L'apparition de ces TAA étant principalement stochastique, il est peu probable, encore une fois, qu'il s'agisse du mécanisme commun principal pour la reconnaissance immunitaire des tumeurs induites. Différentes approches -omiques permettraient peut-être d'identifier les variations entre cellules rejetées et non-rejetées pouvant expliquer ce phénotype. Par exemple, l'immunoprotéomique permettrait d'identifier les peptides présentés par les cellules tumorales. Cette technique requiert cependant une grande quantité de cellules, probablement inatteignable pour les tumeurs rejetées. La présence d'ARN messagers ou non-codant aberrants pourrait aussi être détectée par séquençage d'ARN entre différentes populations. La validation de ces résultats serait toutefois ardue étant probablement attribuable à un ensemble de facteurs. De plus, un changement dans la population tumorale n'implique pas forcément une altération de la réponse immunitaire. Il faudrait ainsi valider les cibles identifiées avec les TIL associés à cette tumeur. L'étude de la population immunitaire est donc inévitable dans ce contexte.

Différentes approches sont envisageables pour qualifier et quantifier la diversité et la conservation de la réponse anti-tumorale entre différents échantillons ou lignées tumorales. L'isolement de TIL des différentes tumeurs est fait de façon routinière et permet l'analyse phénotypique et fonctionnelle de l'infiltrat tumoral. L'évaluation de la clonalité des TIL par séquençage des TCR dans les cellules individuelles à l'aide de techniques de séquençage de

cellules uniques sur plusieurs échantillons d'une même lignée et de différentes lignées permettrait d'identifier si un ou des épitopes dominants sont conservés entre les lignées ou entre donneurs ainsi que d'évaluer la richesse de la réponse immunitaire pour chaque échantillon. L'utilisation de substituts de complexes HLA-épitope (tétramères, pentamères ou lignées cellulaires) permettrait quant à elle d'identifier *in vitro* la nature des épitopes reconnus par les TIL. Alors qu'il est toujours impossible de déterminer la nature de l'épitope reconnu par un TCR à l'aide de sa séquence, de nombreux groupes développent aujourd'hui des outils bioinformatiques pour répondre à cette problématique. Il y a fort à parier qu'un algorithme sera bientôt disponible à cet effet considérant l'abondance de données corrélatives à ce sujet depuis quelques années (quelques pré-publications à ce sujet sont d'ailleurs disponibles sur BioRxiv en date d'août 2019 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/433706v1> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/650861v2> <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/542332v1>).

D'autres facteurs influant sur le rejet tumoral ont aussi été identifiés au cours de cette thèse. D'abord, le taux de croissance et la taille de la tumeur avaient un impact significatif sur l'efficacité de rejet. Sans surprise, plus une tumeur était de grande taille ou avait une croissance rapide, moins son rejet par les cellules immunitaires était efficace. L'équilibre entre l'élimination et la prolifération dicte si la tumeur peut croître ou si elle est éliminée. Une lignée plus agressive sera donc évidemment favorisée en dépit d'une réaction immunitaire fonctionnelle. Ainsi, l'importance de connaître les cinétiques de croissance tumorale et de reconstitution immunitaire sont primordiales pour l'utilisation de ces modèles. Fait intéressant toutefois, dans les souris immunodéficientes utilisées (NSG), la taille des tumeurs était aussi corrélée avec une infiltration de cellules immunitaires murines importantes ainsi qu'une splénomégalie marquée tant dans les animaux humanisés que chez les contrôles. Une tentative de caractérisation de ces cellules murines a révélé l'expression du marqueur B220 sur ces cellules, soit un marqueur de cellules B à tout stade de maturation. Or, les NSG ne permettant pas la maturation des lymphocytes B, les cellules présentes sont probablement une population pro-B avant réarrangement et donc probablement non-fonctionnelle. Leur infiltration massive des tumeurs est toutefois problématique, car elle semble limiter la capacité d'infiltration des cellules humaines et donc diminuer le rejet. Il est donc important que la reconstitution humaine

atteigne un niveau suffisant avant que les tumeurs ne soient trop importantes et que l'infiltration murine ne soit problématique.

Par ailleurs, la localisation de la croissance tumorale a aussi un impact sur l'efficacité de son rejet. L'injection sous-cutanée, par exemple, entraîne un délai potentiel de la réponse immunitaire car les cellules effectrices dépendent de l'angiogenèse pour accéder à la tumeur, laissant ainsi à la tumeur plus de temps pour s'établir avant d'être confrontée au système immunitaire. À l'opposé, l'injection systémique de cellules tumorales mène à la formation de tumeurs directement dans les organes irrigués, notamment le foie et les poumons comme nous l'avons observé dans la figure 2 du second article. Nous avons toutefois remarqué une variation dans l'efficacité de la réponse anti-tumorale en fonction du tissu touché dans ces animaux. En effet, les tumeurs pulmonaires furent efficacement éliminées par le système immunitaire alors que nombre de ces animaux ont tout de même développé des tumeurs hépatiques importantes. Le foie étant considéré comme un organe de tolérance immunitaire [402] dû à différents mécanismes d'immunosuppression, cela peut expliquer les résultats obtenus. Nous nous serions attendus à obtenir des résultats similaires à la suite de l'injection intrahépatique de cellules hépatiques tumorales dérivées d'iPSC (iHep 4T). Or, l'expérience menée à cet effet nous a plutôt montré une élimination presque complète des tumeurs hépatiques dans ce modèle (article 1, figure 3). Ces expériences doivent être répétées avant de tirer des conclusions.

Finalement, l'identification des types cellulaires impliqués dans la réponse anti-tumorale et l'amélioration de la reconstitution immunitaire des souris sont aussi des aspects importants pour l'avenir de ces modèles. Tel qu'illustré dans l'introduction de cette thèse, de nombreux types cellulaires sont impliqués dans la réponse anti-tumorale à différents stades. Les NK sont des effecteurs importants de la réponse anti-tumorale dans le processus immunoédition et leur utilisation thérapeutique en clinique est prometteuse [403]. Dans nos modèles, toutefois, le rôle des NK semble peu essentiel à la réponse anti-tumorale. Tout d'abord, comme nous avons pu l'observer dans nos modèles, il est connu que les souris BLT reconstituent très mal le compartiment NK [404]. Or, ces souris BLT sont tout de même en mesure d'éliminer de nombreuses tumeurs. L'absence quasi-totale de cellules NK (CD3⁻CD56⁺) dans l'infiltrat tumoral des souris Auto-AT, alors qu'on en retrouve dans leur sang, est aussi un indicateur que ces cellules ne sont pas impliquées dans le rejet tumoral. Finalement, des essais *in vitro* de

cytotoxicité de cellules NK contre certaines lignées tumorales d'origine fibroblastiques ont révélé peu ou pas d'activité dans ces conditions (données non montrées). Pour valider ces résultats, nous pourrions simplement procéder à la déplétion des cellules NK des PBMC injectés aux souris dans un modèle Auto-AT. Il est toutefois aussi probable que les NK aient un effet synergique dans la réponse anti-tumorale avec les lymphocytes T. La déplétion des NK permettrait aussi de vérifier cette hypothèse. De façon complémentaire, l'inhibition ou la déplétion des lymphocytes T dans les PBMC injectés pourrait aussi nous informer sur l'implication d'autres types cellulaires dans le rejet tumoral. Finalement, l'utilisation de modèles pouvant soutenir la maturation des NK, notamment par l'expression d'IL-15 ou d'IL-2 humains [405, 406], serait un atout pour les modèles futurs.

3.4 Stroma tumoral

Finalement, les travaux présentés dans cette thèse n'ont pas pris en compte la nature du stroma tumoral. Il va sans dire que celui-ci est d'origine murine comme pour n'importe quel autre modèle humain chez la souris. Même dans les modèles PDX, le stroma humain, peu ou non prolifératif, est complètement remplacé par un stroma murin en aussi peu que 3 à 5 passages selon les cas [407]. Il est donc difficile d'étudier l'implication du stroma normal dans ce genre de modèles. En ayant accès aux cellules saines du donneur, les modèles que nous avons développés permettent de combiner des cellules transformées et non transformées lors de l'injection. On peut ainsi étudier l'impact d'un stroma humain autologue sur la croissance tumorale et sur la réponse immunitaire ainsi que d'évaluer l'impact de modifications de ce stroma, par exemple à la suite de l'induction d'une sénescence. Des travaux sont déjà en cours dans le laboratoire sur le modèle de tumeurs fibroblastiques en coinjection avec des fibroblastes non transformés autologues. Les travaux préliminaires encourageants révèlent non seulement la persistance des cellules non transformées plusieurs semaines après l'injection, mais aussi un impact significatif sur la croissance tumorale. Bien que le stroma comporte de nombreux types cellulaires et composantes moléculaires, la modélisation ne serait-ce que partielle de certaines de ces composantes (ex. cellules non transformées + système immunitaire) représente un progrès significatif dans le domaine.

Chapitre 4 : Conclusion

La nécessité de modéliser les interactions immunitaires entre un patient et sa tumeur est un défi de taille. Il s'agit néanmoins d'une étape importante dans le développement d'approches thérapeutiques efficaces. Les travaux présentés dans cette thèse constituent un effort pour répondre à cette lacune actuelle.

Nous avons dans un premier temps démontré la possibilité de générer plusieurs lignées tumorales à partir d'un donneur sain (Objectif 1, Article 1). La transformation de fibroblastes primaires a servi de point de départ pour cette procédure, mais nous avons aussi démontré la possibilité d'utiliser des iPSC pour générer différentes lignées cellulaires transformées à partir d'un même donneur. Grâce à cette approche, nous avons pu produire des lignées tumorales hépatiques, neurales et astrocytaires génétiquement définies et simples d'entretien. Il s'agit d'une première dans le domaine ouvrant la porte à une myriade d'applications, d'expansion et de raffinements éventuels.

Nous avons aussi démontré la possibilité de combiner, dans un modèle murin, une tumeur et un système immunitaire provenant du même donneur sain à l'aide de deux approches d'humanisation immunitaire : le transfert adoptif de cellules immunitaires du sang matures et la reconstitution immunitaire à l'aide de cellules souches et de thymus fœtaux (Article 1). Dans les deux cas, des tumeurs autologues furent reconnues, infiltrées et rejetées par le système immunitaire implanté via l'implication des lymphocytes T principalement. Or, l'absence de rejet tumoral complet dans une majorité d'animaux soulève la capacité de ces cellules tumorales à évader efficacement la réponse immunitaire. Cette croissance tumorale était associée à un phénotype marqué de dysfonction lymphocytaire – caractérisé par l'expression de PD-1 et Tim3 par les lymphocytes T – ainsi qu'à une accumulation de types cellulaires immunosuppresseurs – comme les lymphocytes T régulateurs – dans toutes les tumeurs analysées. Ces observations récapitulent la capacité des tumeurs cliniques à induire un microenvironnement immunosuppresseur et par conséquent valident la pertinence de nos modèles pour l'étude de la réactivation d'une réponse anti-tumorale efficace.

La validation de la capacité de ces modèles à servir de plateforme préclinique d'évaluation de l'efficacité d'immunothérapies contre le cancer étant nécessaire, nous les avons mis à l'épreuve dans trois contextes distincts pour évaluer l'immunomodulation thérapeutique. Premièrement, l'inhibition de points de contrôle immunitaires (thérapie anti-PD-1) dans un contexte *in vivo* a provoqué une augmentation de l'infiltration tumorale, mais n'a pas engendré de variation significative de la croissance (Article 1). Deuxièmement, l'expression par les lignées cancéreuses neurales du marqueur tumoral GD2 a permis la génération de lymphocytes T autologues exprimant un récepteur d'antigène chimérique (CAR-T cell) contre cette cible. L'évaluation de l'efficacité cytotoxique de ces CAR-T cell a révélé une spécificité appréciable (Article 1), mais aussi une variabilité dans la réponse anti-GD2 qui sera validée et approfondie. Finalement, cette approche a aussi permis de démontrer que malgré des propriétés immunomodulatrices bien établies, les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) n'ont pas d'impact sur la croissance de tumeurs d'origine fibroblastique en présence d'un système immunitaire autologue ou allogénique (Article 2). La présence d'un microenvironnement immunosuppresseur au sein des tumeurs fibroblastiques semble suffisamment robuste pour ne pas être affectée par l'ajout de MSC.

En somme, nous croyons que la justesse, la fiabilité, la flexibilité et l'accessibilité sont des caractéristiques importantes d'un modèle biologique sur lesquelles l'approche décrite dans cette thèse est fondée. Les modèles décrits représentent une base solide pour l'amélioration des approches précliniques en immuno-oncologie pour un développement plus rapide, robuste et sécuritaire de nouvelles immunothérapies contre le cancer.

Bibliographie

1. OMS. Cancer: Organisation Mondiale de la Santé; 2018 [7 avril 2019]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. NCI. Defining Cancer: National cancer Institute; 2007 [7 avril 2019]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
3. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
4. Training NCIS. Cancer Classification 2018 [April 24, 2019]. Available from: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>.
5. Ashkenazi R, Gentry SN, Jackson TL. Pathways to tumorigenesis--modeling mutation acquisition in stem cells and their progeny. *Neoplasia (New York, NY)*. 2008;10(11):1170-82.
6. Michor F, Iwasa Y, Rajagopalan H, Lengauer C, Nowak MA. Linear model of colon cancer initiation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2004;3(3):358-62.
7. Spencer SL, Berryman MJ, García JAA, Abbott D. An ordinary differential equation model for the multistep transformation to cancer. *Journal of theoretical biology*. 2004;231(4):515-24. doi: 10.1016/j.jtbi.2004.07.006.
8. Balmain A, Barrett CJ, Moses H, Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? implications from human cancer data. *Molecular Carcinogenesis*. 1993;7(3):139-46. doi: 10.1002/mc.2940070303.
9. Cancer K-AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2001.
10. Surget S, Khoury MP, Bourdon J-CC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets and therapy*. 2013;7:57-68. doi: 10.2147/OTT.S53876.
11. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999;400(6743):464-8. doi: 10.1038/22780. PubMed PMID: 10440377.
12. Hahn W, Weinberg R. Rules for making human tumor cells. *The New England journal of medicine*. 2002;347(20):1593-603. doi: 10.1056/NEJMra021902.
13. Rich JN, Guo C, McLendon RE, Bigner DD, Wang XF, Counter CM. A genetically tractable model of human glioma formation. *Cancer research*. 2001;61(9):3556-60.
14. Lizardi CM, Downie DL, Qualman S, Bentley RC, Counter CM. Genetic modeling of human rhabdomyosarcoma. *Cancer research*. 2005;65(11):4490-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3194.
15. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming M, Zimonjic D, Donaher J, et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & development*. 2001;15(1):50-65. doi: 10.1101/gad.828901.

16. Lundberg AS, Randell SH, Stewart SA, Elenbaas B, Hartwell KA, Brooks MW, et al. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene*. 2002;21(29):4577-86. doi: 10.1038/sj.onc.1205550.
17. MacKenzie KL, Franco S, Naiyer AJ, May C, Sadelain M, Rafii S, et al. Multiple stages of malignant transformation of human endothelial cells modelled by co-expression of telomerase reverse transcriptase, SV40 T antigen and oncogenic N-ras. *Oncogene*. 2002;21(27):4200-11. doi: 10.1038/sj.onc.1205425.
18. Rabson AS, Kirschstein RL. Induction of malignancy in vitro in newborn hamster kidney tissue infected with simian vacuolating virus (SV40). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1962;111:323-8.
19. Rabson AS, O'Connor GT, Kirschstein RL, Branigan WJ. Papillary ependymomas produced in *Rattus (Mastomys) natalensis* inoculated with vacuolating virus (SV40). *Journal of the National Cancer Institute*. 1962;29:765-87.
20. Poulin DL, DeCaprio JA. Is There a Role for SV40 in Human Cancer? *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(26):4356-65. doi: 10.1200/JCO.2005.03.7101.
21. Shah K, Nathanson, N. HUMAN EXPOSURE TO SV40: REVIEW AND COMMENT. *American journal of epidemiology*. 1976. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112197.
22. Sullivan CS, Pipas JM. T Antigens of Simian Virus 40: Molecular Chaperones for Viral Replication and Tumorigenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002;66(2):179-202. doi: 10.1128/MMBR.66.2.179-202.2002.
23. Zalvide J, Stubdal H, DeCaprio JA. The J Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen Is Required To Functionally Inactivate RB Family Proteins. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(3):1408-15. doi: 10.1128/MCB.18.3.1408.
24. Ahuja D, Sáenz-Robles M, Pipas J. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*. 2005;24(52):7729-45. doi: 10.1038/sj.onc.1209046.
25. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278(5701):261-3.
26. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979;17(1):43-52.
27. Bargonetti J, Reynisdóttir I, Friedman PN, Prives C. Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes & development*. 1992;6(10):1886-98.
28. Rushton JJ, Jiang D, Srinivasan A, Pipas JM, Robbins PD. Simian virus 40 T antigen can regulate p53-mediated transcription independent of binding p53. *Journal of virology*. 1997;71(7):5620-3.
29. Arroyo JD, Hahn WC. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene*. 2005;24(52):7746-55. doi: 10.1038/sj.onc.1209038.

30. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*. 2005;118(5):843-6. doi: 10.1242/jcs.01660.
31. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*. 1989;49(17):4682-9.
32. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-13. PubMed Central PMCID: PMC3907856.
33. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from Immortal Cells. *Science*. 2007;315(5820):1850-3. doi: 10.1126/science.1138596.
34. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nature genetics*. 1997;17(4):498-502. doi: 10.1038/ng1297-498.
35. Kirkpatrick KL, Mokbel K. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2001;27(8):754-60. doi: 10.1053/ejso.2001.1151.
36. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*. 1996;18(2):173-9. doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3.
37. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European journal of cancer*. 1997;33(5):787-91. doi: 10.1016/S0959-8049(97)00062-2.
38. Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Letters*. 2003;194(2):155-62. doi: 10.1016/S0304-3835(02)00702-4.
39. Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(5):311-6. doi: 10.1038/nrc3944.
40. Corpet DE, Pierre F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2005;41(13):1911-22. doi: 10.1016/j.ejca.2005.06.006.
41. Jin K, Teng L, Shen Y, He K, Xu Z, Li G. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clinical and Translational Oncology*. 2010. doi: 10.1007/s12094-010-0540-6.
42. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British journal of cancer*. 2001;84(10):1424-31. doi: 10.1054/bjoc.2001.1796.

43. Lai Y, Wei X, Lin S, Qin L, Cheng L, Li P. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):106. doi: 10.1186/s13045-017-0470-7.
44. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *The American Journal of Pathology*. 2007;170(3):793804. doi: 10.2353/ajpath.2007.060929.
45. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models*. 2003.
46. Kung AL. Practices and pitfalls of mouse cancer models in drug discovery. *Advances in cancer research*. 2007;96:191-212. doi: 10.1016/S0065-230X(06)96007-2.
47. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of experimental medicine*. 1953;97(5):695-710. doi: 10.1084/jem.97.5.695.
48. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1991;83(11):757-66. doi: 10.1093/jnci/83.11.757.
49. Venditti JM. The National Cancer Institute antitumor drug discovery program, current and future perspectives: a commentary. *Cancer treatment reports*. 1983.
50. Venditti JM, Wesley RA, Plowman J. Current NCI preclinical antitumor screening in vivo: results of tumor panel screening, 1976-1982, and future directions. *Advances in pharmacology and chemotherapy*. 1983;20:1-20.
51. Ben-David U, Beroukhim R, Golub TR. Genomic evolution of cancer models: perils and opportunities. *Nature reviews Cancer*. 2018. doi: 10.1038/s41568-018-0095-3.
52. Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*. 2018;560(7718):325-30. doi: 10.1038/s41586-018-0409-3.
53. Killion JJ, Radinsky R, and Reviews F-IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1998.
54. new drugs H-RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Investigational new drugs*. 1999.
55. Teicher BA. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval. *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval*. 2013.
56. Rangarajan A, Weinberg RA. Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(12):952-9. doi: 10.1038/nrc1235.

57. Brown JR, Thornton JL. Percivall Pott (1714-1788) and Chimney Sweepers' Cancer of the Scrotum. *British Journal of Industrial Medicine*. 1957;14(1):68. doi: 10.1136/oem.14.1.68.
58. Cook JW, Hieger I, Kennaway EL, Mayneord WV. The Production of Cancer by Pure Hydrocarbons.--Part I. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1932;111(773):455-84. doi: 10.1098/rspb.1932.0068.
59. medical journal K-E. The identification of a carcinogenic compound in coal-tar. *British medical journal*. 1955.
60. Miller JA, Miller EC. The metabolism and carcinogenicity of p-dimethylaminoazobenzene and related compounds in the rat. *Cancer research*. 1947;7(1):39-41.
61. Sasaki T, Yoshida T. Experimentelle Erzeugung des Lebercarcinoms durch Fütterung mit o-Amidoazotoluol. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*. 1935;295(2):175-200. doi: 10.1007/BF01893253.
62. Miller JA, in cancer research M-EC. The carcinogenic aminoazo dyes. *Advances in cancer research*. 1953.
63. Weisburger EK, in cancer research W-JH. Chemistry, carcinogenicity, and metabolism of 2-fluorenamine and related compounds. *Advances in cancer research*. 1958.
64. Nettleship A, Henshaw PS, Meyer HL. Induction of Pulmonary Tumors in Mice With Ethyl Carbamate (Urethane). *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1943. doi: 10.1093/jnci/4.3.309.
65. Berenblum I, journal of cancer S-P. A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *British journal of cancer*. 1947.
66. Verma AK, Carcinogenesis B-RK. Effects of dose and duration of treatment with the tumor-promoting agent, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1980. doi: 10.1093/carcin/1.3.271.
67. Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nature Protocols*. 2009;4(9). doi: 10.1038/nprot.2009.120.
68. Magee PN, Barnes JM. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British journal of cancer*. 1956;10(1):114-22. doi: 10.1038/bjc.1956.15.
69. Brookes P, Lawley PD. Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1964;202:781-4.
70. Goshman LM, Heidelberger C. Binding of tritium-labeled polycyclic hydrocarbons to DNA of mouse skin. *Cancer research*. 1967;27(9):1678-88.
71. Balmain A, Pragnell IB. Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature*. 1983;303(5912):72-4.

72. Brown K, Buchmann A, Balmain A. Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(2):538-42. doi: 10.1073/pnas.87.2.538. PubMed PMID: 2105486; PubMed Central PMCID: PMC53300.
73. Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, Balmain A. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene*. 1991;6(12):2363-9.
74. Zarbl H, Sukumar S, Arthur AV, Martin-Zanca D, Barbacid M. Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature*. 1985;315(6018):382-5.
75. Kemp CJ. *Animal Models of Chemical Carcinogenesis: Driving Breakthroughs in Cancer Research for 100 Years*. Cold Spring Harbor Protocols. 2015;2015(10). doi: 10.1101/pdb.top069906.
76. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(9):645-58. doi: 10.1038/nrc2192.
77. Zhang W, Moore L, journal of cancer J-P. Mouse models for cancer research. *Chinese journal of cancer*. 2011. doi: 10.5732/cjc.011.10047.
78. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(12):5547-51. doi: 10.1073/pnas.89.12.5547. PubMed PMID: 1319065; PubMed Central PMCID: PMC49329.
79. Heineke J, reviews cell biology M-JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006.
80. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992;356(6366):215-21. doi: 10.1038/356215a0.
81. Tennant RW, Stasiewicz S, Mennear J, French JE, Spalding JW. Genetically altered mouse models for identifying carcinogens. *IARC scientific publications*. 1999;(146):123-50.
82. Kelly-Spratt KS, Gurley KE, Yasui Y, biology K-CJ. p19 Arf suppresses growth, progression, and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and-independent pathways. *PLoS biology*. 2004.
83. Busch SE, Gurley KE, Moser RD, Kemp CJ. ARF suppresses hepatic vascular neoplasia in a carcinogen-exposed murine model. *The Journal of pathology*. 2012;227(3):298-305. doi: 10.1002/path.4024.
84. Busch SE, Moser RD, Gurley KE, Kelly-Spratt KS, Liggitt HD, Kemp CJ. ARF inhibits the growth and malignant progression of non-small-cell lung carcinoma. *Oncogene*. 2014;33(20):2665. doi: 10.1038/onc.2013.208.
85. Dexter DL, Diamond M, Creveling J, new drugs C-SF. Chemotherapy of mammary carcinomas arising in ras transgenic mice. *Investigational new drugs*. 1993.

86. Roper J, in pharmacological sciences H-KE. Priceless GEMMs: genetically engineered mouse models for colorectal cancer drug development. Trends in pharmacological sciences. 2012.
87. Denis EC, Fabrice P. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2005;41(13):1911-22. doi: 10.1016/j.ejca.2005.06.006.
88. Venditti JM, Kline I, research G-A. Evaluation of antileukemic agents employing advanced leukemia L1210 in mice. VIII. Cancer research. 1964.
89. Zubrod CG. Chemical control of cancer. Chemical control of cancer. 1973.
90. Long VN, Claire LC, Peter E, David JK, Davide P, Nagarajan K, et al. DNA barcoding reveals diverse growth kinetics of human breast tumour subclones in serially passaged xenografts. Nature communications. 2014;5:5871. doi: 10.1038/ncomms6871.
91. journal of cancer B-MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. European journal of cancer. 2004.
92. Lai Y, Wei X, Lin S, Qin L, Cheng L, Li P. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. Journal of hematology & oncology. 2017;10(1). doi: 10.1186/s13045-017-0470-7.
93. Dürig J, Ebeling P, Grabellus F, Sorg UR, research M-M. A novel nonobese diabetic/severe combined immunodeficient xenograft model for chronic lymphocytic leukemia reflects important clinical characteristics of the Cancer research. 2007. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1198.
94. Chapuy B, Cheng H, Watahiki A, Ducar MD, Blood T-Y. Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease. Blood. 2016.
95. Cavalloni G, Peraldo-Neia C, Sassi F, Chiorino G, Sarotto I, Aglietta M, et al. Establishment of a patient-derived intrahepatic cholangiocarcinoma xenograft model with KRAS mutation. BMC Cancer. 2016;16:90. doi: 10.1186/s12885-016-2136-1. PubMed PMID: 26868125; PubMed Central PMCID: PMC4750214.
96. Fu X, Guadagni F, Hoffman RM. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89(12):5645-9. doi: 10.1073/pnas.89.12.5645. PubMed PMID: 1608975; PubMed Central PMCID: PMC49349.
97. Tignanelli CJ, Herrera Loeza SG, Yeh JJ. KRAS and PIK3CA mutation frequencies in patient-derived xenograft models of pancreatic and colorectal cancer are reflective of patient tumors and stable across passages. Am Surg. 2014;80(9):873-7. PubMed PMID: 25197873; PubMed Central PMCID: PMC4425299.
98. Seol HS, Kang HJ, Lee SI, Kim NE, Kim IT, letters C-SM. Development and characterization of a colon PDX model that reproduces drug responsiveness and the mutation profiles of its original tumor. Cancer letters. 2014.

99. Dong R, Qiang W, Guo H, Xu X, Kim JJ, Mazar A, et al. Histologic and molecular analysis of patient derived xenografts of high-grade serous ovarian carcinoma. *Journal of hematology & oncology*. 2016;9(1):92. doi: 10.1186/s13045-016-0318-6. PubMed PMID: 27655386; PubMed Central PMCID: PMC5031262.
100. Ketao J, Lisong T, Yanping S, Kuifeng H, Zhenzhen X, Guangliang L. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clinical and Translational Oncology*. 2010. doi: 10.1007/s12094-010-0540-6.
101. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
102. Kim J, Hoffman JP, Alpaugh KR, Rhim AD, Reichert M, Stanger BZ, et al. An iPSC Line from Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoes Early to Invasive Stages of Pancreatic Cancer Progression. *Cell reports*. 2013;3(6):2088-99. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.036.
103. Kim JJ. Applications of iPSCs in Cancer Research: Supplementary Issue: Stem Cell Biology. *Biomarker insights*. 2015.
104. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, et al. Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell*. 2014;156(4):663-77. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.005.
105. Lee D-F, Su J, Kim H, Chang B, Papatsenko D, Zhao R, et al. Modeling Familial Cancer with Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*. 2015;161(2):240-54. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.045.
106. Berdasco M, Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental cell*. 2010;19(5):698-711. doi: 10.1016/j.devcel.2010.10.005.
107. Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR, Entwisle S, Chan K, Cianci A, et al. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature Biotechnology*. 2014;33(1):58-63. doi: 10.1038/nbt.3070.
108. Chen Y, Tristan CA, Mallanna SK, Ormanoglu P, Titus S, Simeonov A, et al. Neural Stem Cells, Methods and Protocols. *springer*. 2019:59-72. doi: 10.1007/978-1-4939-9007-8_5.
109. Bottenstein JE. *Cell Culture in the Neurosciences*. *springer*. 1985:3-43. doi: 10.1007/978-1-4613-2473-7_1.
110. Krencik R, Zhang S-C. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*. 2011;6(11):1710. doi: 10.1038/nprot.2011.405.
111. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, et al. Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness. *Cell Stem Cell*. 2013;12(4):487-96. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.009.

112. Roybon L, Lamas NJ, Garcia-Diaz A, Yang E, Sattler R, Jackson-Lewis V, et al. Human Stem Cell-Derived Spinal Cord Astrocytes with Defined Mature or Reactive Phenotypes. *Cell reports*. 2013;4(5):1035-48. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.021.
113. Liao M-C, Muratore CR, Gierahn TM, Sullivan SE, Srikanth P, Jager PL, et al. Single-Cell Detection of Secreted A β and sAPP α from Human iPSC-Derived Neurons and Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 2016;36(5):1730-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2735-15.2016.
114. Jones VC, Atkinson-Dell R, Verkhatsky A, Mohamet L. Aberrant iPSC-derived human astrocytes in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*. 2017;8(3):e2696. doi: 10.1038/cddis.2017.89. PubMed PMID: 28333144; PubMed Central PMCID: PMC5386580.
115. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasalTM, a new serum-free medium combination. *Journal of neuroscience research*. 1993;35(5):567-76. doi: 10.1002/jnr.490350513.
116. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnology*. 2005;23(12). doi: 10.1038/nbt1163.
117. Tanaka M, Miyahima A. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. springer. 2003:39-52. doi: 10.1007/s10254-003-0013-1.
118. Siller R, Greenhough S, Naumovska E, Sullivan GJ. Small-Molecule-Driven Hepatocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4(5):939-52. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.001.
119. Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, reports T-K. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. *Scientific reports*. 2017.
120. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*. 2013;34(7):1781-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.029.
121. Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, et al. Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPSC-derived hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(47):16772-7. doi: 10.1073/pnas.1413481111.
122. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309-22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
123. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
124. Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology*. 2004;126(4):1005-14.
125. Beaugerie L, Svrcek M, Seksik P, Bouvier A-MM, Simon T, Allez M, et al. Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of

- patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013;145(1):166-320130816. doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.044.
126. Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(7):511-8. doi: 10.1038/nrc3536.
127. Stewart T, Tsai SC, Grayson H, Henderson R, Opelz G. Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. *Lancet (London, England)*. 1995;346(8978):796-8.
128. Gallagher B, Wang Z, Schymura MJ, Kahn A, Fordyce EJ. Cancer incidence in New York State acquired immunodeficiency syndrome patients. *American journal of epidemiology*. 2001;154(6):544-56. doi: 10.1093/aje/154.6.544.
129. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*. 2013;19(11). doi: 10.1038/nm.3394.
130. Dumont N, Liu B, Defilippis RA, Chang H, Rabban JT, Karnezis AN, et al. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia (New York, NY)*. 2013;15(3):249-62.
131. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*. 1998;94(6):715-25.
132. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer cell*. 2010;17(2):135-47. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.041.
133. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature cell biology*. 2013;15(6):637-46. doi: 10.1038/ncb2756.
134. Qian B-ZZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
135. Lewis C, Murdoch C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *The American journal of pathology*. 2005;167(3):627-35. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62038-X.
136. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, cell L-JN. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell*. 2005.
137. Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine*. 2006;4(1):38. doi: 10.1186/1741-7015-4-38.
138. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(17):6392-7. doi: 10.1073/pnas.0802047105. PubMed PMID: 18427106; PubMed Central PMCID: PMC2359811.

139. Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016;40:41-8. doi: 10.1016/j.copbio.2016.02.007.
140. Flier JS, Underhill LH, Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *The New England journal of medicine*. 1986;315(26):1650-9. doi: 10.1056/NEJM198612253152606.
141. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 2002;3(11):991-8. doi: 10.1038/ni1102-991.
142. Burnet M. Cancer—A Biological Approach*. *British Medical Journal*. 1957;1(5023):841. doi: 10.1136/bmj.1.5023.841.
143. Thomas L. In: Lawrence HS, editor. *Cellular and humoral aspects of hypersensitive states*. New York: A Hoeber-Harper Book; 1959. p. 529-32.
144. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research*. 1970;13:1-27.
145. of the Institute S-O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *Journal of the National Cancer Institute*. 1979. doi: 10.1093/jnci/62.2.353.
146. Rygaard J, Povlsen CO. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section B: Microbiology and immunology*. 1974;82(1):99-106.
147. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science (New York, NY)*. 1974;183(4124):534-6.
148. Penn I. Sarcomas in organ allograft recipients. *Transplantation*. 1995;60(12):1485-91.
149. Penn I. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation*. 1996;61(2):274-8.
150. Pham SM, Kormos RL, Landreneau RJ, Kawai A, Gonzalez-Cancel I, Hardesty RL, et al. Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer. *The Annals of thoracic surgery*. 1995;60(6):1623-6. doi: 10.1016/0003-4975(95)00120-4.
151. Andrés A. Cancer incidence after immunosuppressive treatment following kidney transplantation. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2005;56(1):71-85. doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.11.010.
152. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996;77(7):1303-10. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5.
153. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(16):3491-4.

154. Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *International journal of cancer*. 1991;49(1):44-9.
155. Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O. MCA Sarcomas Induced in scid Mice are More Immunogenic than MCA Sarcomas Induced in Congenic, Immunocompetent Mice. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1997;45(4):463-70. doi: 10.1046/j.1365-3083.1997.d01-419.x.
156. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White MJ, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107. doi: 10.1038/35074122.
157. Street S, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon γ . *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(1):129-34. doi: 10.1084/jem.20020063.
158. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology*. 2004;22:329-60. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
159. Harshman LC, Drake CG, Choueiri TK. PD-1 blockade in renal cell carcinoma: to equilibrium and beyond. *Cancer immunology research*. 2014;2(12):1132-41. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0193.
160. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-64.
161. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature immunology*. 2001;2(4):293-9. doi: 10.1038/86297.
162. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. 2001;413(6852):165-71. doi: 10.1038/35093109.
163. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(15):7673-8. doi: 10.1073/pnas.93.15.7673.
164. Qin Z, Blankenstein T. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*. 2000;12(6):677-86.
165. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*. 1996;87(9):3877-82.
166. Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(4):227-38. doi: 10.1038/nri774.
167. Penn I. The effect of immunosuppression on pre-existing cancers. *Transplantation*. 1993;55(4):742-7.
168. MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery. *The New England journal of medicine*. 2003;348(6):567-8. doi: 10.1056/NEJM200302063480620.

169. de Charette M, Houot R. Hide or defend, the two strategies of lymphoma immune evasion: potential implications for immunotherapy. *Haematologica*. 2018;103(8). doi: 10.3324/haematol.2017.184192.
170. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature immunology*. 2002;3(11):999-1005. doi: 10.1038/ni1102-999.
171. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Advances in immunology*. 2000;74:181-273.
172. Stopeck AT, Gessner A, Miller TP, Hersh EM, Johnson CS, Cui H, et al. Loss of B7.2 (CD86) and intracellular adhesion molecule 1 (CD54) expression is associated with decreased tumor-infiltrating T lymphocytes in diffuse B-cell large-cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(10):3904-9.
173. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419(6908):734-8. doi: 10.1038/nature01112.
174. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(13):7556-61. doi: 10.1073/pnas.95.13.7556.
175. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death & Differentiation*. 2015;22(4):549-59. doi: 10.1038/cdd.2015.3.
176. Chao MP, Tang C, Pachynski RK, Chin R, Blood M-R. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. *Blood*. 2011.
177. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*. 2002;8(8):793. doi: 10.1038/nm730.
178. Mao S, Yang W, Ai L, Li Z, Jin J. Transforming growth factor β type II receptor as a marker in diffuse large B cell lymphoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(12):9903-8. doi: 10.1007/s13277-015-3700-z.
179. Lech-Maranda E, Bienvenu J, Broussais-Guillaumot F, Warzocha K, Michallet A-SS, Robak T, et al. Plasma TNF-alpha and IL-10 level-based prognostic model predicts outcome of patients with diffuse large B-Cell lymphoma in different risk groups defined by the International Prognostic Index. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2010;58(2):131-41. doi: 10.1007/s00005-010-0066-1.
180. Li F, Zhang R, Li S, Liu J. IDO1: An important immunotherapy target in cancer treatment. *International Immunopharmacology*. 2017;47:70-7. doi: 10.1016/j.intimp.2017.03.024.

181. Mittal S, Marshall NA, Duncan L, Culligan DJ, Barker RN, Vickers MA. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(11):5359-70. doi: 10.1182/blood-2007-08-105395.
182. Roussel M, Irish JM, Menard C, Lhomme F, Tarte K, Fest T. Regulatory myeloid cells: an underexplored continent in B-cell lymphomas. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2017;66(8):1103-11. doi: 10.1007/s00262-017-2036-5.
183. Correia DV, Lopes A, Silva-Santos B. Tumor cell recognition by $\gamma\delta$ T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors. *Oncoimmunology*. 2013;2(1). doi: 10.4161/onci.22892.
184. Silva-Santos B, Serre K, Norell H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(11):683-91. doi: 10.1038/nri3904.
185. Rei M, Pennington DJ, Silva-Santos B. The emerging Protumor role of $\gamma\delta$ T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy. *Cancer research*. 2015;75(5):798-802. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3228.
186. Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*. 2014;40(5):785-800. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.013.
187. Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Nature S-K. CD95 promotes tumour growth. *Nature*. 2010.
188. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: Implications for immunotherapy. *International Journal of Cancer*. 2010;127(2):249-56. doi: 10.1002/ijc.25270.
189. Daniyan AF, Brentjens RJ. Immunotherapy: Hiding in plain sight: immune escape in the era of targeted T-cell-based immunotherapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017;14(6):333-4. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.49.
190. Haynes NM. Immunosuppression and Cancer. *Encyclopedia of Cancer*. 2015:1-7. doi: 10.1007/978-3-642-27841-9_3012-2.
191. Mendez R, Aptsiauri N, Campo A, Maleno I, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, et al. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2009;58(9):1507-15. doi: 10.1007/s00262-009-0701-z.
192. Hwang ML, Lukens JR, Bullock TNJ. Cognate Memory CD4+ T Cells Generated with Dendritic Cell Priming Influence the Expansion, Trafficking, and Differentiation of Secondary CD8+ T Cells and Enhance Tumor Control. *The Journal of Immunology*. 2007;179(9):5829-38. doi: 10.4049/jimmunol.179.9.5829.
193. Keene JA, Forman J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1982;155(3):768-82. doi: 10.1084/jem.155.3.768.
194. Ossendorp F, Mengedé E, Camps M, Filius R, Melief C. Specific T Helper Cell Requirement for Optimal Induction of Cytotoxic T Lymphocytes against Major Histocompatibility Complex Class II Negative Tumors. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(5):693-702. doi: 10.1084/jem.187.5.693.

195. Wang J-CE, Livingstone AM. Cutting Edge: CD4⁺ T Cell Help Can Be Essential for Primary CD8⁺ T Cell Responses In Vivo. *The Journal of Immunology*. 2003;171(12):6339-43. doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6339.
196. Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *European journal of immunology*. 2003;33(12):3225-31. doi: 10.1002/eji.200324576.
197. Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Gritzapis AD, Sotiriadou R, Papamichail M. Tumor-Specific CD4⁺ T Lymphocytes from Cancer Patients Are Required for Optimal Induction of Cytotoxic T Cells Against the Autologous Tumor. *The Journal of Immunology*. 2000;164(7):3902-12. doi: 10.4049/jimmunol.164.7.3902.
198. Bos R, Sherman LA. CD4⁺ T-Cell Help in the Tumor Milieu Is Required for Recruitment and Cytolytic Function of CD8⁺ T Lymphocytes. *Cancer research*. 2010;70(21):8368-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1322.
199. Wong JSB, Bos R, Sherman LA. Tumor-Specific CD4⁺ T Cells Render the Tumor Environment Permissive for Infiltration by Low-Avidity CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*. 2008;180(5):3122-31. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.3122.
200. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(7):1701-11. doi: 10.1084/jem.20060772.
201. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(7):1693-700. doi: 10.1084/jem.20060468.
202. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6). doi: 10.1016/S1470-2045(12)70582-X.
203. Oleinika K, Nibbs RJ, Graham GJ, Fraser AR. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clinical & Experimental Immunology*. 2013;171(1):36-45. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04657.x.
204. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(4):295-307. doi: 10.1038/nri1806.
205. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends in immunology*. 2003;24(11):603-9.
206. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annual review of immunology*. 2013;31:413-41. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951.
207. Salih HR, Rammensee H-GG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(8):4098-102. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4098.

208. Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B, et al. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer cell*. 2014.
209. Mildner A, et al. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014.
210. Mellman I, et al. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001.
211. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer cell*. 2014.
212. Dieu-Nosjean MC, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol Rev*. 2016;271(1):260-75. doi: 10.1111/imr.12405. PubMed PMID: 27088920.
213. Dieu-Nosjean M-C, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman W. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends in Immunology*. 2014;35(11):571-80. doi: 10.1016/j.it.2014.09.006.
214. Zong J, Keskinov AA, Shurin GV, Shurin MR. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(7):821-33. doi: 10.1007/s00262-016-1820-y. PubMed PMID: 26984847.
215. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Blood E-S. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*. 2006.
216. Aras S, et al. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *British journal of cancer*. 2017.
217. Wynn TA, Chawla A, Nature P-JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013.
218. Sica A, Saccani A, et al. Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *International immunopharmacology*. 2002.
219. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(7):540-50. doi: 10.1038/nrc1388.
220. Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol*. 2007;178(11):7405-11. doi: 10.4049/jimmunol.178.11.7405. PubMed PMID: 17513791.
221. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Nature Z-J. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011.
222. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(4):253-68. doi: 10.1038/nri3175.
223. Campbell MJ, Tonlaar NY, Garwood ER, Huo D, Moore DH, Khramtsov AI, et al. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2011;128(3):703-11. doi: 10.1007/s10549-010-1154-y.

224. Kim K-J, Wen X-Y, Yang H, Kim W, Kang G. Prognostic Implication of M2 Macrophages Are Determined by the Proportional Balance of Tumor Associated Macrophages and Tumor Infiltrating Lymphocytes in Microsatellite-Unstable Gastric Carcinoma. *PloS one*. 2015;10(12). doi: 10.1371/journal.pone.0144192.
225. Shigeoka M, Urakawa N, Nakamura T, Nishio M, Watajima T, Kuroda D, et al. Tumor associated macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science*. 2013;104(8):1112-9. doi: 10.1111/cas.12188.
226. Yang L, Wang F, Wang L, Huang L, Wang J, Zhang B, et al. CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients. *Oncotarget*. 2015;6(12):10592-603. doi: 10.18632/oncotarget.3547.
227. Yuan X, Zhang J, Li D, Mao Y, Mo F, Du W, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecologic oncology*. 2017;147(1):181-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.07.007.
228. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*. 2009;16(3):183-94. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.
229. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(1):284-90. doi: 10.4049/jimmunol.176.1.284.
230. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1155-66. doi: 10.1172/JCI31422.
231. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars in Immunopathology*. 2013;35(2):123-37. doi: 10.1007/s00281-012-0342-8.
232. Huang B, Lei Z, Zhao J, Gong W, Liu J, Chen Z, et al. CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer letters*. 2007;252(1):86-92. doi: 10.1016/j.canlet.2006.12.012.
233. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(10):2777-90. doi: 10.1172/JCI28828.
234. Youn J-II, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of leukocyte biology*. 2012;91(1):167-81. doi: 10.1189/jlb.0311177.
235. Narita Y, Wakita D, Ohkur T, Chamoto K, Nishimura T. Potential differentiation of tumor bearing mouse CD11b+Gr-1+ immature myeloid cells into both suppressor macrophages and immunostimulatory dendritic cells. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*. 2009;30(1):7-15.

236. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer research*. 2004;64(16):5839-49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0465.
237. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer research*. 2010;70(1):68-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2587.
238. Mazzone A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(2):689-95. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.689.
239. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer research*. 2001;61(12):4756-60.
240. Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends in immunology*. 2011;32(8):345-9. doi: 10.1016/j.it.2011.05.003.
241. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(10):1949-62. doi: 10.1084/jem.20101956.
242. Fukuda A, Wang SC, Morris JP, Folias AE, Liou A, Kim GE, et al. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer cell*. 2011;19(4):441-55. doi: 10.1016/j.ccr.2011.03.002.
243. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Immunity S-RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity*. 1994.
244. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. THE IFN γ RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Immunology*. 1997;15(1):563-91. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.563.
245. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(5). doi: 10.1038/nri1604.
246. Dunn GP, Koebel CM, Immunity S-RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*. 2006.
247. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Medicine*. 2018;7(9):4509-16. doi: 10.1002/cam4.1700.
248. Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;19(1):89. doi: 10.3390/ijms19010089.
249. Zou W, Wolchok JD, translational medicine C-L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science translational medicine*. 2016.

250. Mimura K, Teh J, Okayama H, Shiraishi K, Kua LF, Koh V, et al. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Science*. 2018;109(1):43-53. doi: 10.1111/cas.13424.
251. Trott JF, Kim J, Aboud OA, Wettersten H, Oncotarget S-B. Inhibiting tryptophan metabolism enhances interferon therapy in kidney cancer. *Oncotarget*. 2016.
252. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Dual Faces of IFN γ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(10):2329-34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0224.
253. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(5):1043-51. doi: 10.1189/jlb.0705358. PubMed PMID: 16204623.
254. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008;226:205-18. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x. PubMed PMID: 19161426; PubMed Central PMCID: PMC2724982.
255. Morel AS, Quarantino S, Douek D, Londei M. Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: Definition of a maturative step. *European journal of immunology*. 1997;27(1):26-34. doi: 10.1002/eji.1830270105.
256. Demangel C, Bertolino P, Britton WJ. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *European journal of immunology*. 2002;32(4):994-1002. doi: 10.1002/1521-4141(200204)32:4<994::AID-IMMU994>3.0.CO;2-6.
257. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(1):683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683. PubMed PMID: 11244051.
258. Mocellin S, Panelli M, Wang E, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, et al. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes Immun*. 2004;5(8):621-30. doi: 10.1038/sj.gene.6364135. PubMed PMID: 15573087.
259. Research T-BA. Transforming growth factor- β and the immune response to malignant disease. *Clinical Cancer Research*. 2007. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1654.
260. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of experimental medicine*. 1986;163(5):1037-50. doi: 10.1084/jem.163.5.1037. PubMed PMID: 2871125; PubMed Central PMCID: PMC2188095.
261. Monoclonal antibodies to treat cancer: American Cancer Society; [updated 2016-08-08/2019-06-20]. Available from: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/monoclonal-antibodies.html>.

262. Seimetz D, Lindhofer H, Bokemeyer C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM×anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer treatment reviews*. 2010;36(6):458-67. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.03.001.
263. Nagorsen D, Bargou R, Rüttinger D, Kufer P, Baeuerle PA, Zugmaier G. Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab. *Leukemia & Lymphoma*. 2009;50(6):886-91. doi: 10.1080/10428190902943077.
264. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. 2014;515(7528):577. doi: 10.1038/nature13988.
265. Society AC. Immune checkpoint inhibitors to treat cancer [updated 2018-10-012019-06-20]. Available from: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/immune-checkpoint-inhibitors.html>.
266. Joshi S, Durden DL. Combinatorial Approach to Improve Cancer Immunotherapy: Rational Drug Design Strategy to Simultaneously Hit Multiple Targets to Kill Tumor Cells and to Activate the Immune System. *Journal of Oncology*. 2019;2019:1-18. doi: 10.1155/2019/5245034.
267. Zhang G, Liu C, Bai H, Cao G, Cui R, Zhang Z. Combinatorial therapy of immune checkpoint and cancer pathways provides a novel perspective on ovarian cancer treatment. *Oncology Letters*. 2019;17(3):2583-91. doi: 10.3892/ol.2019.9902.
268. Gross G, Gorochov G, Waks T, Eshhar Z. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplantation proceedings*. 1989;21(1 Pt 1):127-30.
269. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2015;15(8):1145-54. doi: 10.1517/14712598.2015.1046430.
270. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Molecular Medicine*. 2017;9(9):1183-97. doi: 10.15252/emmm.201607485.
271. Hu Z, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2017;18(3):168. doi: 10.1038/nri.2017.131.
272. Le DT, Wang-Gillam A, Picozzi V, Greten TF, Crocenzi T, Springett G, et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria Monocytogenes*-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(12):1325-33. doi: 10.1200/JCO.2014.57.4244. PubMed PMID: 25584002; PubMed Central PMCID: PMC4397277.

273. van der Woude LL, Gorris M, Halilovic A, Figdor CG, de Vries JIM. Migrating into the Tumor: a Roadmap for T Cells. *Trends in Cancer*. 2017;3(11):797-808. doi: 10.1016/j.trecan.2017.09.006.
274. Bellone M, Calcinotto A. Ways to Enhance Lymphocyte Trafficking into Tumors and Fitness of Tumor Infiltrating Lymphocytes. *Frontiers in Oncology*. 2013;3:231. doi: 10.3389/fonc.2013.00231.
275. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, medicine G-T. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nature medicine*. 2014.
276. Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, Zhao L, Wei S, Wang W, et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature*. 2015;527(7577):249-53. doi: 10.1038/nature15520.
277. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(9):559-72. doi: 10.1038/nri.2017.49.
278. Kuczek DE, Larsen AH, Thorseth M-L, Carretta M, Kalvisa A, Siersbæk MS, et al. Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2019;7(1):68. doi: 10.1186/s40425-019-0556-6.
279. Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, et al. Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. *The American Journal of Pathology*. 2011;178(3):1221-32. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.076.
280. Ohno S, Tachibana M, Fujii T, Ueda S, Kubota H, Nagasue N. Role of stromal collagen in immunomodulation and prognosis of advanced gastric carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2002;97(6):770-4. doi: 10.1002/ijc.10144.
281. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2328-39. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.102.
282. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(6):958-65. doi: 10.1309/NB3947K383DJ0LQ2. PubMed PMID: 18024321.
283. Jung K, Cho S, Kim YA, Kim D, Oh B-C, Park D, et al. Cancers with Higher Density of Tumor-Associated Macrophages Were Associated with Poor Survival Rates. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2015;49(4):318-24. doi: 10.4132/jptm.2015.06.01.
284. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines*. 2016;4(4):36. doi: 10.3390/vaccines4040036.
285. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(25):2654-66. doi: 10.1056/NEJMoa051424.

286. Fridman W, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):298. doi: 10.1038/nrc3245.
287. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4. doi: 10.1126/science.1129139. PubMed PMID: 17008531.
288. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(6):610-8. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5425. PubMed PMID: 21245428.
289. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(1):105-13. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370. PubMed PMID: 19917869.
290. Ascierto PA, Capone M, Urba WJ, Bifulco CB, Botti G, Lugli A, et al. The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*. 2013;11(1):54. doi: 10.1186/1479-5876-11-54.
291. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. 2016;164(6):1233-47. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.049.
292. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(19):5064-74. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3271.
293. Subrahmanyam PB, Dong Z, Gusenleitner D, Giobbie-Hurder A, Severgnini M, Zhou J, et al. Distinct predictive biomarker candidates for response to anti-CTLA-4 and anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2018;6(1):18. doi: 10.1186/s40425-018-0328-8.
294. Chen P-L, Roh W, Reuben A, Cooper ZA, Spencer CN, Prieto PA, et al. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discovery*. 2016;6(8):827-37. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1545.
295. Kitano S, Nakayama T, Yamashita M. Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma. *Frontiers in Oncology*. 2018;8:270. doi: 10.3389/fonc.2018.00270.
296. Dronca RS, Liu X, Harrington SM, Chen L, Cao S, Kottschade LA, et al. T cell Bim levels reflect responses to anti-PD-1 cancer therapy. *JCI Insight*. 2016;1(6). doi: 10.1172/jci.insight.86014. PubMed PMID: 27182556; PubMed Central PMCID: PMC4863706.

297. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology*. 2004;172(5):2731-8. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731.
298. Balmain A, C.Harris C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):371-7. doi: 10.1093/carcin/21.3.371.
299. Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetical research*. 1966;8(3):295-309.
300. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*. 1995;154(1):180-91. PubMed PMID: 7995938.
301. Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith G, Demengeot J, Gottlieb TM, et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell*. 1995;80(5):813-23. doi: 10.1016/0092-8674(95)90360-7.
302. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsail BL, Russell SM, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor γ chain. *Immunity*. 1995;2(3):223-38. doi: 10.1016/1074-7613(95)90047-0.
303. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):786-98. doi: 10.1038/nri3311. PubMed PMID: 23059428; PubMed Central PMCID: PMC3749872.
304. Marodon G, Desjardins D, Mercey L, Baillou C, Parent P, Manuel M, et al. High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.gamma c-/- mice. *European journal of immunology*. 2009;39(8):2136-45. doi: 10.1002/eji.200939480.
305. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature*. 1988;335(6187):256-9. doi: 10.1038/335256a0.
306. Brehm MA, Kenney LL, Wiles MV, Low BE, Tisch RM, Burzenski L, et al. Lack of acute xenogeneic graft-versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression. *FASEB J*. 2019;33(3):3137-51. doi: 10.1096/fj.201800636R. PubMed PMID: 30383447; PubMed Central PMCID: PMC6404556.
307. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(2):118-30. doi: 10.1038/nri2017. PubMed PMID: 17259968.
308. Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, Strowig T, Gearty SV, Teichmann LL, et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):364-72. doi: 10.1038/nbt.2858. PubMed PMID: 24633240; PubMed Central PMCID: PMC4017589.
309. Billerbeck E, Barry WT, Mu K, Dorner M, Rice CM, Ploss A. Development of human CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R null humanized mice. *Blood*. 2011;117(11):3076-86. doi: 10.1182/blood-2010-08-301507.

310. Denton PW, Nochi T, Lim A, Krisko JF, Martinez-Torres F, Choudhary SK, et al. IL-2 receptor γ -chain molecule is critical for intestinal T-cell reconstitution in humanized mice. *Mucosal Immunology*. 2012;5(5):555-66. doi: 10.1038/mi.2012.31.

311. Kooreman NG, de Almeida PE, Stack JP, Nelakanti RV, Diecke S, Shao N-Y, et al. Alloimmune Responses of Humanized Mice to Human Pluripotent Stem Cell Therapeutics. *Cell reports*. 2017;20(8):1978-90. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.003.

312. Wahl A, Garcia VJ. The use of BLT humanized mice to investigate the immune reconstitution of the gastrointestinal tract. *Journal of Immunological Methods*. 2014;410:28-33. doi: 10.1016/j.jim.2014.06.009.

313. Denton PW, Krisko JF, Powell DA, Mathias M, Kwak YT, Martinez-Torres F, et al. Systemic administration of antiretrovirals prior to exposure prevents rectal and intravenous HIV-1 transmission in humanized BLT mice. *PloS one*. 2010;5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008829.

314. Becker PD, Legrand N, van Geelen CMM, Noerder M, Huntington ND, Lim A, et al. Generation of human antigen-specific monoclonal IgM antibodies using vaccinated "human immune system" mice. *PloS one*. 2010;5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013137.

315. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.

316. da Meirelles L, Chagastelles P, Nardi N. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006;119(11):2204-13. doi: 10.1242/jcs.02932.

317. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 1991;9(5):641-50. doi: 10.1002/jor.1100090504.

318. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell WJ, Katz AJ, et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*. 2001;7(2):211-28. doi: 10.1089/107632701300062859.

319. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45(2):115-20. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.

320. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001;86(10):1099-100. PubMed PMID: 11602418.

321. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem cells*. 2005;23(2):220-9. doi: 10.1634/stemcells.2004-0166. PubMed PMID: 15671145.

322. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*. 2006;24(5):1294-301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342. PubMed PMID: 16410387.
323. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem cells*. 2007;25(6):1384-92. doi: 10.1634/stemcells.2006-0709. PubMed PMID: 17332507.
324. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British journal of haematology*. 2005;129(1):118-29. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.
325. Subramanian A, Shu-Uin G, Kae-Siang N, Gauthaman K, Biswas A, Choolani M, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells do not transform to tumor-associated fibroblasts in the presence of breast and ovarian cancer cells unlike bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(6):1886-95. doi: 10.1002/jcb.24057.
326. Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(12):1477-86. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.08.048. PubMed PMID: 18022578.
327. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*. 2002;30(1):42-8. doi: 10.1016/S0301-472X(01)00769-X.
328. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2062. doi: 10.1038/cddis.2015.327. PubMed PMID: 26794657; PubMed Central PMCID: PMC4816164.
329. Selleri S, Bifsha P, Civini S, Pacelli C, Dieng MM, Lemieux W, et al. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget*. 2016;7(21):30193-210. doi: 10.18632/oncotarget.8623.
330. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunology and cell biology*. 2010;88(8):795-806. doi: 10.1038/icb.2010.47. PubMed PMID: 20386557.
331. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem cells*. 2008;26(1):212-22. doi: 10.1634/stemcells.2007-0554. PubMed PMID: 17932417.

332. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 2007;92(7):881-8. doi: 10.3324/haematol.11240.
333. Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem cells and development*. 2010;19(5):607-14. doi: 10.1089/scd.2009.0345.
334. Castro-Manrreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem cells and development*. 2014;23(11):1217-32. doi: 10.1089/scd.2013.0363.
335. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PloS one*. 2010;5(2):e9016. doi: 10.1371/journal.pone.0009016. PubMed PMID: 20126406; PubMed Central PMCID: PMC2814860.
336. Betancourt AM. New Cell-Based Therapy Paradigm: Induction of Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells into Pro-Inflammatory MSC1 and Anti-inflammatory MSC2 Phenotypes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2013;130:163-97. doi: 10.1007/10_2012_141. PubMed PMID: 22869086.
337. Chapel A, Bertho J, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *The Journal of Gene Medicine*. 2003;5(12):1028-38. doi: 10.1002/jgm.452.
338. Honeczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem cells*. 2006;24(4):1030-41. doi: 10.1634/stemcells.2005-0319. PubMed PMID: 16253981.
339. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, et al. Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;101(1):135-46. doi: 10.1002/jcb.21172.
340. Abbott DJ, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal Cell-Derived Factor-1 α Plays a Critical Role in Stem Cell Recruitment to the Heart After Myocardial Infarction but Is Not Sufficient to Induce Homing in the Absence of Injury. *Circulation*. 2004;110(21):3300-5. doi: 10.1161/01.CIR.0000147780.30124.CF.
341. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by

- transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol.* 2008;180(4):2581-7. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2581. PubMed PMID: 18250469.
342. Qiu Y, Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord blood migrate in response to complement C1q. *Cytotherapy.* 2012;14(3):285-95. doi: 10.3109/14653249.2011.651532.
343. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(19):10711-6. doi: 10.1073/pnas.96.19.10711. PubMed PMID: 10485891; PubMed Central PMCID: PMC17948.
344. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143. PubMed PMID: 10102814.
345. Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L, et al. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *Journal of cellular biochemistry.* 2005;94(4):645-55. doi: 10.1002/jcb.20315.
346. Tokcaer-Keskin Z, Akar AR, Ayaloglu-Butun F, Terzioglu-Kara E, Durdu S, Ozyurda U, et al. Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009;87(2):143-50. doi: 10.1139/Y08-111. PubMed PMID: 19234578.
347. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell.* 2007;129(7):1377-88. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.028.
348. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology.* 2008;8(9). doi: 10.1038/nri2395.
349. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(13):8932-7. doi: 10.1073/pnas.132252399. PubMed PMID: 12084934; PubMed Central PMCID: PMC124401.
350. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(46):17438-43. doi: 10.1073/pnas.0608249103. PubMed PMID: 17088535; PubMed Central PMCID: PMC1634835.
351. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006;231(1):39-49. PubMed PMID: 16380643.
352. Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des.* 2005;11(10):1255-65. doi: 10.2174/1381612053507495. PubMed PMID: 15853682.

353. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8407-11. doi: 10.1073/pnas.1432929100. PubMed PMID: 12815096; PubMed Central PMCID: PMC166242.
354. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(8):2202-12. doi: 10.1681/ASN.2005080815. PubMed PMID: 16790513.
355. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells*. 2007;25(11):2896-902. doi: 10.1634/stemcells.2007-0637. PubMed PMID: 17901396.
356. Yin S, Ji C, Wu P, Jin C, Qian H. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: bioactive ways of tissue injury repair. *American journal of translational research*. 2019;11(3):1230-40.
357. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation*. 2013;95(12):1535-41. doi: 10.1097/TP.0b013e318291a2da. PubMed PMID: 23680930.
358. Liu Y, Wu J, Zhu Y, Han J. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. *Clinical and experimental medicine*. 2014;14(1):13-24. doi: 10.1007/s10238-012-0218-1.
359. Shi M, Zhang Z, Xu R, Lin H, Fu J, Zou Z, et al. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(10):725-31. doi: 10.5966/sectm.2012-0034.
360. Connick P, Kolappan M, Patani R, Scott MA, Crawley C, He X-L, et al. The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. *Trials*. 2011;12(1):62. doi: 10.1186/1745-6215-12-62.
361. Duijvestein M, Vos AW, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 2010;59(12):1662-9. doi: 10.1136/gut.2010.215152.
362. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-86. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X. PubMed PMID: 18468541.
363. Jaganathan BG, Tisato V, Vulliamy T, Dokal I, Marsh J, Dazzi F, et al. Effects of MSC co-injection on the reconstitution of aplastic anemia patient following

- hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2010;24(10):1791-5. doi: 10.1038/leu.2010.164.
364. Pileggi A, Xu X, Tan J, Ricordi C. Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials. *Current opinion in organ transplantation*. 2013;18(6):672-81. doi: 10.1097/MOT.000000000000029.
365. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F, 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem cells*. 2011;29(1):11-9. doi: 10.1002/stem.559. PubMed PMID: 21280155; PubMed Central PMCID: PMC3059412.
366. Lee HY, Hong IS. Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Science*. 2017;108(10):1939-46. doi: 10.1111/cas.13334.
367. Lee M, Ryu S, Kim D, Lee J, Sung K, Koo H, et al. Mesenchymal stem cells in suppression or progression of hematologic malignancy: current status and challenges. *Leukemia*. 2019:1-15. doi: 10.1038/s41375-018-0373-9.
368. Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA, de Bont ES. Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;69(3):187-98. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.06.004. PubMed PMID: 18675551.
369. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaita A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood*. 2004;104(7):2084-6. doi: 10.1182/blood-2004-01-0336.
370. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2009;113(18):4197-205. doi: 10.1182/blood-2008-09-176198.
371. Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Current opinion in genetics & development*. 2009;19(1):67-73. doi: 10.1016/j.gde.2009.01.003.
372. Chen JY, Li CF, Kuo CC, Tsai KK, Hou MF, Hung WC. Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4):410. doi: 10.1186/s13058-014-0410-1. PubMed PMID: 25060643; PubMed Central PMCID: PMC34220086.
373. Choudhari S, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*. 2013;11(1). doi: 10.1186/1477-7819-11-118.
374. Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Current opinion in oncology*. 2013;25(6):637-45. doi: 10.1097/CCO.0000000000000006.
375. Owusu B, Galemno R, Janetka J, Klampfer L. Hepatocyte Growth Factor, a Key Tumor-Promoting Factor in the Tumor Microenvironment. *Cancers*. 2017;9(12):35. doi: 10.3390/cancers9040035.

376. Zhang L, Zhou F, ten Dijke P. Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends in biochemical sciences*. 2013;38(12):612-20. doi: 10.1016/j.tibs.2013.10.001.
377. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-63. doi: 10.1038/nature06188. PubMed PMID: 17914389.
378. Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia*. 2009;23(5):925-33. doi: 10.1038/leu.2008.384.
379. François S, Usunier B, Forgue-Lafitte ME, L'Homme B, Benderitter M, Douay L, et al. Mesenchymal Stem Cell Administration Attenuates Colon Cancer Progression by Modulating the Immune Component within the Colorectal Tumor Microenvironment. *Stem cells translational medicine*. 2018. doi: 10.1002/setm.18-0117.
380. Thomas DW, Burns J, Audette J, Carroll A, Dow-Hygelund C, Hay M. Clinical Development Success rates 2006-2015. In: BIO B, Amplion, editor. 2016.
381. Morton JJ, Bird G, Keysar SB, Astling DP, Lyons TR, Anderson RT, et al. XactMice: humanizing mouse bone marrow enables microenvironment reconstitution in a patient-derived xenograft model of head and neck cancer. *Oncogene*. 2016;35(3):290-300. doi: 10.1038/onc.2015.94. PubMed PMID: 25893296; PubMed Central PMCID: PMC4613815.
382. Wang M, Yao LC, Cheng M, Cai D, Martinek J, Pan CX, et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J*. 2018;32(3):1537-49. doi: 10.1096/fj.201700740R. PubMed PMID: 29146734; PubMed Central PMCID: PMC5892726.
383. Fu J, Sen R, Masica DL, Karchin R, Pardoll D, Walter V, et al. Autologous reconstitution of human cancer and immune system in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(2):2053-68. doi: 10.18632/oncotarget.14026.
384. Watanabe Y, Takahashi T, International ... O-A. The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/ γ cnul (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *International ...*. 2009. doi: 10.1093/intimm/dxp050.
385. Jespersen H, Lindberg MF, Nature ... D-M. Clinical responses to adoptive T-cell transfer can be modeled in an autologous immune-humanized mouse model. *Nature ...*. 2017.
386. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Cell S-S. Comprehensive characterization of cancer driver genes and mutations. *Cell*. 2018.
387. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016;164(3):550-63. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.028.
388. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006;444(7119):638-42. doi: 10.1038/nature05327.

389. Mallette FAA, Gaumont-Leclerc M-FF, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes & development*. 2007;21(1):43-8. doi: 10.1101/gad.1487307.
390. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*. 2003;22(16):4212-22. doi: 10.1093/emboj/cdg417. PubMed PMID: 12912919; PubMed Central PMCID: PMC175806.
391. Choi H, Hong Y, Kim J, Song H, Cho S, Bae H, et al. In vivo differentiation of induced pluripotent stem cells into neural stem cells by chimera formation. *PloS one*. 2017;12(1). doi: 10.1371/journal.pone.0170735.
392. Yu T, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, et al. In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ J*. 2013;77(5):1297-306. doi: 10.1253/circj.cj-12-0977. PubMed PMID: 23392122.
393. Ghaedi M, Calle EA, Mendez JJ, Gard AL, Balestrini J, Booth A, et al. Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(11):4950-62. doi: 10.1172/JCI68793.
394. Negoro R, Takayama K, Kawai K, Harada K, Sakurai F, Hirata K, et al. Efficient Generation of Small Intestinal Epithelial-like Cells from Human iPSCs for Drug Absorption and Metabolism Studies. *Stem Cell Reports*. 2018;11(6):1539-50. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.019.
395. Simsek S, Zhou T, Robinson CL, Tsai S-Y, Crespo M, Amin S, et al. Modeling Cystic Fibrosis Using Pluripotent Stem Cell-Derived Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(5):572-9. doi: 10.5966/sctm.2015-0276.
396. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):71. doi: 10.1186/scrt222. PubMed PMID: 23796405; PubMed Central PMCID: PMC3706875.
397. Ansari A, Ahmed KA, Matsangos AE, Lay F, Born LJ, Marti G, et al. Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2016;12(5):553-9. doi: 10.1007/s12015-016-9670-8.
398. Barrett DM, Seif AE, Carpenito C, Strong EP, June CH, Grupp SA, et al. Bioluminescent Tracking of Human and Mouse Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Potent Immunogenicity of Luciferase In Some Preclinical Models of Leukemia. *Blood*. 2010;116(21):2140-. doi: 10.1182/blood.V116.21.2140.2140.
399. Wang L, Jackson WC, Steinbach PA, Tsien RY. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(48):16745-9. doi: 10.1073/pnas.0407752101. PubMed PMID: 15556995; PubMed Central PMCID: PMC529417.

400. Schell TD, Mylin LM, Georgoff I, Teresky AK, Levine AJ, Tevethia SS. Cytotoxic T-lymphocyte epitope immunodominance in the control of choroid plexus tumors in simian virus 40 large T antigen transgenic mice. *Journal of virology*. 1999;73(7):5981-93.
401. Laumont CM, Vincent K, Hesnard L, Audemard E, Bonneil E, Laverdure JP, et al. Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Science translational medicine*. 2018;10(470). doi: 10.1126/scitranslmed.aau5516. PubMed PMID: 30518613.
402. Tiegs G, Lohse AW. Immune tolerance: What is unique about the liver. *Journal of Autoimmunity*. 2010;34(1):1-6. doi: 10.1016/j.jaut.2009.08.008.
403. Bachanova V, Miller JS. NK cells in therapy of cancer. *Critical reviews in oncogenesis*. 2014;19(1-2):133-41.
404. Wege AK, Melkus MW, Denton PW, Estes JD, Garcia JV. Functional and phenotypic characterization of the humanized BLT mouse model. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008;324:149-65. doi: 10.1007/978-3-540-75647-7_10. PubMed PMID: 18481459.
405. Herndler-Brandstetter D, Shan L, Yao Y, Stecher C, Plajer V, Lietzenmayer M, et al. Humanized mouse model supports development, function, and tissue residency of human natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(45):E9626-E34. doi: 10.1073/pnas.1705301114. PubMed PMID: 29078283; PubMed Central PMCID: PMC5692533.
406. Katano I, Takahashi T, Ito R, Kamisako T, Mizusawa T, Ka Y, et al. Predominant Development of Mature and Functional Human NK Cells in a Novel Human IL-2-Producing Transgenic NOG Mouse. *The Journal of Immunology*. 2015;194(7):3513-25. doi: 10.4049/jimmunol.1401323.
407. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discovery*. 2014;4(9):998-1013. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0001.

