

## Avis de Soutenance

Madame Marjorie LACOURREGÉ

Immunologie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

*Développement de modèles humanisés de xénogreffes de cellules tumorales humaines dans l'embryon aviaire pour récapituler le microenvironnement immunitaire et étudier sa mobilisation dans les approches d'immunothérapie*

Travaux dirigés par Madame Valérie CASTELLANI

Soutenance prévue le **lundi 29 juin 2026** à 13h30

Lieu : Médiathèque Paul Zech Faculté de médecine 8 Avenue Rockefeller 69008 LYON

### Composition du jury proposé

Mme Valérie CASTELLANI	Directrice de recherche	CNRS Lyon	Directrice de thèse
Mme Virginie PETRILLI	Directrice de recherche	CNRS Lyon	Examinatrice
Mme Sandrine ROULLAND	Directrice de recherche	INSERM Marseille	Rapporteuse
M. Lionel LE BOURHIS	Chargé de recherche	INSERM Paris	Examineur
Mme Fanny MANN	Directrice de recherche	CNRS Marseille	Rapporteuse
M. Jean-Louis BESSEREAU	Professeur des universités - praticien hospitalier	Lyon 1 Université	Examineur
M. Romain TEINTURIER	ERBC	Invité	

**Mots-clés :** Immunothérapie, Oncologie, Xénogreffe dérivée de patient, Microenvironnement tumoral, Modèle préclinique humanisé

### Résumé :

Le domaine de l'oncologie est en constante évolution. Le développement récent des immunothérapies ouvre la voie à de nouvelles stratégies fondées sur les interactions entre les cellules cancéreuses et le système immunitaire. L'anticorps anti-PD-1 constitue aujourd'hui une des principales immunothérapies. Son mécanisme d'action consiste à lever l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale en bloquant l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1. Le développement de ces thérapies, ainsi que l'identification de biomarqueurs prédictifs déterminant l'éligibilité des patients, nécessite des modèles expérimentaux permettant l'étude des communications entre cellules immunitaires et cancéreuses. Les études s'appuient principalement sur la xénogreffe de cellules tumorales dans des souris humanisées. La mise en œuvre complexe et longue de ces modèles, encadrée par une réglementation éthique stricte, limite leur déploiement en recherches précliniques. Le recours à des prélèvements de patients, et les limitations qui en

découlent en termes de prise tumorale et de reproductibilité, ajoutent un niveau de complexité. Les recherches précliniques bénéficieraient ainsi de modèles plus rapides, flexibles et compatibles avec la rationalisation de l'expérimentation animale. L'objectif de mes travaux de thèse a été de développer de nouveaux modèles d'étude en immuno-oncologie, puis d'évaluer leur adéquation à l'analyse des propriétés antitumorales des immunothérapies. Ces travaux ont été réalisés au sein de la start-up Oncofactory ERBC Lyon, qui exploite une technologie développée par un laboratoire académique affilié au CNRS et à l'UCBL1. Cette technologie consiste à micro-implanter des cellules tumorales humaines au sein de tissus choisis de l'embryon de poulet. Sur cette base, Oncofactory a développé une plateforme de création de répliques miniaturisées de tumeurs de patients (AVI-PDX) pour de nombreux types de cancers, et différentes analyses pour évaluer les effets antitumoraux de thérapies. Cependant, ces modèles initiaux ne permettent pas l'étude des immunothérapies, le système immunitaire aviaire n'étant mature qu'aux derniers jours avant l'éclosion. Nous avons donc opté pour une stratégie d'humanisation reposant sur des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains. Tout d'abord, nous avons développé des outils d'analyse par cytométrie de flux adaptés à l'étude des PBMC après leur introduction dans l'embryon de poulet. Ils ont permis de valider la faisabilité globale de notre approche. Nous avons ensuite développé deux paradigmes expérimentaux : l'un reposant sur la transplantation de cellules tumorales suivie d'une injection intraveineuse de PBMC, l'autre sur la co-transplantation de cellules cancéreuses et de PBMC dans un tissu prédéfini de l'embryon. Nous avons réalisé un ensemble d'analyses comprenant de la microscopie à feuillet de lumière sur embryons entiers, des immunomarquages sur coupes tissulaires et de la cytométrie de flux sur tumeurs microdisséquées, afin de caractériser ces deux approches et de déterminer si elles permettent l'étude des communications entre cellules tumorales et immunitaires. Nous avons ensuite évalué l'adéquation de ces modèles à l'étude des réponses aux immunothérapies. Nous avons réussi à caractériser l'action antitumorale d'un anticorps anti-PD-1 dans des modèles de xénogreffes de lignées cellulaires et de tumeurs de patients, co-transplantées avec des PBMC de donneurs sains ou autologues aux patients. Enfin, sur un groupe de tumeurs colorectales, nous avons reproduit l'hétérogénéité de réponse inter-patient, caractéristique des résultats cliniques avec ce traitement. Nos travaux rapportent ainsi la conception de nouveaux modèles intégrant la complexité et l'organisation tissulaire d'un organisme entier, qui permettront d'aborder à la fois des problématiques fondamentales de la biologie des cancers et des questions plus appliquées liées au développement de nouvelles thérapies.

### **Summary:**

The field of oncology is constantly evolving, allowing for significant advances in cancer treatment. Recently, the development of immunotherapy has led to new therapeutic strategies based on the interaction between tumor cells and the immune system. Thus, the antitumor action of immunotherapies can be highly efficient. One of the main approaches of immunotherapy is the administration of anti-PD-1 antibodies. Their mechanism of action relies on blocking the inhibition of the antitumor immune response induced by cancer cells through the interaction between PD-1 and its ligand PD-L1. The development of these therapies, as well as predictive biomarkers to identify patient eligibility, requires appropriate experimental models to study interactions between immune and cancer cells. The study mainly relied on xenotransplantation of tumor cells in mice with a human immune system incorporated. The development of these long, complex and sophisticated models, also limited by strict ethical regulations, restricts their use in preclinical research. Moreover, applying this model to patient samples introduces additional complexity due to limitations of tumor engraftment rate and reproducibility. It would be beneficial for preclinical research to use models that are more flexible, compatible and faster with the current rationalization of animal experiments. The objective of my thesis work was to develop new immuno-oncology research models and then to evaluate their ability to analyze the antitumor properties of immunotherapies. These studies were conducted at Oncofactory ERBC Lyon, a start-up that exploits a technology developed by the CNRS

and Claude Bernard University of Lyon 1 academic laboratories to study pediatric cancer. This technology involves micro-implanting human tumor cells into specific tissues of chick embryos. Based on this technology, Oncofactory developed a platform for generating miniaturized replicas of patient tumors (AVI-PDX) applicable to multiple types of cancer. The company also developed different analytical paradigms to evaluate the response to antitumor therapy. However, these initial avian models are not appropriate for studying immune-based therapies because the avian immune system only becomes fully mature during the final days before hatching. Therefore, we decided to humanize the model by injecting human immune cells (peripheral blood mononuclear cells, or PBMCs) into the chick embryo. First, we developed flow cytometry-based analysis tools to monitor PBMCs post-engraftment in the chick embryo model. These analyses allowed us to validate the feasibility of the approach. Then, we created two xenotransplantation paradigms: the first is based on tumor cell transplantation followed by intravenous injection of PBMCs, and the second is based on co-transplantation of immune and tumor cells in predefined embryo tissue. We performed a series of experiments based on light sheet microscopy of whole embryos, immunostaining on tissue sections and flow cytometry of microdissected tumor samples to characterize these two approaches and demonstrate their ability to study cancer and immune cell interactions. After validating this step, we sought to determine whether these models could enable the study of tumor response to immunotherapy. We characterized the antitumor efficacy of the anti-PD-1 antibody in xenograft models derived from cell lines or patient tumors, both co-engrafted with either PBMCs from a healthy donor or autologous cells. Finally, using a group of colorectal patient samples, we reproduced the inter-patient heterogeneous response to this type of treatment observed in clinical studies. Our work reports the development of new models that integrate the complexity and tissue organization of a whole organism. This allows us to address fundamental biological issues related to cancer and more applied questions for the development of new therapeutics.