UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Alice BENOIT**

Identification du rôle de l'hypoxie dépendante de HIF-1α dans la régulation de l'expression de ACKR2 (Atypical Chemokine Receptor 2) dans le cancer

Thèse présentée et soutenue le 26 juin 2024

Membres du jury :

Directeurs de thèse :	JANJI Bassam	Docteur, Department of Cancer Research, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg.
	VOGIN Guillaume	Directeur Général et Médical du Centre François Baclesse, Professeur et chercheur, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg
Président du jury :	SOLARY Eric	Professeur, Gustave Roussy, INSERM U1287, Paris
Rapporteurs :	LIAUDET-COOPMAN Emmanuelle	Directrice de recherche, IRCM, Inserm U1194, Montpellier
	LARUE Lionel	Directeur de recherche, Institut Curie, CNRS UMR3347, INSERM U1021, Paris
Examinateurs :	BEHRMANN Iris	Professeure, Docteure, Université du Luxembourg, Luxembourg
	DUHEM Caroline	Praticienne Hospitalière, Centre Hospitalier du Luxembourg, Luxembourg

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Bassam Janji, et mon co-directeur de thèse, le Professeur Guillaume Vogin, d'avoir cru en moi et de m'avoir donné l'opportunité d'atteindre mes ambitions professionnelles.

Je remercie également le Docteur Guy Berchem et le Docteur Elisabeth Letellier, d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail et de m'avoir donné les outils nécessaires pour progresser.

Je tiens également à remercier le Professeur Eric Solary, le Docteur Lionel Larue, le Docteur Emmanuelle Liaudet-Coopman, la Professeure Iris Berhmann ainsi que le Docteur Caroline Duhem, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Concernant mes chers collègues, je vais d'abord commencer par Malina, puisque c'est avec toi que cette folle aventure a débuté. Merci pour tous tes conseils, d'avoir partagé ton expérience et surtout merci pour tous ces moments de rire, les apéros à Thionthion, les randos, les « karaoké », tes comparaisons de Parisienne. Je n'oublie pas tous ces moments et je suis heureuse que notre amitié ait perduré au-delà du labo.

Kris, que dire, tu es celle avec qui j'ai passé le plus de temps ces 4 dernières années et qui m'a suivie du début à la fin de cette aventure… Merci pour tous tes conseils, pour tous nos moments gossip au bureau, pour tous les repas du midi passés ensemble, pour toutes nos discussions de plantes (au désespoir des autres). Tous ces moments vont énormément me manquer.

Margaux, même si tu es arrivée en cours de route, je suis vraiment heureuse d'avoir croisé ton chemin et d'avoir pu partager tous ces moments avec toi. Merci pour tous tes conseils, pour ton aide, pour me rebooster quand je doutais de moi, pour nos discussions make-up/skincare et tous nos moments à se raconter notre vie. C'était un

plaisir de partager mon quotidien avec toi, nos lunch avec Kris et nos pauses café vont me manquer.

Julie, c'est dommage que tu sois arrivée à la fin et que je n'ai pas pu passer plus de temps au labo et partager plus de choses avec toi, mais je suis contente de t'avoir connue et c'était cool de t'avoir avec nous pendant les lunch.

Eolia, ton passage dans l'équipe fut court mais pour le moins inoubliable. Merci pour ta folie et tous ces rires, tes BeReal à en pleuvoir et tes câlins (non désirés). Tu es arrivée à une période compliquée mais tu l'as rendue plus supportable et l'expérience plus belle et plus fun. Une pensée également pour Naim, c'était cool de t'avoir avec nous pendant ces quelques mois.

Alex, thank you for our daily checkups and our gossip sessions. You always make my days better with your kindness, your Instagram reels and your sarcastic jokes. I'll miss seeing you everyday.

I also would like to thank all those at LIH who took part in this adventure, whether scientifically, mentally or emotionally: Mohaned, Lara, Thomas, Andrea, Rédouane, Lucas, Manon, Diane, Delphine … I could not cite everyone but you all contributed to this journey and to who I am now, and I'll always be grateful for that.

Je tiens également à remercier mes amis, qui m'ont suivie de près ou de loin pendant toutes ces années et malgré toutes les aventures et péripéties de la vie, en particulier Jérémy et Margaux, qui ont toujours été présents malgré la distance. Une grosse pensée pour Pierre également, avec qui j'ai partagé beaucoup de moments de ma vie, notre relation a certes beaucoup évolué au fil du temps mais ton soutien a toujours été continu et je suis contente que tu fasses toujours partie de ma vie.

Last but not least, je voudrais remercier ma famille pour leur éternel soutien et leur amour. Maman, merci d'avoir toujours cru en moi et de t'être battue pour moi pendant toutes ces années, de m'avoir soutenue dans la maladie, dans les études, dans la vie. Merci d'avoir continué de croire en moi, merci de m'avoir défendue devant mes profs qui me disaient que je ne devrais pas faire un bac scientifique et que je n'irais pas loin après le bac parce que j'étais nulle en maths. Je suis malheureusement toujours nulle en maths,

mais j'ai pu réaliser mes rêves et me sentir accomplie professionnellement, et je n'aurais pas pu le faire sans toi. Juju et Clairou, merci pour votre soutien sans faille ; je sais qu'on pourra toujours compter les uns sur les autres et que même si on se voit pas souvent, vous êtes toujours là. Nadou, merci d'avoir choisi de faire partie de notre famille, je suis contente de te compter parmi nous ; et merci d'avoir mis au monde ma chère filleule et petite princesse Margaux, c'est le plus beau des cadeaux et la plus belle joie que j'ai pu expérimenter pendant cette thèse. Papa, mamie, merci également pour votre soutien au fil des années. Je sais que je n'ai pas été toujours très présente mais j'ai toujours pensé à vous.

La thèse a été pour moi le plus grand défi que j'ai rencontré dans ma vie, que ce soit scientifiquement, physiquement ou mentalement. Mais c'est aussi l'expérience la plus riche que j'ai vécue, une expérience humaine sans pareil qui nous challenge, nous questionne, nous déstabilise, nous fait relativiser, nous change, nous fait évoluer, nous fait grandir… Je remercie toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin à cette aventure, et qui ont fait de moi la personne que je suis devenue aujourd'hui.

LISTE DES TRAVAUX

PUBLICATIONS

ANNEXE I

Xiao M†, **Benoit A**†, Hasmim M, Duhem C, Vogin G, Berchem G, Noman MZ, Janji B. **Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies**. *Front Oncol*. **2021** Feb 25;11:626309.

ANNEXE II

Lequeux A, Noman MZ, Xiao M, Van Moer K, Hasmim M, **Benoit A**, Bosseler M, Viry E, Arakelian T, Berchem G, Chouaib S, Janji B. **Targeting HIF-1 alpha transcriptional activity drives cytotoxic immune effector cells into melanoma and improves combination immunotherapy**. *Oncogene*. **2021** Jul;40(28):4725-4735.

ANNEXE III

Benoit A, Vogin G, Duhem C, Berchem G, Janji B. **Lighting Up the Fire in the Microenvironment of Cold Tumors: A Major Challenge to Improve Cancer Immunotherapy**. *Cells* **2023**, 12, 1787.

ANNEXE IV

Benoit A, Lequeux A, Harter P, Berchem G, Janji B. **Atypical Chemokine Receptor 2 expression is directly regulated by Hypoxia Inducible Factor-1 alpha in cancer cells under hypoxia**. En soumission (Avril 2024)

COMMUNICATIONS ORALES

- Journée de rentrée de l'Ecole Doctorale BioSE 2020 (Nancy, France – 12 novembre 2020)
- Journée de rentrée de l'Ecole Doctorale BioSE 2021 (Nancy, France – 9 novembre 2021)

POSTERS

- FNR PRIDE-Funded CANBIO Doctoral Training Unit retreat (Luxembourg, 22 octobre 2021)
- 4th International Conference on Cytokines in Cancer (Chania, Greece – 19 mai 2022)
- 5th International Cancer Symposium (Lyon, France – 02 novembre 2022)
- Journée scientifique de l'Ecole Doctorale BioSE (Nancy, France – 03 mai 2023)

BOURSES

- LIONS Action « Vaincre le Cancer » référence n°22116290 – 12 janvier 2020
- FNRS - Fonds National de la Recherche Scientifique : « IMPACT 21: IMPROVING CANCER IMMUNOTHERAPY BY TARGETING HYPOXIA » (référence 40007581) – 07 octobre 2021
- FNRS - Fonds National de la Recherche Scientifique : « IMPACT 21-2: IMPROVING CANCER IMMUNOTHERAPY BY TARGETING HYPOXIA » (référence 40018525) – 01 novembre 2023

PRIX

- Prix Lydie et Michel Wittner 2023, Fondation de France (N° Engagement : 00147956 / EF-2023-40165) – 20 décembre 2023

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **2**
LISTE DES TRAVAUX **5**
TABLE DES MATIERES **7**
ABREVIATIONS **11**
TABLE DES ILLUSTRATIONS **20**
LISTE DES FIGURES **20**
LISTE DES TABLEAUX **22**
INTRODUCTION **23**
1. Le microenvironnement tumoral **23**
1.1. Le microenvironnement tumoral : composition 23
1.2. L'influence du microenvironnement tumoral sur la progression tumorale 25
2. L'hypoxie dans le microenvironnement tumoral **27**
2.1. La définition physiologique de l'hypoxie 27
2.2. Les facteurs de transcription intervenant dans l'adaptation à l'hypoxie : HIFs 28
2.3. L'hypoxie dans le contexte du cancer 45
3. La réponse immunitaire anti-tumorale **57**
3.1. Les bases du système immunitaire 57
3.2. Le système immunitaire dans le contexte du cancer 65
4. Les récepteurs de chimiokines : classiques versus atypiques **74**
4.1. Les chimiokines : structure et fonctions 74
4.2. Les récepteurs de chimiokines conventionnels 75
4.3. Les récepteurs de chimiokines atypiques (ACKRs) 87
4.4. La fonction des ACKRs dans le développement tumoral 95
4.5. La régulation des ACKRs par l'hypoxie 101
OBJECTIFS DE LA THESE **103**
MATERIEL ET METHODES **105**
1. Matériel **105**
1.1. Lignées cellulaires 105

1.2. Amorces pour RT-qPCR 106
1.3. Particules lentivirales 107
1.4. Cytométrie en flux 108
2. Méthodes 110
2.1. Culture des lignées cellulaires 110
2.2. Analyse de la croissance cellulaire par CellTiter-Glo® 110
2.3. Induction de l'hypoxie 111
2.4. Induction de stress nutritionnel 111
2.5. Transfection de petits ARNs interférants (*siRNA*) 111
2.6. Transduction de particules lentivirales 112
2.7. RT-qPCR 113
2.8. Détection des protéines par Western Blot 114
2.9. Mesure de la concentration en cytokines par ELISA 117
2.10. Évaluation de la concentration en cytokines/chimiokines par *Cytokine array* 117
2.11. Perméabilisation et fixation des cellules pour le marquage de ACKR2 et l'analyse de son expression par cytométrie en flux 117
2.12. Marquage des tumeurs par immunohistochimie 118
2.13. Immunoprécipitation de chromatine-qPCR (ChIP-qPCR) 119
2.14. Séquençage de l'ARN 123
2.15. Analyse des tumeurs par NanoString 123
2.16. Analyses statistiques 124
RESULTATS 125
1. L'hypoxie entraîne une surexpression de ACKR2 dans différents types de cellules cancéreuses murines et humaines 125
1.1. Les promoteurs humains et murins de *ACKR2* présentent des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) 125
1.2. L'établissement des conditions expérimentales hypoxiques 127
1.3. ACKR2 est surexprimé par des cellules cancéreuses murines et humaines de mélanome en hypoxie 130
1.4. ACKR2 est surexprimé par des cellules cancéreuses murines et humaines de cancer colorectal en hypoxie 133
1.5. ACKR2 est surexprimé par des cellules cancéreuses murines et humaines de cancer du sein triple négatif en hypoxie 135
1.6. L'augmentation de ACKR2 en hypoxie résulte en une baisse du niveau de CCL5 138

2. La suppression de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α dans des cellules de TNBC et de mélanome hypoxiques entraîne une diminution de l'expression de ACKR2 140

2.1. Une diminution de l'expression de ACKR2 dépendante de l'hypoxie *in vitro* est observée dans les cellules 4T1 ainsi que B16-F10 HIFΔ 140

2.2. La surexpression de ACKR2 dans les cellules présentant une inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α permet d'évaluer l'influence de ACKR2 sur le paysage chimiokinique 145

3. La délétion de HIF-1α engendre une baisse de l'expression de ACKR2 dépendante de l'hypoxie dans des tumeurs de mélanome murin 150

4. ACKR2 est directement régulé par HIF-1α en hypoxie mais pas par HIF-2α, ni par d'autres voies importantes dans la progression tumorale 152

4.1. ACKR2 est directement régulé par le facteur de transcription HIF-1α en hypoxie dans les cellules B16-F10 152

4.2. HIF-2α n'est pas impliqué dans la régulation de ACKR2 dans les cellules CT26 en hypoxie. 156

4.3. L'induction de l'autophagie par stress nutritionnel n'a pas d'impact sur l'expression de ACKR2 pour les cellules CT26 158

5. L'étude de la régulation de ACKR2 présente un intérêt clinique majeur 160

5.1. L'expression de *ACKR2* est positivement corrélée à l'expression de *CA9* dans des échantillons de patients atteints de TNBC 160

5.2. L'expression de ACKR2 et d'autres gènes impliqués dans la signature hypoxique sont positivement corrélées dans les cancers du sein et de mélanome d'après les données TCGA 161

5.3. L'expression de ACKR2 est corrélée à l'infiltration de certains types de cellules immunitaires chez les patients de la cohorte BRCA et SKCM 166

6. Résultats supplémentaires : Analyse des différences transcriptomiques dans les cellules et les tumeurs de mélanome résultant de l'inhibition de HIF-1α 171

6.1. Analyse des différences transcriptomiques dans les tumeurs de mélanome délétées en HIF-1α 171

6.2. Analyse des différences transcriptomiques dans les cellules de mélanome délétées en HIF-1α 175

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 181

1. La surexpression de ACKR2 en hypoxie 181

2. L'aspect fonctionnel de la régulation de ACKR2 en hypoxie 183

3. L'expression de ACKR2 au niveau des tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ 185

4. La régulation directe de ACKR2 par HIF-1α en hypoxie 187

5. L'expression de ACKR2 chez les patients atteints de TNBC et les patients de cohortes TCGA 189

6. La dualité des ACKRs dans la progression tumorale 190
7. La compétition et la dimérisation des récepteurs de chimiokines..... 193
8. La régulation de ACKR2 : implication de la voie K-ras/B-raf/ERK 194
9. Les stratégies thérapeutiques possibles..... 194
CONCLUSION 197
REFERENCES 199
ANNEXE I..... 231
ANNEXE II..... 246
ANNEXE III..... 266
ANNEXE IV 289
ANNEXE V : Curriculum vitæ..... 304
Résumé..... 307
Abstract..... 307

ABREVIATIONS

Nombres

18S ARN ribosomal 18S

2OG 2-Oxoglutarate

A

AA Acides aminés

ACC Carcinome corticosurrénalien

ACKR *Atypical Chemokine Receptor*

ADCC *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*

ADM Adrénomédulline

AND Acide désoxyribonucléique

ADNc Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADRA1B Récepteur α1B-adrénergique

AK3 Adénylate kinase 3

AKT *Protein Kinase B*

ALDOA Aldolase A

ALDOC Aldolase C

AMPK *AMP-activated protein kinase*

ANGPTL4 *Angopoietin-like 4*

APC *Allophycocyanin*

ARD1 *Arrest-Defective-1 Protein*

ARN Acide ribonucléique

ARNT *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*

ATCC *American Type Culture Collection*

ATM *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATMIN *ATM interactor protein*

ATP Adénosine Triphosphate

ATR *Ataxia Telangiectasia and RAD-3 related*

Protéine associée à l'ataxie télangectasie et à RAD-3

B

BCL2 *B-cell lymphoma 2*

BCR *B-cell receptor*

BER *Base excision repair*

Bhlh *basic-Helix-Loop-Helix*

BLCA Carcinome urothélial de la vessie

BNIP3 *BCL2 interacting protein 3*

BMP *Bone Morphogenetic Protein*

BRCA Carcinome invasif du sein

BRCA1 *Breast Cancer Associated 1*

BRCA2 *Breast Cancer Associated 2*

BSA *Bovine serum albumin*

BSL2+ *Biosafety Level 2+*

C

C5aR2 *Complement C5a Receptor 2*

CA9 *Carbonic anhydrase 9*

CAFs *Cancer-associated fibroblasts*

CBP *CREB-binding protein*

CCBP2 *Chemokine Binding Protein 2*

CCRL2 *CC motif chemokine Receptor-like 2*

CD *Cluster of differentiation*

cDCs Cellules dendritiques conventionnelles

CDKN1A *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*

CESC Carcinome épidermoïde cervical et adénocarcinome endocervical

ChIP Immunoprécipitation de chromatine

CHOL Cholangiocarcinome

CK1δ Caséine kinase 1

CMH Complexe majeur d'histocompatibilité

CO_2 Dioxyde de carbone

COAD Adénocarcinome du côlon

CP Céruléoplasmine

CPA Cellules présentatrices d'antigènes

CSCs Cellules souches cancéreuses

CTAD *C-terminal Transactivation Domain*

CTLA-4 *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

CMKLR1 *Chemerine chemokine like receptor 1*

D

D-2HG D-2-hydroxyglutarate

DAMP *Damage-Associated Molecular Patterns*

DARC *Duffy Antigen Receptor for Chemokines*

DDIT4 *DNA damage inducible transcript 4*

DDR *DNA damage response*

DLBC Lymphome diffus à grandes cellules B

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DSB *Double strand break*

E

EBV *Epstein-Barr virus*

EDN1 Endothéline-1

EGFR *Epithelial Growth Factor Receptor*

Eif4e *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E*

ELISA *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMT *Epithelial to mesenchymal transition*

ENO1 *Enolase 1*

ENO2 *Enolase 2*

EPAS1 *Endothelial PAS domain-containing protein 1*

EpCAM *Epithelial cell adhesion molecule*

EPO Erythropoïétine

ERK *Extracellular-signal-regulated-kinase*

ERO1L *Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1*

ESCA Carcinome de l'œsophage

F

FC *Fold change*

FGF *Fibroblast Growth Factor*

FH *Fumarate hydratase*

FIH-1 Facteur inhibiteur de HIF-1

FITC *Fluorescein isothiocyanate*

G

GAPDH Glycéraldhéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GBM Glioblastome

GFP *Green Fluorescent Protein*

GLUT1 *Glucose transporter 1*

GLUT3 *Glucose transporter 3*

GPR1 *G Protein-Coupled Receptor 1*

GPR182 *Orphan G Protein-Coupled Receptor 182*

GSEA *Gene Set Enrichment Analysis*

GSK-3 Glycogène synthase kinase 3

GZMK Granzyme K

H

H2AX *H2A histone family member X*

HAS *HIF ancillary sequence*

HBS *HIF-1 binding site*

HBSS *Hanks' Balanced Salt Solution*

HDAC Histone désacétylase

HIFs *Hypoxia-inducible factors*

HILPDA *Hypoxia Inducible Lipid Droplet Associated*

HK1 *Hexokinase 1*

HK2 *Hexokinase 2*

HLA *Major Histocompatibility Complex*

HLA-DMA *Major Histocompatibility Complex, Class II, DM Alpha*

HLA-DMB *Major Histocompatibility Complex, Class II, DM Beta*

HLA-DOA	*Major Histocompatibility Complex, Class II, DO Alpha*
HLA-DOB	*Major Histocompatibility Complex, Class II, DO Beta*
HMOX1	Héme oxygénase-1
HNSC	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou
HRE	*Hypoxia Response Elements* Eléments de réponse à l'hypoxie
HRR	Réparation par recombinaison homologue
HSP	*Heat-shock protein* Protéine de choc thermique
HTLV	*Human T-cell leukemia virus*

I

ICOS	*Inducible T-cell COStimulator*
iDCs	Cellules dendritiques inflammatoires
IDH	Isocitrate déshydrogenase
IFN	Interféron
IGF2	*Insulin-like growth factor 2*
IGFBP	*IGF binding protein*
IL	Interleukine
IRES	*Internal ribosomal entry site*
IRF9	Facteur de régulation de l'interféron 9
ISGF3	*Interferon-stimulated gene factor 3*

J

JAK	*Janus kinases*

K

KAR	*Killer Cell Activating Receptors*
KICH	Carcinome rénal chromophobe
KIR	*Killer Ig-like Receptors*
KIRC	Carcinome rénal à cellules claires
KIRP	Carcinome papillaire du rein
KSHV	*Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*

L

L-2HG	L-2-hydroxyglutarate
LAG-3	*Lymphocyte-activation gene 3*
LARC	*Liver and activation-regulated chemokine*
LAML	Leucémie myéloïde aiguë
LANA	*Latency-associated nuclear antigen*
LDHA	Lactate déshydrogénase A
LGG	Gliome de bas grade
LIGIV	ADN ligase IV
LIHC	Carcinome hépatocellulaire du foie
LKB1	*Liver kinase B1*
LMP1	*Latent membrane protein 1*
LSD1	*Lysine-specific demethylase-1*

LUAD	Adénocarcinome pulmonaire
LUSC	Carcinome épidermoïde du poumon
LY6E	*Lymphocyte antigen 6 complex locus E*

M

MAPK	*Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCAST	*Motif Cluster Alignment and Research Tool*
MDR1	*MultiDrug Resistance 1*
MDSCs	Cellules suppressives d'origine myéloïde
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*
MESO	Mésothéliome
MLH1	*mutL homolog 1*
mmHg	millimètres de Mercure
MMP	Métalloprotéase
MMR	Réparation par mésappariement
MoDCs	Cellules dendritiques dérivées de monocytes
MOI	*Multiplicity of infection*
MSH	*MutS homolog*
MTH1	*MutT homolog 1*
mTORC1	*Mammalian target of rapamycin complex 1*
MXI1	*MAX interactor 1*

N

NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit
ND6	Sous-unité 6 de la NADH-déshydrogénase
NDRG1	*N-myc downstream regulated 1*
NEAA	*Non-Essential Amino Acids*
NEMO	*NFκB essential modulator*
NER	Réparation par excision de nucléotides
NFκB	*Nuclear factor-κB* Facteur nucléaire kappa B
NGS	*Next-Generation Sequencing*
NHEJ	Réparation par jonction non-homologue
NIH	*National Institute of Health*
NK	*Natural Killer*
NLS	*Nuclear localization* sequence Signal de localisation nucléaire
NOS2	Nitric oxyde synthase 2
NQO1	*NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1*
NRF-1	*Nuclear factor erythroid 2-related factor 1*
NRF-2	*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

NTAD	*N-terminal Transactivation domain*

O

O_2	Dioxygène
OCT-4	*Octamer-binding transcription factor 4*
ODD	*Oxygen-dependent degradation domain*
OGG1	*Oxoguanine glycosylase*
OH	Groupe hydroxyle
ORF	Cadre de lecture ouvert
OS	*Overall survival*
OV	Cystadénocarcinome séreux de l'ovaire

P

P4HA1	*Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1*
PAAD	Adénocarcinome pancréatique
PAI-1	*Plasminogen activator inhibitor 1*
PAMP	*Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PAN2	Nucléase poly(A) 2
PAS	*PER - Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator - Single-minded homolog 1*
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCAF	*p300/CBP-associated factor*
PCPG	Phéochromocytome et paragangliome
PD-1	*Programmed cell death protein 1*
PD-L1	*Programmed death-ligand 1*
pDCs	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDGF	*Platelet-Derived Growth Factor*
PDK1	*Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1*
PFKL	*Phosphoglycérate kinase 1*
PFS	*Progression Free Survival*
PGF	*Placental growth factor*
PGK1	*Phosphoglycerate kinase 1*
pH	Potentiel hydrogène
PHD	*Prolyl hydroxylases*
PI3K	*Phosphoinositide 3-kinase*
PITPNM3	*Membrane-associated Phosphatidylinositol Transfer Protein 3*
PKC	Protéine kinase C
PKM	Pyruvate kinase M
PLK3	*Polo-like kinase 3*
pO2	Pression partielle en oxygène
PRAD	Adénocarcinome de la prostate
PRMT1	*Protein arginine methyltransferase 1*
PRR	*Pattern Recognition Receptors*

PTEN *Phosphatase and TENsin homolog*

V

VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFA *Vascular Endothelial Growth Factor A*

VEGFR *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

R

R7TM Récepteurs à 7 segments transmembranaires

RACK1 *Receptor for activated C kinase*

RAF *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

RAGE *Receptor for advanced glycation end-products*

RANKL *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*

READ Adénocarcinome du rectum

ROS Espèces réactives de l'oxygène

RPMI 1640 *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*

RSUME *RWD-containing SUMOylation enhancer*

RT-qPCR *Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*

S

SARC Sarcome

SDH Succinate déshydrogenase

SENP *Sentrin/SUMO-specific protease*

Shh *Sonic hedgehog*

SIM *Single-minded homolog 1*

SIRPα *Signal Regulatory Protein α*

siRNA Petit ARN interférant

SIRT1 Sirtuine 1

SKCM Mélanome cutané

SLC2A1 *Glucose transporter 1*

SLC2A3 *Glucose transporter 3*

SNAIL *Snail Family Transcriptional Repressor 1*

SOX2 *Sex determining region Y-box 2*

SPINK1 *Serine Protease Inhibitor Kazal type 1*

STAD Adénocarcinome de l'estomac

STAT *Signal transducer and activator of transcription*

Signal transducteur et activateur de la transcription

SVF Sérum de veau fœtal

T

TAA *Tumor-Associated Antigens*

TAMs *Tumor-associated macrophages*

Macrophages associés aux tumeurs

TANs	*Tumor-associated neutrophils*
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique
TCGA	*The Cancer Genome Atlas Program*
TCR	*T cell receptor*
TF	Transferrine
TFRC	Récepteur de la transferrine
TGCT	Tumeur testiculaire des cellules germinales
TGFβ	*Transforming growth factor β*
Th1	*T helper 1*
Th2	*T helper 2*
Th17	*T helper 17*
THCA	Carcinome thyroïdien
THYM	Thymome
TME	*Tumor microenvironment* Microenvironnement tumoral
TNBC	*Triple-Negative Breast Cancer* Cancer du sein triple négatif
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor α*
TP53BP1	Protéine de liaison 1 du suppresseur de tumeur p53
TPI	Triosephosphate isomérase
TPM	Transcrits par million
Tregs	T régulateurs
TSA	*Tumor-Specific Antigens*
TSC2	*Tuberous sclerosis complex 2*
TSS	*Transcription Start Site*
TWIST	*Twist Family BHLH Transcription Factor 1*

U

UCEC	Carcinome endométrial du corps utérin
UCHL1	*Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*
UCS	Carcinosarcome utérin
USP8	*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8*
USP52	Protéase spécifique de l'ubiquitine 52
UVM	Mélanome uvéal

V

VDU	*pVHL-interacting deubiquitinating enzyme*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGFR	*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*
VHL	*von Hippel-Lindau*
VISTA	*V-domain Immunoglobulin Suppressor of T-cell Activation*

X

XBP1	*Xbox Binding Protein 1*

XRCC1 *X-ray repair cross-complementing protein 1*

XRCC4 *X-ray repair cross-complementing protein 4*

Z

ZEB1 Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

ZEB2 Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La composition du microenvironnement tumoral. 24
Figure 2 : Structure schématique de la sous-unité HIF-1β/ARNT. 29
Figure 3 : Structure schématique de la sous-unité HIF-1α. 30
Figure 4 : Structure schématique de la sous-unité HIF-2α. 30
Figure 5 : Structure schématique de la sous-unité HIF-3α. 32
Figure 6 : Structure schématique des sous-unités HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α et HIF-1β, et des facteurs impliqués dans leur régulation. 34
Figure 7 : Schéma représentant les pourcentages d'oxygène des tissus sains et des tumeurs correspondantes. 46
Figure 8 : L'influence de l'hypoxie dans la progression tumorale. 47
Figure 9 : L'influence de l'hypoxie tumorale sur la réponse immunitaire. 54
Figure 10 : Schéma représentant les cellules faisant partie de l'immunité innée. 59
Figure 11 : Schéma représentant les cellules faisant partie de l'immunité adaptative. 63
Figure 12 : Schéma représentant les mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses pour échapper au système immunitaire. 67
Figure 13 : Schéma représentant la structure des différentes sous-familles de chimiokines. 74
Figure 14 : Représentation de l'expression de ACKR1 au niveau tissulaire. 88
Figure 15 : Représentation de l'expression de ACKR2 au niveau tissulaire. 89
Figure 16 : Représentation de l'expression de ACKR3 au niveau tissulaire. 90
Figure 17 : Représentation de l'expression de ACKR4 au niveau tissulaire. 92
Figure 18 : Schéma représentant les récepteurs ACKRs et leurs ligands. 92
Figure 19 : Schéma résumant l'implication de chaque ACKR dans différentes étapes de la progression tumorale... 101
Figure 20 : Carte du vecteur lentiviral utilisé lors de la surexpression de Ackr2. 108
Figure 21 : Paramètres utilisés pour la réaction de transcription inverse pour la technique de RT-qPCR. 113
Figure 22 : Programme utilisé pour la réaction de qPCR après transcription inverse. 114
Figure 23 : Schéma représentant l'emplacement de motifs HRE au niveau du promoteur humain (A) et du promoteur murin (B) de ACKR2 déterminés par l'outil MCAST. 126
Figure 24 : Schéma représentant l'emplacement de motifs HRE au niveau du promoteur humain (A) et du promoteur murin (B) de ACKR2 déterminés par l'outil JASPAR. 127
Figure 25 : L'expression de ACKR2 est augmentée en hypoxie à 1% et 0,1% d'oxygène pendant 48 heures, et associée à une diminution de CCL5 à 48 heures d'hypoxie pour les cellules B16-F10. 129

Figure 26 : L'expression de ACKR2 par les cellules de mélanome B16-F10 et A-375 est augmentée en hypoxie. *132*
Figure 27 : L'expression de ACKR2 par les cellules de cancer colorectal CT26 et Caco-2 est augmentée en hypoxie. *134*
Figure 28 : L'expression de ACKR2 par les cellules de cancer du sein 4T1 et MDA-MB-468 est augmentée en hypoxie. *137*
Figure 29 : La quantité de CCL5 sécrétée par les cellules B16-F10 et CT26 est diminuée en hypoxie. *139*
Figure 30 : L'expression de ACKR2 par les cellules 4T1 HIFΔ est diminuée en hypoxie. *142*
Figure 31 : L'expression de ACKR2 par les cellules B16-F10 HIFΔ est diminuée en hypoxie. *144*
Figure 32 : La surexpression de ACKR2 par transduction est confirmée dans nos modèles cellulaires et n'impacte par la croissance cellulaire. *146*
Figure 33 : La surexpression de ACKR2 dans notre modèle a une influence sur le paysage chimiokinique, notamment sur la quantité de CCL5. ..... *150*
Figure 34 : L'expression de ACKR2 est significativement moindre au niveau des tumeurs B16-F10 HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL. *151*
Figure 35 : Le facteur de transcription HIF-1α se lie directement sur les motifs HRE du promoteur de Ackr2 en hypoxie dans les cellules de mélanome B16-F10. ..... *155*
Figure 36 : Le silencing de HIF-2α par siRNA dans les cellules CT26 n'induit pas de changements dans l'expression de ACKR2 en hypoxie. *157*
Figure 37 : L'induction de l'autophagie par stress nutritionnel n'a pas d'impact sur l'expression de ACKR2 dans les cellules CT26. ..... *159*
Figure 38 : L'analyse de l'ARN de 19 tumeurs démontre que l'expression de ACKR2 est positivement corrélée à l'expression de CA9 chez des patients atteints de TNBC. *161*
Figure 39 : Heatmap représentant la corrélation entre l'expression de ACKR2 et l'expression de gènes impliqués dans la signature hypoxique, dans des cohortes de patients atteints de 33 types de cancers différents. *166*
Figure 40 : L'expression de ACKR2 influence l'infiltration de différents sous-types de cellules immunitaires dans la cohorte de 1100 patients atteints de cancer du sein invasif. *168*
Figure 41 : L'expression de ACKR2 influence l'infiltration de différents sous-types de cellules immunitaires dans la cohorte de 471 patients atteints de mélanome cutané. *170*
Figure 42 : L'analyse par NanoString des tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ montre l'importance de HIF-1α et de sa signalisation dans différentes voies impliqués dans le processus tumoral. *173*
Figure 43 : L'analyse par NanoString des tumeurs B16-F10 montre une présence plus importante de cellules immunitaires effectrices dans les tumeurs HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL. *175*
Figure 44 : Le séquençage de nouvelle génération de l'ARN des cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ en hypoxie a permis de préciser des voies de signalisation et des gènes clés impliqués dans la signalisation médiée par HIF-1α en hypoxie. *180*

Figure 45 : Schéma décrivant la régulation à vocation anti- et pro-tumorale de ACKR2 dans différents types de cancers selon la littérature. *192*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Termes et définitions utilisés en fonction du niveau d'oxygène dans les organes, tissus ou cellules. *27*
Tableau 2 : Facteurs et mécanismes ayant une fonction au niveau de la régulation de HIF-1α, au niveau de l'initiation de sa transcription, de la stabilité de son ARN messager et de l'initiation de sa traduction. *35*
Tableau 3 : Facteurs et mécanismes impliqués dans la stabilité de la protéine HIF-1α. *37*
Tableau 4 : Gènes suppresseurs de tumeurs et oncoprotéines à même de réguler HIF-1α. *40*
Tableau 5 : Description des gènes concernés par la régulation par HIF-1 en hypoxie au niveau de leur transcription, et processus dans lesquels ils sont impliqués. *42*
Tableau 6 : Les différents gènes codant pour des chimiokines ou leurs récepteurs régulés en hypoxie dans les cellules dendritiques. *70*
Tableau 7 : Tableau récapitulant les différents types de cellules immunitaires et les couples chimiokines/récepteurs de chimiokines impliqués dans leur recrutement. *78*
Tableau 8 : Les récepteurs de chimiokines régulés par l'hypoxie dans le cancer. *80*
Tableau 9 : Les chimiokines régulées par l'hypoxie dans le cancer. *83*
Tableau 10 : Liste des références et de la provenance des différentes lignées cellulaires cultivées lors des expériences. *105*
Tableau 11 : Liste et abréviations des lignées transformées par CRISPR/Cas9 et utilisées dans ce travail de thèse. *106*
Tableau 12 : Liste des amorces utilisées lors des expériences, ainsi que leurs références/séquences et leur provenance. *106*
Tableau 13 : Descrption du vecteur lentiviral utilisé lors de la surexpression de Ackr2. ..... *107*
Tableau 14 : Liste des réactifs et anticorps utilisés lors de l'analyse par cytométrie en flux. *109*
Tableau 15 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection de protéines par Western Blot. *116*
Tableau 16 : Paramètres optimaux du M220 Focused-ultrasonicator utilisés pour obtenir des fragments de chromatine entre 200 et 700 paires de bases. *120*
Tableau 17 : Liste et séquences des amorces utilisées pour les résultats finaux de la ChIP-qPCR. *122*
Tableau 18 : Liste des abréviations utilisées pour désigner le type de cancer analysé dans la base de données TCGA. *162*

INTRODUCTION

1. Le microenvironnement tumoral

1.1. Le microenvironnement tumoral : composition

Le microenvironnement tumoral (TME) correspond à l'environnement autour des cellules cancéreuses. Il est constitué de vaisseaux sanguins et de différents types de cellules : des cellules cancéreuses, stromales et immunitaires. Parmi les cellules immunitaires, nous pouvons retrouver des cellules dendritiques, des lymphocytes T CD4+ et T CD8+, des lymphocytes T *helper*, des lymphocytes T régulateurs (Tregs), des cellules *Natural Killer* (NK), et des cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSCs) (**Figure 1**) [1].

Parmi les cellules stromales, nous y retrouvons des cellules endothéliales et des cellules épithéliales, ainsi qu'en abondance des fibroblastes associés au cancer (CAFs - *Cancer-Associated Fibroblasts*). Les CAFs correspondent soit à des fibroblastes déjà présents sur le site tumoral, soit à des cellules souches mésenchymateuses qui se sont différenciées en fibroblastes. En effet, lors du développement de la tumeur, les progéniteurs de fibroblastes vont interagir avec les cellules tumorales et être activés en acquérant un phénotype pro-tumoral [2]. Les CAFs sont des acteurs majeurs du TME, puisqu'ils sont impliqués dans de nombreux processus ayant un rôle dans la progression du cancer, notamment en conséquence de leur rôle de production des composants de la matrice extracellulaire (MEC) [3]. En effet, il a été montré que la MEC joue un rôle prépondérant dans la progression tumorale, en régulant la survie et la prolifération des cellules cancéreuses, les interactions entre les cellules cancéreuses et les autres cellules du TME, et la migration des cellules cancéreuses dans les tissus adjacents, menant au processus métastatique [4].

Les cellules immunitaires sont recrutées dans le TME en partie du fait de la production de chimiokines et de la liaison de celles-ci aux récepteurs de chimiokines [5]. Le rôle primordial que jouent ces chimiokines et leurs récepteurs sera abordé et décrit dans une autre partie de l'introduction.

Ensemble, ces acteurs du TME vont créer un réseau complexe, qui va supporter la croissance tumorale en créant un environnement tolérogène, et qui va permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à la surveillance et à leur élimination par le système immunitaire [6].

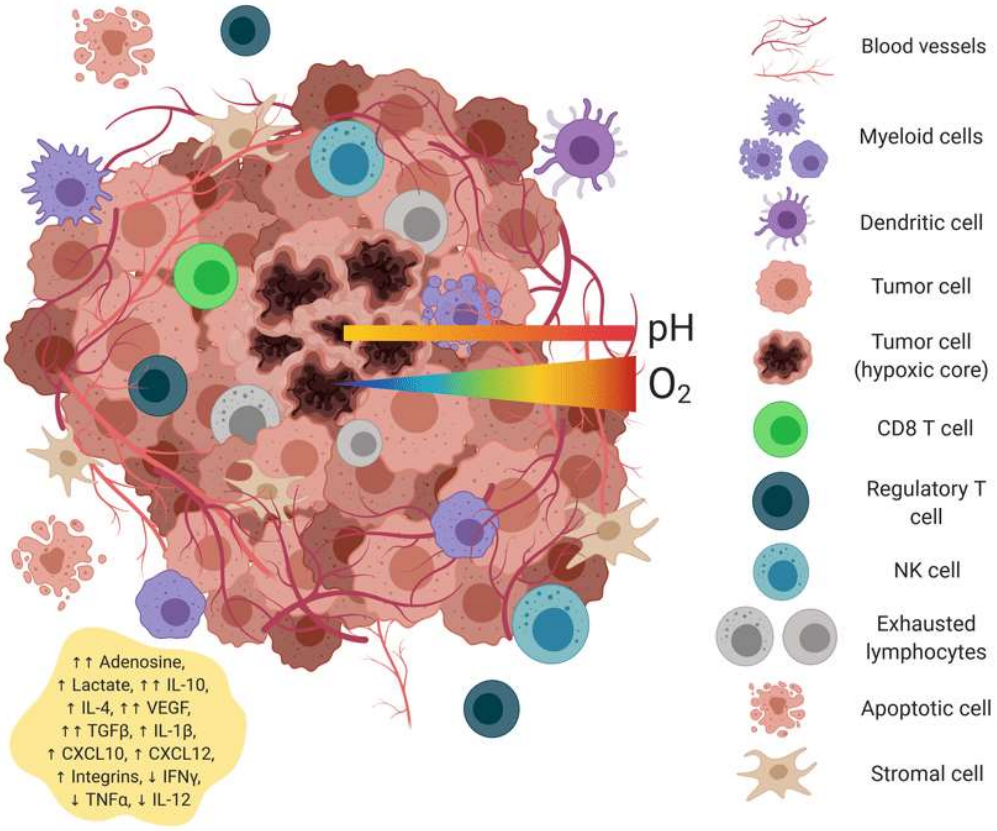


Figure 1 : La composition du microenvironnement tumoral.

La composition du TME comprend des vaisseaux sanguins, des cellules tumorales, des cellules stromales ainsi que des cellules immunitaires. Par Fernández et al., Int. J. Mol. Sci., ***2019****.*

1.2. L'influence du microenvironnement tumoral sur la progression tumorale

Le TME va favoriser la croissance tumorale de différentes manières : en promouvant l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire, en créant un « *switch* métabolique » favorisant un pH (potentiel hydrogène) acide, en induisant l'angiogenèse tumorale, en permettant la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, et en créant des zones hypoxiques [1, 7, 8].

1.2.1. Le *switch* métabolique

Dans des conditions physiologiques, les cellules saines génèrent de l'ATP (Adénosine Triphosphate) à partir du glucose par phosphorylation oxydative. Les cellules cancéreuses ayant un besoin plus important en énergie, elles vont plutôt favoriser la glycolyse aérobique à la phosphorylation oxydative pour métaboliser le glucose, puisqu'elle permet de générer une quantité plus importante d'ATP [9]. L'augmentation du métabolisme du glucose va mener à une augmentation importante de sous-produits métaboliques, qui vont s'accumuler dans le TME. Parmi ces sous-produits métaboliques, nous retrouvons principalement le lactate. L'accumulation de lactate dérivé des tumeurs a un rôle immunosuppresseur, puisqu'il va diminuer l'activité des cellules NK ainsi que des MDSCs [10]. Un autre métabolite s'accumulant dans le TME est l'adénosine, qui est capable de supprimer la prolifération et la maturation des cellules NK et des lymphocytes T [11], et d'activer des cellules immunosuppressives telles que les Tregs et les MDSCs [12].

L'accumulation de ces métabolites provoque une acidification du TME et une diminution du pH extracellulaire, ce qui va avoir des conséquences dramatiques sur l'infiltration des cellules immunitaires [13]. En effet, il a été montré que l'acidification du TME induit le recrutement et aussi l'activation de cellules immunosuppressives MDSCs et Tregs [14]. De plus, l'acidification du TME résulte en une inhibition de la fonction

cytotoxique des lymphocytes T. Elle engendre également une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires [15, 16].

1.2.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse joue un rôle important dans la croissance et l'invasion tumorale, et la formation de métastases. Elle fait intervenir des facteurs angiogéniques, dont les principaux sont le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) [17].

Le VEGF est l'acteur principal de l'angiogenèse tumorale ; il est secrété par les cellules de l'endothélium et les cellules cancéreuses. Il régule l'angiogenèse tumorale en se fixant sur ses récepteurs VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptors)*, activant ainsi différentes voies de signalisation [18, 19]. Parmi ces voies de signalisation, nous retrouvons des voies responsables de la prolifération, de la migration et de l'invasion, telles que les voies RAF/MEK/MAPK (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase*) et PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B*) [20]. Le FGF joue également une fonction importante dans l'angiogenèse tumorale, puisqu'il est aussi capable d'activer la voie RAF/MEK/MAPK. La sécrétion de FGF par les neutrophiles dans le TME favorise l'angiogenèse et le processus métastatique [21]. Enfin, PDGF est surexprimé dans différents types de cancers et est capable d'induire l'angiogenèse tumorale par activation de la voie MEK/ERK (*extracellular-signal-regulated-kinase*) [22] ainsi que l'augmentation de la sécrétion de VEGF [17].

1.2.3. L'hypoxie

L'accumulation de sous-produits métaboliques, le manque de nutriments et la forte consommation d'oxygène dus à une prolifération accrue des cellules cancéreuses vont

créer un environnement faible en oxygène et donc défavorable à la croissance cellulaire. Nous parlons alors d'environnement hypoxique [23]. Pour pallier à ces conditions hypoxiques, les cellules tumorales vont subir une reprogrammation métabolique et exprimer des protéines glycolytiques, telles que GLUT1 (*Glucose Transporter 1*), GLUT3 (*Glucose Transporter 3*) et LDHA (Lactate déshydrogénase A), pour augmenter leur consommation de glucose [24]. De plus, l'hypoxie est médiée par différents facteurs, incluant HIF-1α (*Hypoxia Inducible Factor-1α*), capables de se lier au promoteur de gènes cibles. Parmi ces gènes cibles, nous retrouvons *VEGFA*, décrit précédemment et acteur majeur de l'angiogenèse tumorale [25]. L'hypoxie va avoir des rôles prépondérants dans la progression tumorale, qui seront décrits dans la partie suivante.

2. L'hypoxie dans le microenvironnement tumoral

2.1. La définition physiologique de l'hypoxie

L'hypoxie est définie par une diminution de la disponibilité en oxygène qui limite, ou supprime la fonction physiologique des organes, tissus ou cellules. L'hypoxie peut être locale (par exemple l'hypoxie cérébrale) ou générale. De manière générale, nous parlons d'hypoxie lorsque la pression partielle en oxygène (pO_2) est inférieure à 8 millimètres de Mercure (mmHg), soit moins de 1% d'oxygène, et de normoxie lorsque la pO_2 est de 159 mmHg, soit 21% d'oxygène (**Tableau 1**) [26].

Tableau 1 : Termes et définitions utilisés en fonction du niveau d'oxygène dans les organes, tissus ou cellules.

Les conditions normoxiques sont définies par une pO_2 de 159 mmHg et 21% d'O_2, l'hypoxie légère par une pO_2 de 8 à 38 mmHg et 1 à 5% d'O_2, l'hypoxie par une pO_2 inférieure à 8 mmHg et 1% d'O_2, et enfin l'anoxie par une pO_2 inférieure à 0,08 mmHg et moins de 0,1% d'O_2. Adapté de Koh MY, Powis G, Trends Biochem Sci. ***2012****.*

Terme utilisé	pO_2 (mmHg)	% O_2
Normoxie	159	21
Hypoxie légère	8 à 38	1 à 5
Hypoxie	Inférieure à 8	Inférieur à 1
Anoxie	Inférieure à 0,08	Inférieur à 0,1

En clinique, l'hypoxie peut se déclarer en conséquence de diverses pathologies, notamment des pathologies respiratoires ou cardiaques (embolies pulmonaires, bronchites chroniques, insuffisance cardiaque) [27] mais elle peut aussi survenir face à certaines situations comme la montée en altitude, la plongée, ou encore une intoxication au monoxyde de carbone. Elle se traduit par divers symptômes : une arythmie ou accélération du rythme cardiaque, une désorientation, de la fatigue, une coloration bleutée de la peau, des maux de tête… [28-30]. Le diagnostic se fait grâce à l'observation des symptômes cliniques, et est confirmé par la mesure des pressions en oxygène et dioxygène dans le sang (gaz du sang). Généralement, l'hypoxie est traitée en déterminant et traitant la cause de cette diminution en oxygène, et en administrant de l'oxygène au patient (par exemple à l'aide d'un masque à oxygène) jusqu'à obtenir un taux d'oxygène dans le sang suffisant [31]. Sans traitement, l'hypoxie peut avoir de graves conséquences, telles que des lésions neurologiques ou cérébrales irréversibles, l'apparition d'un coma ou encore d'un accident vasculaire cérébral [32, 33].

2.2. Les facteurs de transcription intervenant dans l'adaptation à l'hypoxie : HIFs

D'un point de vue mécanistique, la réponse à l'hypoxie est médiée par trois types de facteurs induits par l'hypoxie (HIFs - *Hypoxia Inducible Factors*) : HIF-1α, HIF-2α et HIF-3α. Les différentes sous-unités α sont toutes capables de se lier à une sous-unité

HIF-1β, également appelée ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) [34]. Dans cette partie, nous parlerons de la structure et de la fonction de ces facteurs de transcription.

2.2.1. La structure des HIFs

2.2.1.1. La structure de ARNT/HIF-1β

HIF-1β ou ARNT est une sous-unité partenaire, exprimée de manière stable et capable de former des hétérodimères avec les sous-unités sensibles à l'oxygène : HIF-1α, HIF-2α et HIF-3α. La sous-unité HIF-1β est composée de 789 acides aminés ainsi que d'un domaine bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*), d'un domaine PAS (*PER - Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator - Single-minded homolog 1*) et d'un domaine de transactivation à l'extrémité C-terminale, comme indiqué sur la **Figure 2**. Les domaines bHLH et PAS sont importants pour l'activité de liaison à l'ADN. Ces domaines permettent également la dimérisation entre les sous-unités α et β, bien que non suffisants seuls pour que l'hétérodimère soit actif transcriptionnellement ; ils constituent alors le domaine de liaison à l'ADN pour les facteurs HIFs [35].



Figure 2 : Structure schématique de la sous-unité HIF-1β/ARNT.

Abréviations : AA = Acides Aminés ; bHLH = basic-Helix-Loop-Helix ; CTAD = C-terminal Transactivation Domain ; PAS = PER-ARNT-SIM. Figure réalisée grâce à BioRender.

2.2.1.2. La structure de HIF-1α

La sous-unité HIF-1α est composée de 826 acides aminés. Sa structure contient également des domaines bHLH et PAS à l'extrémité N-terminale, qui servent à la

formation des complexes hétérodimériques avec HIF-1β et à la liaison de HIF-1α au niveau de l'ADN. Elle contient de plus certains domaines de transactivation aux extrémités N- et C-terminales, respectivement NTAD et CTAD, ainsi qu'un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (*Oxygen-dependent degradation domain* - ODD), comme décrit dans la **Figure 3** [36].



Figure 3 : Structure schématique de la sous-unité HIF-1α.

Abréviations : AA = Acides Aminés ; bHLH = basic-Helix-Loop-Helix ; CTAD = C-terminal Transactivation Domain ; PAS = PER-ARNT-SIM ; NTAD = N-terminal Transactivation domain ; ODD = Oxygen-dependent degradation domain. Figure réalisée grâce à BioRender.

2.2.1.3. La structure de HIF-2α

La sous-unité HIF-2α, aussi appelée EPAS1 (*Endothelial PAS domain-containing protein 1*), est composée de 870 acides aminés et possède une structure extrêmement similaire à la sous-unité HIF-1α. En effet, elle possède également des domaines bHLH, PAS, ODD, CTAD et NTAD, comme indiqué sur la **Figure 4**.



Figure 4 : Structure schématique de la sous-unité HIF-2α.

Abréviations : AA = Acides Aminés ; bHLH = basic-Helix-Loop-Helix ; CTAD = C-terminal Transactivation Domain ; NTAD = N-terminal Transactivation domain ; ODD = Oxygen-dependent degradation domain ; PAS = PER-ARNT-SIM. Figure réalisée grâce à BioRender.

Les deux sous-unités HIF-1α et HIF-2α diffèrent non pas par leur structure, mais par leur profil d'expression, puisque celle de HIF-1α est retrouvée de manière ubiquitaire,

tandis que le facteur HIF-2α est seulement exprimé par certains tissus [37]. En effet, son expression est restreinte à l'endothélium, aux reins, aux poumons, au cœur et au petit intestin [38]. Ils diffèrent également par certains co-activateurs ou facteurs de transcription qui leur sont spécifiques, comme par exemple NEMO (*Nuclear factor-κB (NFκB) essential modulator*) ou Ets1, qui interagissent uniquement avec HIF-2α [39].

Les sous-unités HIF-1α et HIF-2α se distiguent également par rapport à leur fonction. Bien qu'ils soient tous les deux capables d'activer transcriptionnellement des gènes cibles communs possédant un ou plusieurs motifs HRE (*Hypoxia Response Elements* – éléments de réponse à l'hypoxie) au niveau de leurs promoteurs, comme par exemple *VEGFA*, chacun peut également activer transcriptionnellement des gènes cibles qui leur sont spécifiques [40, 41]. En effet, la surexpression de HIF-1 ainsi que de HIF-2α permetta d'identifier une différence d'expression d'un panel de 701 gènes pour HIF-1α et 1 454 gènes pour HIF-2α, dont 16,4% d'entre eux sont communs aux deux isoformes [42]. Parmi les gènes dont l'expression était engendrée par HIF-1α se trouvaient notamment des gènes impliqués dans le processus de glycolyse et de la régénération de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit), tandis que pour HIF-2α, les gènes dont l'expression était augmentée avaient une fonction au niveau de la migration des cellules endothéliales, ou encore l'activation de voies médiées par des GTPases. En revanche, les gènes dont l'expression était diminuée par les deux isoformes étaient impliqués dans la réponse aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), et à la régulation négative du système immunitaire [42].

2.2.1.4. La structure de HIF-3α

HIF-3α est la sous-unité la moins étudiée ; cependant, elle a une structure très similaire à HIF-1α et HIF-2α, avec des domaines bHLH et PAS. En revanche, elle ne possède pas de domaine de transactivation à l'extrémité C-terminale (CTAD) (**Figure 5**).



Figure 5 : Structure schématique de la sous-unité HIF-3α.

Abréviations : AA = Acides Aminés ; bHLH = basic-Helix-Loop-Helix ; NTAD = N-terminal Transactivation domain ; ODD = Oxygen-dependent degradation domain ; PAS = PER-ARNT-SIM. Figure réalisée grâce à BioRender.

Il existe différents variants de HIF-3α, formés par épissage alternatif. Des études récentes suggèrent que les différents variants de HIF-3α ont des fonctions différentes, voire opposées. Il existe des preuves solides que la protéine HIF-3α fonctionne comme un activateur de transcription régulé par l'oxygène et qu'elle active un programme transcriptionnel unique en réponse à l'hypoxie. Alors que certains variants agissent comme régulateurs négatifs de HIF-1/HIF-2α, d'autres variants de HIF-3α peuvent inhiber les actions de HIF-1/HIF-2α en entrant en compétition pour la sous-unité HIF-1β commune. Il existe également un certain nombre de variants HIF-3α qui n'ont pas encore été étudiés [43].

Bien que les trois facteurs HIF-1, HIF-2 et HIF-3α soient induits en adaptation à des conditions hypoxiques, ce travail de thèse se concentre principalement sur le facteur HIF-1α et son activité transcriptionnelle en hypoxie.

2.2.2. La régulation des HIFs

Les mécanismes d'adaptation cellulaire aux conditions d'hypoxie sont maintenant parfaitement décrits dans la littérature. En 2019, William G. Kaelin Jr., Peter J. Ratcliffe et Gregg L. Semenza ont reçu le prix Nobel de Médecine pour la découverte des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation impliqués dans la réponse à l'hypoxie par les facteurs HIFs.

2.2.2.1. La régulation des HIFs en normoxie

Dans des conditions normoxiques, la régulation et dégradation des facteurs HIF-1 et HIF-2α sont médiées par hydroxylation, ubiquitination, et acétylation [44].

Le principal mécanisme de régulation des facteurs HIFs est l'hydroxylation de résidus proline conservés par des prolyl hydroxylases (PHD1, PHD2 et PHD3) au niveau du domaine ODD : les prolines 402 et 564 pour HIF-1α, et les prolines 405 et 531 pour HIF-2α (**Figure 6**) [45]. L'hydroxylation de ces facteurs par les PHDs permettra à la protéine von Hippel-Lindau (VHL) de se lier au domaine ODD [46]. La protéine VHL forme le substrat du module de reconnaissance d'un complexe ubiquitine ligase E3, composé d'élongines B et C et de Culline2, qui dirigent la polyubiquitination et la dégradation protéasomique des facteurs HIF-1/HIF-2α [47].

Un deuxième mécanisme de régulation est l'hydroxylation de HIF-1α par le facteur inhibiteur de HIF-1 (FIH-1), une autre enzyme régulée par l'oxygène. FIH-1 va hydroxyler l'Asparagine 803 au niveau du CTAD de HIF-1α, ce qui va alors prohiber l'interaction de HIF-1α avec des co-activateurs de transcription : p300/CBP (CREB-binding protein) [48]. FIH-1 peut également hydroxyler l'Asparagine 851 sur HIF-2α, mais de manière moins efficace qu'avec HIF-1α [26] (**Figure 6**).

En plus de l'hydroxylation, la régulation de HIF-1α en normoxie est médiée par l'acétylation du résidu Lysine 531 par l'acétyltransférase ARD1 (*Arrest-Defective-1 Protein*) (**Figure 6**), ce qui va favoriser l'interaction avec VHL, et donc la dégradation protéasomique de HIF-1α [46]. Contrairement aux PHDs et à FIH-1, l'expression de ARD1 n'est pas dépendante du niveau d'oxygène ; en revanche, en hypoxie, l'ARN messager et la protéine de ARD1 sont diminués [49]. Ainsi, en normoxie, HIF-1α et HIF-2α sont rapidement dégradés avec un temps de demi-vie de moins de 5 minutes [50].

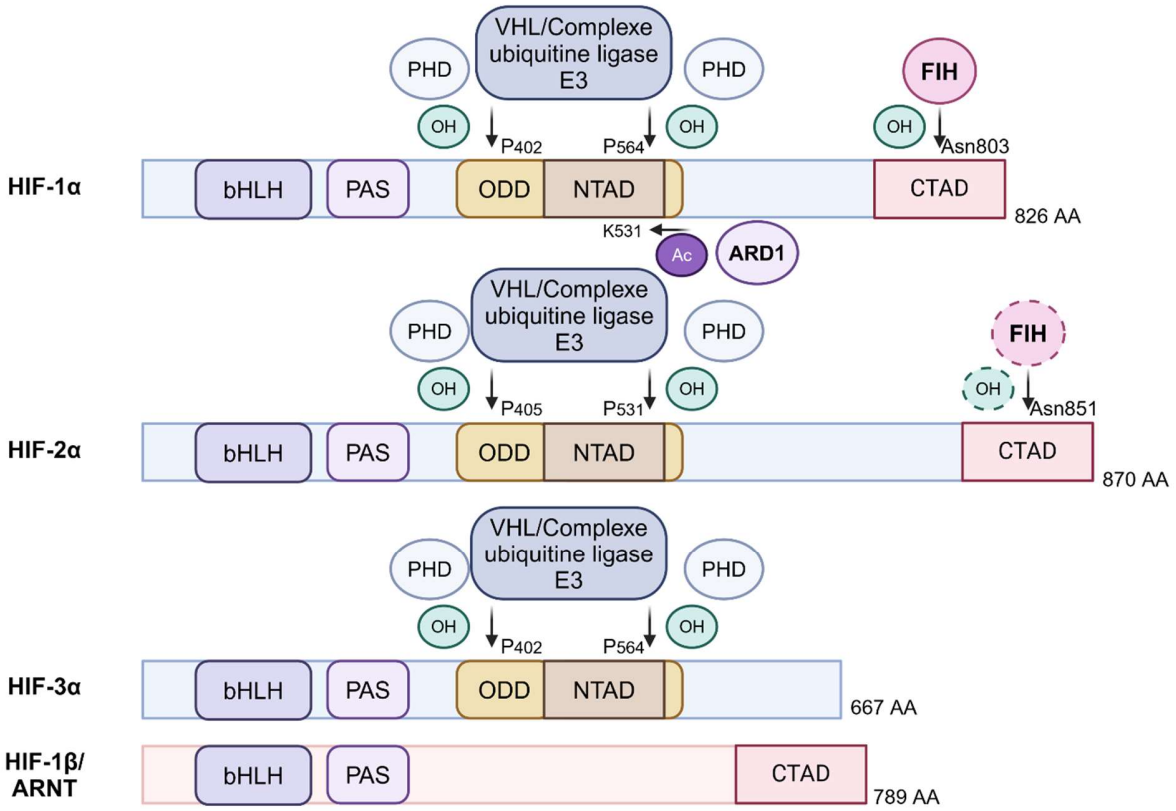


Figure 6 : Structure schématique des sous-unités HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α et HIF-1β, et des facteurs impliqués dans leur régulation.

Les quatre sous-unités possèdent des domaines bHLH et PAS. Ces domaines sont responsables de la liaison à l'ADN ainsi que la formation des hétérodimères entre les sous-unités alpha et la sous-unité alpha. Les domaines ODD présents au niveau des sous-unités alpha permettent la dégradation de celles-ci en présence d'oxygène.

Abréviations : AA = Acides Aminés ; Ac = Acétylation ; bHLH = basic-Helix-Loop-Helix ; CTAD = C-terminal Transactivation Domain ; FIH = Facteur Inhibiteur de HIF ; PAS = PER-ARNT-SIM ; NTAD = N-terminal Transactivation domain ; ODD = Oxygent-dependent degradation domain ; OH = groupe hydroxyle ; PHD = HIF prolyl-hydroxylase ; VHL = von Hippel-Lindau. Figure réalisée grâce à BioRender.

2.2.2.2. La régulation des HIFs en hypoxie

Dans des conditions hypoxiques, l'activité des enzymes PHD1, PHD2 et PHD3 est inhibée en raison de l'absence d'oxygène. Ainsi, la liaison de la protéine VHL est abrogée, HIF-1α et HIF-2α ne sont plus dégradés et sont stabilisés dans le cytoplasme des cellules. Les facteurs HIF-1/2α vont alors entrer dans le noyau grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) dans leur domaines bHLH et CTAD, où ils vont pouvoir former un hétérodimère avec HIF-1β/ARNT [51]. L'hétérodimère va alors pouvoir se lier aux séquences HRE de gènes cibles, dans le but d'induire leur transcription [26].

En outre, en hypoxie, FIH-1 est inactif en conséquence de l'absence d'oxygène ; ainsi, l'hydroxylation des résidus Asparagine est inhibée, ce qui permet aux co-activateurs de transcription p300/CBP de se lier aux domaines CTAD des sous-unités HIF-1/2α pour permettre leur activité transcriptionnelle [52].

L'activité des PHDs et de FIH-1 ne dépend pas que de la présence d'oxygène ; elle dépend aussi de la présence de 2OG (2-oxoglutarate) et de fer (Fe^{2+}). Ainsi, HIF-1 peut être activé en leur absence, même en des conditions normoxiques [53].

2.2.2.3. La régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle de HIF-1α

Il existe différentes étapes pendant lesquelles le facteur HIF-1α peut être régulé : l'initiation de la transcription, la stabilité des transcrits, et l'initiation de la traduction [53]. Les facteurs et mécanismes qui régulent HIF-1α à ces niveaux sont résumés dans le **Tableau 2** :

Tableau 2 : Facteurs et mécanismes ayant une fonction au niveau de la régulation de HIF-1α, au niveau de l'initiation de sa transcription, de la stabilité de son ARN messager et de l'initiation de sa traduction.

Abréviations : ATR = Protéine associée à l'ataxie télangiectasie et à RAD3 ; HDAC = histone désacétylase ; HRE = élément de répone à l'hypoxie ; IRES = Internal ribosomal entry site ; IRF9 = facteur de régulation de l'interféron 9 ; ISGF3, Interferon-stimulated gene factor 3; LY6E = Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus

E ; ND6 = sous-unité 6 de la NADH-déshydrogénase ; NF-κB = facteur nucléaire kappa B ; NRF-1 = nuclear factor erythroid 2-related factor 1 ; PAN2 = nucléase poly(A) 2 ; PI3K = phosphoinositide 3-kinase ; PKC = protéine kinase C ; STAT = signal transducteur et activateur de la transcription ; USP52 = protéase 52 spécifique de l'ubiquitine ; YB-1 = Y-box-binding protein 1. Adapté de Koyasu et al., Can Sci, ***2018****.*

Gène impliqué dans la régulation de HIF-1α	Impact sur la régulation de HIF-1α	Mécanisme impliqué dans la régulation de HIF-1α
Initiation de la transcription du gène *HIF-1α*		
ISGF3 (STAT1/STAT2/IRF9)	Positif	Liaison sur le promoteur de *HIF-1α* résultant en son activation transcriptionnelle
STAT3	Positif	Liaison sur le promoteur de *HIF-1α* résultant en son activation transcriptionnelle
NFκB	Positif	Liaison sur le promoteur de *HIF-1α* résultant en son activation transcriptionnelle
Voie PI3K/Akt/PKC/HDAC	Positif	Augmentation de l'initiation de la transcription en cas de mutation G13997A sur le gène mitochondrial ND6
LY6E	Positif	Diminution de l'expression de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) qui induit l'activation de la voie PI3K/Akt
HIF-1	Positif	Liaison sur les HRE du promoteur de *HIF-1α* pour activer sa transcription (auto-régulation positive)
NRF-1	Négatif	Liaison sur le promoteur de *HIF-1α* pour inhiber sa transcription
Stabilité de l'ARN messager de *HIF-1α*		

***P-bodies* (USP52/PAN2)**	Positif	Interaction avec l'extrémité 3'-UTR de l'ARN messager de HIF-1α pour induire sa stabilisation
Initiation de la traduction de la protéine HIF-1α		
Voie PI3K/Akt	Positif	Augmentation de l'initiation de la traduction cap- et IRES-dépendante
YB-1	Positif	Liaison sur l'extrémité 5'-UTR de l'ARN messager de *HIF-1α* pour induire sa traduction
ATR	Positif	Influence l'élément *cis* de la région codante de l'ARN messager de *HIF-1α* en cas de stress réplicatif

De plus, la stabilité de la protéine HIF-1α peut également être régulée : soit de manière dépendente de la modulation de l'activité des PHDs, soit de manière indépendante [53]. Les facteurs et mécanismes qui régulent HIF-1α au niveau de sa stabilité protéique sont résumés dans le **Tableau 3** :

Tableau 3 : Facteurs et mécanismes impliqués dans la stabilité de la protéine HIF-1α.

Abréviations : 2OG = 2-oxoglutarate ; D-2HG = D-2-hydroxyglutarate ; FH = fumarate hydratase, FIH-1 = facteur inhibant HIF-1 ; GSK-3 = glycogène synthase kinase 3 ; HSP = protéine de choc thermique ; IDH = isocitrate déshydrogénase ; LSD1 = lysine-specific demethylase-1 ; L-2HG = L-2-hydroxyglutarate ; NQO1 = NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1; PHD = prolyl hydroxylase ; PLK3 = polo-like kinase 3 ; RACK1 = receptor for activated C kinase ; RSUME = RWD-containing SUMOylation enhancer ; SDH = succinate déshydrogénase ; SENP = sentrin/SUMO-specific protease ; SIRT = sirtuine ; UCHL1 = Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 ; USP8 = Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 ; VDU = pVHL-interacting deubiquitinating enzyme ; VHL = von Hippel-Lindau. Adapté de Koyasu et al., Can Sci, ***2018****.*

Facteurs/Fonctions impliqués au niveau de la	**Impact sur la régulation de HIF-1α**	**Mécanisme impliqué dans la régulation de HIF-1α**

stabilité de la protéine HIF-1α		
Par modulation de l'activité des PHDs		
PHD1, PHD2, PHD3	Négatif	Hydroxylation des Prolines 402 et 564 pour entraîner l'ubiquitination de HIF-1α
Mutation de SDH (perte de fonction)	Positif	Inactivation de PHD et de FIH-1 due à une accumulation anormale de succinate
Mutation de FH (perte de fonction)	Positif	Inactivation de PHD et de FIH-1 due à une accumulation anormale de fumarate
Mutation de IDH 1 et 2 (gain de fonction)	Controversé	L-2HG inhibe l'activité des PHDs, induisant une augmentation de HIF-1α D-2HG dans certains cas augmente l'activité des PHDs, dans d'autres n'a pas d'effet
IDH3	Positif	Surexpression induit une diminution de 2OG et donc une baisse de l'activité des PHDs
NQO1	Positif	Liaison sur HIF-1α qui empêche son interaction avec les PHDs
SIRT2	Négatif	Désacétylation de HIF-1α au niveau de la Lysine 709 Augmente l'interaction entre HIF-1α et PHD2
Sans modulation de l'activité des PHDs		
HSP90	Positif	Protection de HIF-1α contre sa dégradation médiée par RACK1 (indépendante des PHDs et de VHL)
GSK-3	Négatif	Phosphorylation de HIF-1α pour une dégradation indépendante des PHDs et de VHL

PLK3	Négatif	Phosphorylation de HIF-1α pour une dégradation indépendante des PHDs et de VHL
RSUME	Positif	SUMOylation de HIF-1α induisant sa stabilisation
SENP1	Positif	DéSUMOylation de HIF-1α pour inhiber son ubiquitination par VHL de manière indépendante des PHDs
SET7/9	Négatif	Méthylation de HIF-1α pour son ubiquitination. Cela induit sa dégradation indépendamment des PHDs et de VHL
LSD1	Positif	Déméthylation de HIF-1α pour supprimer sa dégradation médiée *via* les PHDs et VHL
Stabilité de la protéine HIF-1α par ubiquitination		
VHL	Négatif	Ubiquitination de HIF-1α résultant en sa dégradation protéasomique
VDU/USP20	Positif	Désubiquitination de HIF-1α pour sa stabilisation
USP8	Positif	Désubiquitination de HIF-1α pour sa stabilisation
UCHL1	Positif	Désubiquitination de HIF-1α pour sa stabilisation

La translocation de HIF-1α dans le noyau peut également être régulée de manière positive ou négative. En effet, la dynéine interagit avec le NLS de HIF-1α pour induire sa translocation dans le noyau [54]. La voie AMPK (*AMP-activated protein kinase*)/HDAC induit également la translocation de HIF-1α dans le noyau par désacétylation de HSP70 et favorise l'interaction HSP90/HIF-1α [55]. Enfin, MAPK phosphoryle les Sérines 641 et

643 permettant la sortie de HIF-1α du noyau [56]. Egalement, l'hétérodimérisation de HIF-1α avec HIF-1β peut être inhibée par la caséine kinase 1 (CK1δ), qui phosphoryle la sérine 247 sur HIF-1α pour empêcher la formation de l'hétérodimère [57].

En plus de sa régulation par FIH-1 par hydroxylation, HIF-1α est régulé négativement par la sirtuine 1 (SIRT1), qui inhibe l'interaction entre CBP/p300 et HIF-1α par désacétylation de la lysine 647 (préalablement acétylée par PCAF (*p300/CBP-associated factor*)) [58]. Il existe également des régulateurs positifs, tels que XBP1 (*Xbox Binding Protein 1*) qui forme un complexe transcriptionnel avec HIF-1α pour promouvoir le recrutement de l'ARN polymérase II [59], et IDH3 qui inactive FIH-1 en diminuant le niveau de 2OG [60].

Enfin, la perte de fonction induite par mutation de certains gènes, appelés suppresseurs de tumeurs, et les oncoprotéines issues de virus oncogènes peuvent augmenter la synthèse, empêcher la dégradation, augmenter l'activité transcriptionnelle ou promouvoir la translocation nucléaire de HIF-1α [61]. Ceux-ci sont cités dans le **Tableau 4** :

Tableau 4 : Gènes suppresseurs de tumeurs et oncoprotéines à même de réguler HIF-1α.

De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs présentant une perte de fonction due à une mutation et de nombreuses protéines issues de virus oncogènes ont un impact sur l'ubiquitination, l'hydroxylation, la synthèse et la dégradation de HIF-1α.

*Abréviations : EBV, Epstein-Barr virus ; FH, fumarate hydratase ; HTLV, human T-cell leukemia virus ; KSHV, Kaposi's sarcoma-associated herpes virus ; IDH1, isocitrate déshydrogenase 1 ; LANA, latency-associated nuclear antigen ; LKB1, liver kinase B1 ; LMP1, latent membrane protein 1 ; PTEN, phosphatase and tensin homolog ; TSC2, tuberous sclerosis complex 2 ; VHL, von Hippel-Lindau ; SDHB, succinase dehydrogenase complex iron sulfur subunit B ; SDHC, succinase dehydrogenase complex iron sulfur subunit C ; SDHD, succinase dehydrogenase complex iron sulfur subunit D. Adapté de Semenza et al., Oncogene, **2010**.*

Gènes suppresseurs de tumeurs	Impact sur la régulation de HIF-1α
VHL	Diminue son ubiquitination
SDHB	Diminue son hydroxylation
SDHC	Diminue son hydroxylation
SDHD	Diminue son hydroxylation
FH	Diminue son hydroxylation
IDH1	Diminue son hydroxylation
P53	Diminue son hydroxylation
TSC2	Diminue son ubiquitination
PTEN	Augmente sa synthèse
LKB1	Augmente sa synthèse
Protéines issues de virus oncogènes	**Impact sur la régulation de HIF-1α**
LMP-1 du virus EBV	Diminue sa dégradation
Protéine X du virus de l'hépatite B	Diminue sa dégradation
Protéines E6/E7 du papillomavirus humain	Augmente sa synthèse protéique
Protéine Tax du virus HTLV-1	Augmente sa synthèse protéique
Récepteur couplé aux protéines G du KSHV	Augmente sa transactivation
LANA du KSHV	Diminue sa dégradation et augmente sa translocation dans le noyau
Viral interferon regulatory factor 3 du KSHV	Diminue sa dégradation

2.2.3. Les gènes cibles de HIF-1 en hypoxie

L'hétérodimère HIF-1α/HIF-1β peut se fixer sur les motifs HRE, présents au niveau des promoteurs d'une panoplie de gènes cibles. Ces motifs HRE correspondent à une séquence consensus 5'-RCGTG-3', où R correspond à une purine A ou G [62, 63]. De plus, dans les promoteurs des gènes régulés par l'hypoxie, nous trouvons des séquences HBS (*HIF-1 binding site*) sous la forme 5'-TACGTG-3', et des séquences de la forme 5'-CAC(A)-3′ appelées *HIF ancillary sequence* (HAS), juste après le motif HRE. Ces séquences sont nécessaires à la transcription de certains gènes cibles [64]. Les motifs HAS permettent la liaison de tétramères HIF-1α/HIF-1β, ce qui permet d'augmenter la transcription des gènes cibles. Ainsi, les gènes contenant à la fois des motifs HRE et HAS sont désignés comme ayant une meilleure réponse à l'hypoxie [65].

Les gènes cibles régulés par HIF-1α vont avoir une importance primordiale dans le développement tumoral, puisqu'ils sont impliqués dans le métabolisme du glucose, la prolifération et la viabilité cellulaire, le métabolisme du fer et l'érythropoïèse, l'angiogenèse et le remodelage vasculaire [66]. Les principaux gènes régulés par HIF-1α sont décrits dans le **Tableau 5**. Les rôles de l'hypoxie dans la croissance tumorale seront développés dans la partie suivante.

Tableau 5 : Description des gènes concernés par la régulation par HIF-1 en hypoxie au niveau de leur transcription, et processus dans lesquels ils sont impliqués.

Le dimère *HIF-1α/HIF-1β se fixe sur les motifs HRE de gènes cibles ayant une fonction au niveau du métabolisme du glucose, de la prolifération et la viabilité cellulaire, du métabolisme du fer, de l'érythropoïèse, de l'angiogenèse ainsi que du remodelage vasculaire. Tableau adapté de Gothié, E., Pouysségur, J., Med Sci,* ***2002****.*

Processus régulés par HIF-1α en hypoxie	**Gènes impliqués**	**Symboles des gènes**
Métabolisme du glucose	Adénylate kinase 3	AK3

	Enolase 1	ENO1
	Enolase 2	ENO2
	Glucose transporter 1	SLC2A1
	Glucose transporter 3	SLC2A3
	Glycéraldhéhyde-3-phosphate déshydrogénase	GAPDH
	Hexokinase 1	HK1
	Hekoxinase 2	HK2
	Hypoxia Inducible Lipid Droplet Associated	HILPDA
	Lactate déshydrogénase A	LDHA
	Aldolase A	ALDOA
	Aldolase C	ALDOC
	BCL2 interacting protein 3	BNIP3
	Phosphofructokinase L	PFKL
	Phosphoglycérate kinase 1	PGK1
	Pyruvate kinase M	PKM
	Triosephosphate isomérase	TPI
Prolifération et viabilité cellulaire	Insulin-like growth factor 2	IGF2
	IGF binding protein 1	IGFBP1
	IGF binding protein 2	IGFBP2
	IGF binding protein 3	IGFBP3
	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	CDKN1A

	Transforming growth factor β3	TGFβ3
	Carbonic anhydrase 9	CA9
	Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1	ERO1L
Métabolisme du fer **Erythropoïèse**	Céruléoplasmine	CP
	Érythropoïétine	EPO
	Transferrine	TF
	Récepteur de la transferrine	TFRC
Angiogenèse et remodelage de vaisseaux	Adrénomédulline	ADM
	Héme oxygénase-1	HMOX1
	Angopoietin-like 4	ANGPTL4
	Plasminogen activator inhibitor 1	PAI-1
	Endothéline-1	EDN1
	Récepteur α1B-adrénergique	ADRA1B
	Vascular endothelial growth factor	VEGF
	Vascular endothelial growth factor Receptor	VEGFR
	Nitric oxyde synthase 2	NOS2

Parmi les gènes les plus connus régulés par HIF-1α, nous retrouvons *VEGF*, décrit comme le principal facteur de l'angiogenèse tumorale [67]. Les 8 gènes dont l'expression est observée comme étant la plus induite dans des conditions hypoxiques sont *CA9*,

SLC2A1, *ENO2*, *ERO1L*, *IGFBP3*, *ANGPTL4*, *HILPDA* et *BNIP3* [68]. *CA9* est utilisé comme marqueur hypoxique dans différents types de cancers [69-71].

2.3. L'hypoxie dans le contexte du cancer

2.3.1. L'hypoxie tumorale : définition

Comme mentionné précédemment, l'accumulation de métabolites, le manque de nutriments et la forte consommation d'oxygène due à une prolifération accrue des cellules cancéreuses vont créer un environnement faible en oxygène et défavorable à la croissance cellulaire. En outre, la vascularisation anormale et anarchique des tumeurs ne permet pas de répondre aux besoins en oxygène des cellules tumorales. De ce fait, il va y avoir un gradient d'oxygène qui se forme au sein de la tumeur, qui est plus élevé en périphérie et qui diminue progressivement en allant vers le centre de la tumeur [1, 72]. Pour ces raisons, toutes les tumeurs solides sont hypoxiques en comparaison aux tissus sains auxquels elles correspondent (**Figure 7**) [73].

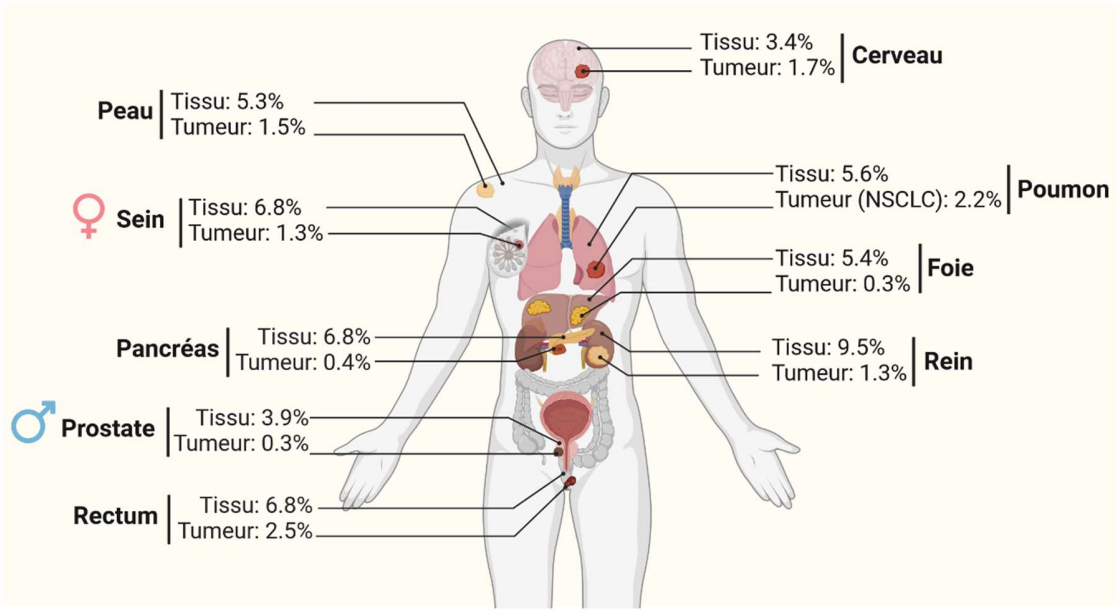


Figure 7 : Schéma représentant les pourcentages d'oxygène des tissus sains et des tumeurs correspondantes.

Les tissus sains présentent un pourcentage d'oxygène plus élevé en comparaison aux tumeurs solides formées à partir de ces tissus. Figure adaptée de Janji et al., Front. Immunol., ***2022****.*

De manière intéressante, HIF-1α est surexprimé dans de nombreux types de cancers, comprenant le cancer du sein, le cancer du côlon, le cancer des poumons, le cancer de la peau, le cancer des ovaires, le cancer du pancréas, le cancer de la prostate ainsi que les carcinomes situés au niveau du rein [74]. En outre, nous pouvons observer une corrélation de l'expression de HIF-1α avec la baisse de la survie de patients atteints de cancers de l'utérus, des ovaires, du cerveau, et du sein, entre autres [75-78]. HIF-2α est également un marqueur important dans le cancer, notamment dans les carcinomes rénaux à cellules claires où la mutation de la protéine VHL induit une accumulation des facteurs HIFs, associée à une diminution de la survie des patients [79].

2.3.2. L'influence de l'hypoxie dans le développement des cancers

L'hypoxie a un rôle clé dans de nombreux processus favorisant la progression tumorale : l'instabilité génomique, la dédifférienciation cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion ainsi que la formation de métastases, la réponse immunitaire contre le cancer et les traitements anti-cancéreux [80] (**Figure 8**). L'influence de l'hypoxie sur ces différents processus tumoraux sera détaillée dans cette partie.

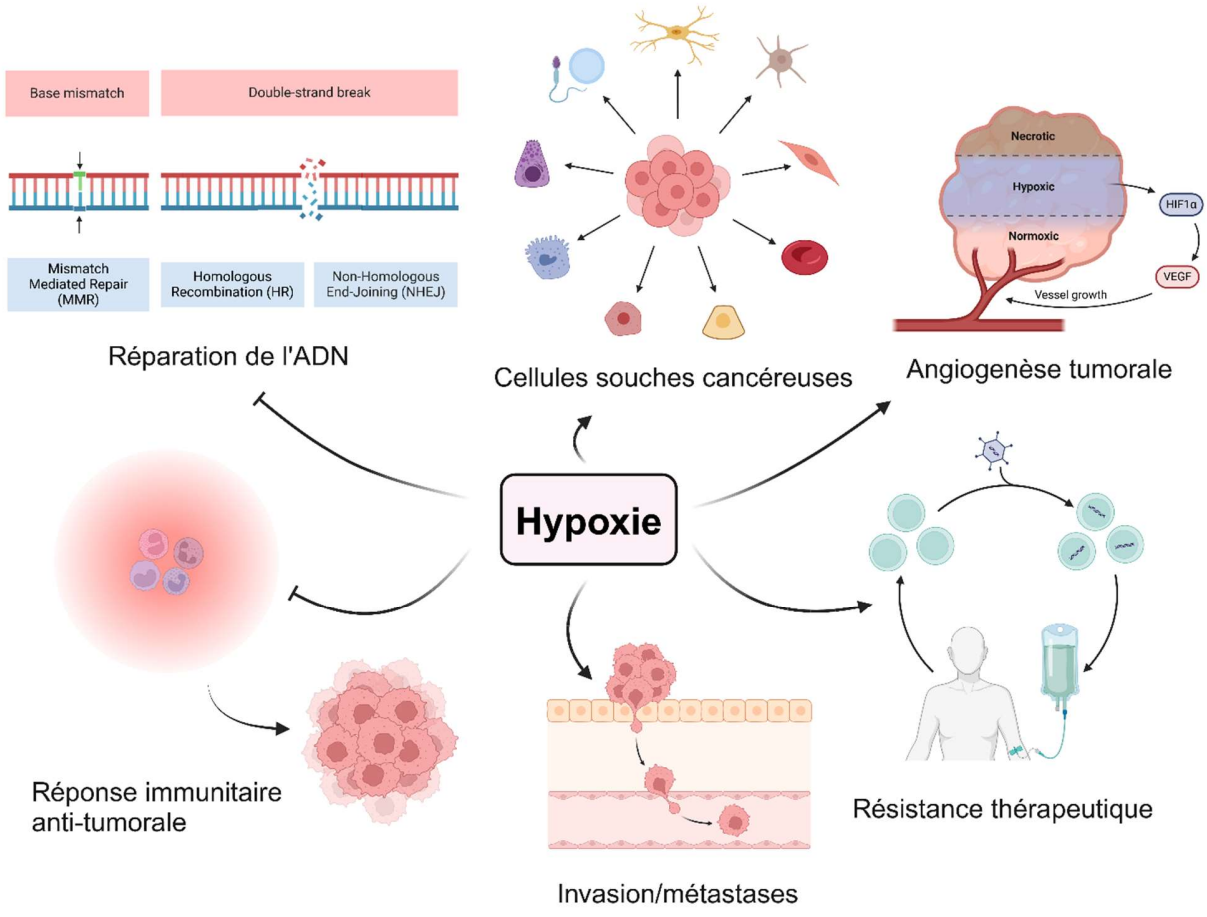


Figure 8 : L'influence de l'hypoxie dans la progression tumorale.

L'hypoxie a une influence considérable sur différents processus impliqués dans la progression tumorale : elle induit la dédifférenciation cellulaire en cellules souches cancéreuses, elle favorise l'angiogenèse tumorale, l'invasion des cellules cancéreuses et la formation de métastases, elle induit une résistance aux

traitements anti-cancéreux, elle favorise l'instabilité génomique et une augmentation du nombre de mutations, et elle inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale. Figure réalisée grâce à BioRender.

2.3.2.1. Le rôle de l'hypoxie dans l'instabilité génomique

L'hypoxie intra-tumorale est responsable de l'instabilité génomique au sein des tumeurs. En effet, l'hypoxie est associée à une augmentation du nombre de mutations, une diminution de l'expression des gènes ayant un rôle au niveau de la réparation de l'ADN ainsi que la création de cassures double brins (DSB – *double strand breaks*) [81].

Suite à l'apparition de lésions, les cellules vont initier des voies de réponse complexes (*DDR – DNA damage response*) relatives aux lésions générées au niveau de l'ADN, comprenant la phosphorylation de multiples protéines de réparation par les kinases ATR (*Ataxia Telangiectasia and RAD3-related*), et ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) [82]. Il a été démontré que l'hypoxie provoque indirectement des dommages au niveau de l'ADN. Ces dommages se présentent sous la forme d'un stress de réplication, comme le montre l'accumulation de gamma-H2AX (*H2A histone family member X*). Cette accumulation est directement engendrée par l'hypoxie et est dépendante de l'ATR [83]. Outre la réponse d'ATR induite par l'hypoxie, il a également été démontré qu'ATM joue un rôle protecteur dans la réponse cellulaire à l'hypoxie. Ainsi, la déplétion d'ATM dans les cellules hypoxiques engendre une accumulation des lésions à l'ADN et une baisse des taux de réplication, ce qui soutient le rôle d'ATM dans la prévention des dommages induits par l'hypoxie et le maintien de l'intégrité de la fourche de réplication dans des conditions hypoxiques [84].

En outre, il a été montré que l'hypoxie augmente les ROS [85, 86] et induit un stress de réplication dans divers cancers [87]. De même, il a été constaté que l'hypoxie augmentait le stress de réplication dans les cellules cancéreuses du sein, ce qui active ensuite la signalisation médiée par ATR et ATM [84, 85, 88]. De plus, l'hypoxie stimule les mitochondries à produire de grandes quantités de ROS, qui à leur tour stabilisent HIF-1α, ce qui induit un stress de réplication et une instabilité génomique [89, 90].

Une autre force motrice de l'instabilité génomique est l'induction par l'hypoxie de l'épissage alternatif des gènes de la DDR et de la réparation de l'ADN [91]. Par exemple, dans les cellules cancéreuses colorectales hypoxiques, les transcrits codants de la DDR sont transformés en transcrits non codants par épissage alternatif des introns du gène *HDAC6*, ce qui entraîne une altération de la réparation des DSB au niveau de l'ADN et une instabilité génomique, par modulation de l'inhibition de TP53BP1 (Protéine de liaison 1 du suppresseur de tumeur p53) et du co-facteur de TP53 [92, 93].

Parmi les mécanismes de réparation de l'ADN, nous pouvons retrouver entre autres la réparation par jonction non-homologue (NHEJ), par mésappariement (MMR), la réparation par excision de bases (BER), ainsi que la réparation par recombinaison homologue (HRR) [94]. Dans des conditions hypoxiques, HIF-1α est capable d'inhiber les micro-ARNs *miR-210* et *miR-373*, qui régulent des facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN [95].

En cas de DSB, l'hypoxie induit la diminution des gènes de réparation de celles-ci, y compris les gènes de la HRR tels que *RAD51* [96]. En outre, il a été constaté que l'hypoxie est corrélée avec une HRR défectueuse dans les tumeurs [97]. L'hypoxie induit des mutations dans de nombreux gènes de la HRR, par exemple les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (respectivement *Breast Cancer Associated 1 et 2*). *BRCA1* est un gène suppresseur de tumeur qui est souvent muté et associé à la progression tumorale, notamment dans les cancers du sein [98]. Il a été démontré que HIF-1α peut créer des modifications épigénétiques du gène *BRCA1* en diminuant la méthylation H3K4 de son promoteur [99].

L'hypoxie diminue également la plupart des gènes impliqués dans la NHEJ [100]. En particulier, l'expression de l'*ADN ligase IV* (LIGIV), un composant clé de la NHEJ, est réduite de plus de 1,5 fois par l'hypoxie, ce qui concorde avec des résultats antérieurs concernant les cancers de la prostate [96]. De même, l'hypoxie entraîne une diminution et une mutation du gène *XRCC4* (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, compromettant ainsi la NHEJ [85, 96, 101]. Il est pertinent de noter que l'hypoxie supprime l'expression du gène suppresseur de tumeur

PTEN, ce qui entraîne une déficience dans la réparation des DSB médiée par le NHEJ [97, 101].

Il est bien connu que les gènes essentiels à une MMR efficace (par exemple *MLH1 (mutL homolog 1)*, *MSH2 (MutS homolog 2)* et *MSH6 (MutS homolog 6)*) sont diminués par l'hypoxie au niveau transcriptionnel, traductionnel et épigénétique. Cela augmente la mutagenèse et l'instabilité génomique [102-106]. Par exemple, il a été démontré que l'hypoxie réduit la méthylation de l'histone H3 lysine 4 (H3K4) sur le promoteur de *MLH1*, ce qui entraîne une inhibition épigénétique de *MLH1*, un phénomène courant dans les cancers colorectaux sporadiques [104]. HIF-1α est également capable de diminuer la reconnaissance du mauvais appariement des paires de bases en inhibant l'expression de *MSH2* et *MSH6*, qui forment un complexe responsable de reconnaître ces mauvais appariements, appelé MutSα [107].

Enfin, l'hypoxie peut entraîner une régulation négative du BER, ce qui peut augmenter la fréquence des mutations de paires de bases et favoriser l'instabilité génomique. Par exemple, l'hypoxie chronique réduit considérablement la régulation de nombreuses protéines de réparation BER dans les cellules cancéreuses, telles que OGG1 (*oxoguanine glycosylase*), et MTH1 (*MutT homolog 1*) [108], provoquant ainsi l'accumulation de dommages et entraînant une instabilité génomique. De même, l'hypoxie supprime l'expression de la protéine ATMIN (*ATM interactor protein*), qui est impliquée dans le BER [109], par le biais de p53 et HIF-1α, et de manière dépendante de la présence d'oxygène [110]. Enfin, l'hypoxie peut altérer la fonction des voies BER en empêchant l'accumulation de XRCC1 (X-*ray repair cross-complementing protein 1*) ou en induisant des mutations somatiques dans le gène *XRCC1* [85, 111].

2.3.2.2. L'implication de l'hypoxie concernant la dédifférenciation cellulaire et les cellules souches cancéreuses

Au sein des tumeurs ont été découvertes des cellules indifférenciées ou dédifférenciées, c'est-à-dire qu'elles possèdent des caractéristiques similaires aux cellules souches. Elles sont appelées cellules souches cancéreuses (CSCs), et

possèdent des capacités de renouvellement et de multipotence. Elles sont soupçonnées d'être fortement impliquées non seulement dans la progression tumorale, mais également dans les rechutes et la formation de métastases [112]. L'identité et le développement de ces CSCs sont contrôlés par différents facteurs, dont : BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), Notch, Oct-4 (*Octamer-binding transcription factor 4*), SOX2 (*Sex determining region Y-box 2*), Wnt, JAK-STAT (*Janus kinases - Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*) et Shh (*Sonic hedgehog)* [113].

Il a été établi que l'hypoxie régule des facteurs de transcription impliqués dans ces voies de signalisation, tels que Notch et Oct4 [114]. En effet, dans des conditions hypoxiques, la signalisation Notch1 est activée et augmente l'activité du promoteur de SOX2, promouvant ainsi la résistance aux traitements des cellules souches du cancer de l'ovaire. De même, dans le cancer du sein, HIF-2α peut activer la voie Notch pour promouvoir la transformation phénotypique des CSCs et augmenter leur résistance au paclitaxel [115]. L'hypoxie peut également renforcer le caractère souche des cellules cancéreuses du pancréas et leur résistance thérapeutique en activant la cascade de signalisation Akt/Notch1 [116].

Dans le microenvironnement hypoxique, il a également été rapporté que HIF-1α active directement la signalisation Wnt/β-caténine au niveau des cellules souches embryonnaires [117] et affecte l'activité transcriptionnelle de la β-caténine [118]. En outre, les inhibiteurs de HIF-1α ou de Wnt/β-caténine ont montré des effets cliniques thérapeutiques bénéfiques sur des xénogreffes dérivées de patients (PDX) et pourraient être efficaces contre les leucémies résistantes [119]. HIF-2α peut engendrer l'expression de c-Myc, et ainsi augmenter les caractéristiques des cellules souches en activant la voie Wnt. Lorsque la voie Wnt est inhibée, la résistance des cellules cancéreuses au paclitaxel induite par HIF-2α est inversée [115].

De plus, l'hypoxie peut donner lieu à l'activation de la transcription ainsi qu'à la traduction de la voie Shh, qui joue un rôle important dans le maintien du phénotype souche des cellules du cholangiocarcinome [120, 121]. Enfin, l'hypoxie peut favoriser la prolifération des CSCs en activant des voies telles que NFκB [121], PI3K/Akt [122, 123]

et STAT3 [124], et ainsi augmenter leur résistance aux traitements anti-cancéreux, notamment la radiothérapie et la chimiothérapie.

2.3.2.3. Le rôle de l'hypoxie dans l'angiogenèse tumorale

Pour répondre à la demande en oxygène au sein de la tumeur, les cellules cancéreuses hypoxiques activent un programme transcriptionnel, post-transcriptionnel, translationnel et épigénétique à multiples facettes qui conduit à la génération de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus s'appelle l'angiogenèse ; il est nécessaire non seulement pour l'apport d'oxygène, mais aussi pour la croissance de la tumeur et la formation de métastases [125]. En raison du mauvais équilibre des facteurs angiogéniques produits dans le TME hypoxique, les néovaisseaux angiogéniques deviennent dilatés, tortueux, désorganisés, tout en étant fonctionnellement hyperperméables, aggravant ainsi l'hypoxie [126].

Comme mentionné précédemment, HIF-1α induit la transcription de gènes cibles ayant un rôle dans l'angiogenèse, tels que *VEGF* et *PDGF*. Le facteur HIF-1α peut également réguler l'expression de gènes encodant pour les facteurs angiogéniques Angiopoiétine 1 et 2, et PGF (*Placental growth factor*) [127]. HIF-2α est également impliqué dans l'angiogenèse en induisant la transcription de gènes cibles communs avec HIF-1α, et favorise des formes de cancers relativement agressives [128, 129].

2.3.2.4. Le rôle de l'hypoxie dans l'invasion et le processus métastatique

L'invasion ainsi que la formation de métastases se font grâce à différents processus : la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT – *epithelial to mesenchymal transition*), dans laquelle les cellules cancéreuses perdent leurs marqueurs épithéliaux en faveur de marqueurs mésenchymateux pour permettre leur motilité ; la dégradation de la MEC, qui permet l'invasion des cellules tumorales ; et la formation d'un système vasculaire permettant la dissémination des cellules cancéreuses [130].

En plus de leur rôle dans l'angiogenèse tumorale, les facteurs HIFs peuvent réguler l'EMT en surexprimant des gènes responsables de la baisse d'expression d'E-cadhérine, permettant ainsi la perte des marqueurs épithéliaux. Ces gènes sont *SNAI1*, *TWIST (Twist Family BHLH Transcription Factor 1)*, *ZEB1 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1)* et *ZEB2 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1) [131-135]*. De plus, les facteurs HIFs ont une fonction dans la régulation de la dégradation de la MEC, notamment grâce à l'activation des Métalloprotéases 1 et 2 (MMP-1 et MMP-2) [136]. Enfin, la régulation des facteurs angiogéniques et des gènes impliqués dans l'angiogenèse, mentionnée dans la partie précédente, participe à la dissémination des cellules cancéreuses en créant un réseau vasculaire le permettant.

2.3.2.5. L'influence de l'hypoxie au niveau la réponse immunitaire dirigée contre le cancer

L'établissement de conditions hypoxiques influence plusieurs aspects de la réponse immunitaire contre le cancer (**Figure 9**) : (**1**) l'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur en attirant des cellules immunosuppressives, (**2**) la surexpression de membres constituant les points de contrôles immunitaires inhibiteurs, (**3**) l'activation de l'autophagie donnant lieu à la l'inhibition de l'activité des cellules cytotoxiques, (**4**) l'expression de HLA-G par les cellules tumorales pour tromper la reconnaissance du système immunitaire.

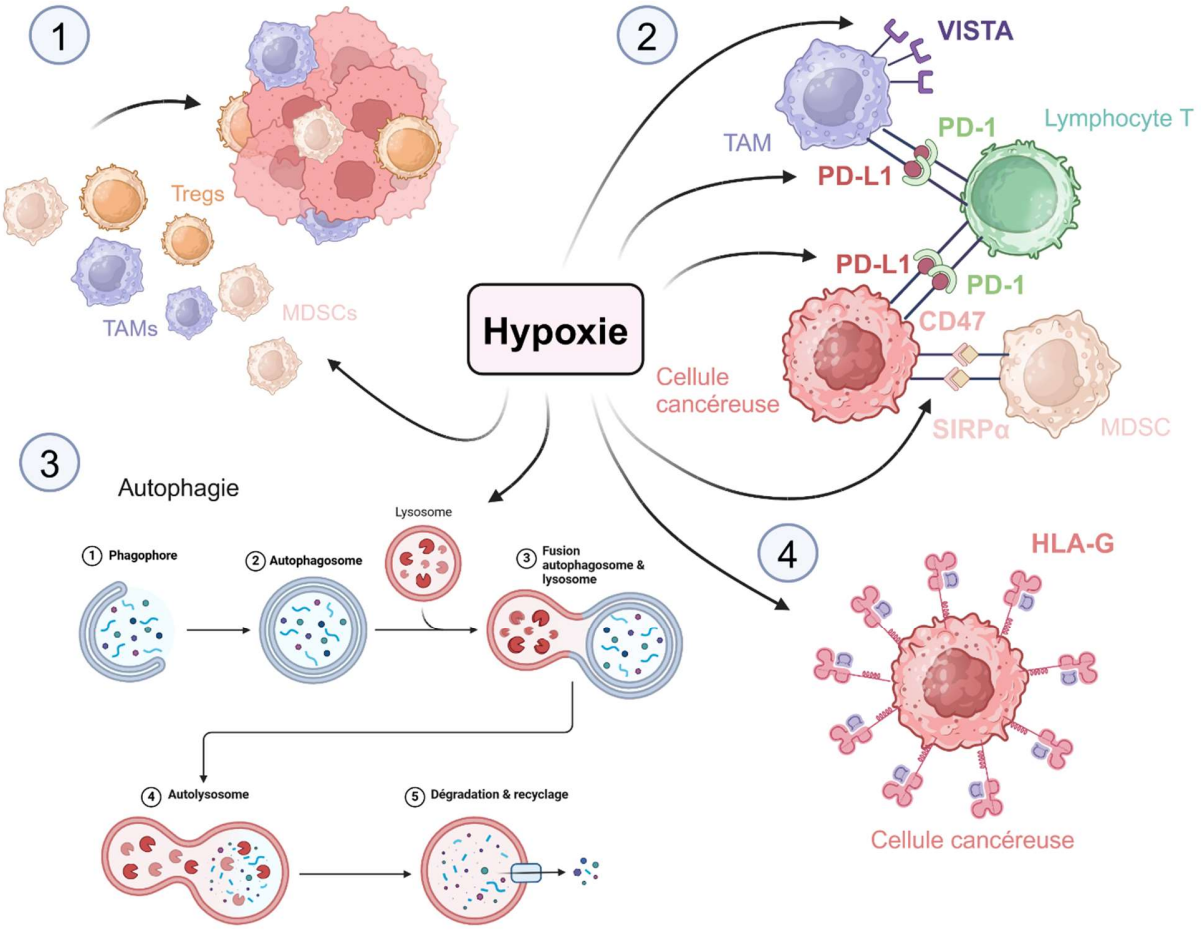


Figure 9 : L'influence de l'hypoxie tumorale sur la réponse immunitaire.

*L'hypoxie diminue la réponse immunitaire dans le contexte tumoral par différents processus : (**1**) L'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur en attirant les cellules immunosuppressives Tregs, MDSCs et Macrophages associés aux tumeurs (TAMs), (**2**) La surexpression de membres constituant les points de contrôles immunitaires inhibiteurs, (**3**) L'induction de l'autophagie résultant en l'inhibition de l'activité des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques, et (**4**) L'expression de HLA-G au niveau des cellules malignes pour tromper la reconnaissance du système immunitaire. Figure réalisée grâce à BioRender.*

Il a été montré que l'hypoxie favorise la création d'un TME immunosuppresseur. En effet, les facteurs HIFs augmentent l'infiltration de cellules immunosuppressives telles que les MDSCs, les Tregs et les TAMs [137-139].

De plus, les facteurs HIFs peuvent avoir un effet direct sur les cellules immunitaires en inhibant l'activité cytotoxique des lymphocytes T ainsi que la fonction des cellules dendritiques [140, 141]. Il a également été montré que PD-L1 est une cible directe de HIF-1α, et que dans des conditions hypoxiques, l'expression de PD-L1 était retrouvée de manière plus importante sur les MDSCs, les macrophages, les cellules dendritiques (DCs) ainsi que les cellules tumorales [142]. Le récepteur VISTA (*V-domain Immunoglobulin Suppressor of T-cell Activation*), point de contrôle immunitaire des cellules T, est également surexprimé par les MDSCs en hypoxie, ce qui résulte en l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules T et de leur prolifération [143, 144]. HIF-1α va aussi augmenter l'expression du cluster de différenciation 47 (CD47) en surface des cellules tumorales ; celui ci va se lier à SIRPα (*Signal Regulatory Protein α*), récepteur se trouvant sur les macrophages, pour bloquer leur activité phagocytaire [145, 146]. Un autre mécanisme utilisé par HIF-1α pour impacter négativement l'immunité anti-tumorale est l'activation de l'autophagie, qui va empêcher la destruction des cellules malignes par les cellules immunitaires cytotoxiques (lymphocytes T et NK) [147-149]. Le ciblage de l'autophagie permet d'améliorer la réponse à différentes stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses [150] (**Annexe I**). Enfin, l'hypoxie résulte en l'augmentation de l'expression de molécules de HLA-G par les cellules tumorales, considéré comme point de contrôle immunitaire faisant partie du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Ces molécules vont se fixer aux récepteurs inhibiteurs des cellules immunitaires pour empêcher la surveillance et la reconnaissance des cellules malignes par celles-ci [151-153].

2.3.2.6. La résistance aux traitements contre le cancer médiée par l'hypoxie

L'hypoxie induit une résistance à la chimiothérapie, la radiothérapie et l'immunothérapie. Cette résistance passe par différents mécanismes : l'efflux des médicaments anti-cancéreux, l'autophagie, l'inhibition de la sénescence et de l'apoptose, et l'inhibition de la réparation des dommages à l'ADN [154].

Dans des conditions hypoxiques, HIF -1α est capable d'activer le gène *MDR1* (*MultiDrug Resistance 1*) [155]. Le gène *MDR1* code pour une glycoprotéine qui agit

comme une pompe à efflux, et qui diminue ainsi la concentration intracellulaire de médicaments chimiothérapeutiques dans les cellules de gliome, de cancer gastrique, de cancer du côlon et de cancer du sein [156-159].

De plus, le contrôle de la prolifération et de la survie des cellules tumorales médiée par l'hypoxie résulte en une résistance à la chimiothérapie. HIF-1α régule une variété de gènes pro-apoptotiques, tels que *BNIP3* et *BNIP3L*, et de nombreux gènes anti-apoptotiques, tels que *Bcl-2*, *p53* et *NFκB* [160-162]. Ainsi, HIF-1α a été décrit comme ayant un rôle suppresseur de l'apoptose après traitement par chimiothérapie, notamment par inhibition de l'activation de p53 en réduisant la formation de ROS [163]. L'efficacité de la chimiothérapie peut également être affectée par la régulation des systèmes de réparation de l'ADN par l'hypoxie (détaillée au niveau de la section 2.3.2.1).

Outre l'apoptose, l'hypoxie régule également l'autophagie, notamment par induction de BNIP3 et BNIP3L, ce qui déstabilise le complexe régulateur de l'autophagie Bcl-2/Beclin 1 [164, 165]. Ainsi, il a été établi que l'induction de l'autophagie de manière dépendante de l'hypoxie entraîne la résistance des cellules cancéreuses aux traitements anti-cancéreux [166].

Concernant la radiothérapie, il a été établi que la formation de ROS est empêchée en conditions hypoxiques, normalement induite après traitement par radiothérapie et censée provoquer des DSB au niveau de l'ADN pour induire la mort des cellules cancéreuses [167]. L'hypoxie participe également à la résistance à la radiothérapie en induisant l'expression de SPINK1 (*Serine Protease Inhibitor Kazal type 1*) à des concentrations d'oxygène inférieures à 0,1% ; cette résistance est dépendante de EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) et de Nrf-2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) [168]. SPINK1 est impliqué dans la communication entre la tumeur et le stroma, l'EMT et la formation de CSCs ; il est également impliqué au niveau de la résistance à la chimiothérapie, et est corrélé à un mauvais pronostic [169].

En outre, la résistance à la chimiothérapie ainsi que la radiothérapie est également médiée par les facteurs angiogéniques dont l'expression est engendrée par l'hypoxie : VEGF, FGF et PDGF, décrits précédemment [170-172]. De nombreuses stratégies anti-angiogéniques sont évaluées pour améliorer la réponse aux traitements, notamment des

stratégies anti-VEGF ; cependant, cette stratégie est limitée par des mécanismes de compensation impliquant les autres facteurs FGF et PDGF [173-175].

Enfin, il est maintenant bien décrit dans la littérature que le rôle de l'hypoxie dans l'attraction des cellules immunosuppressives dans le microenvironnement et dans la modulation de la réponse immunitaire engendrent la résistance aux traitements contre le cancer, notamment à l'immunothérapie par blocage des points de contrôle immunitaires [176, 177]. Les points de contrôle immunitaire incluent notamment les couples CD40/CD40L, CD80/CD86, PD-1/PD-L1 et LAG3/CMH II. L'influence de l'hypoxie sur l'immunité dans un contexte tumoral et la création d'un environnement immunosuppresseur est développée dans les parties 3.3.2.5, 3.2.2., 3.2.3, et 4.2.3.

3. La réponse immunitaire anti-tumorale

3.1. Les bases du système immunitaire

3.1.1. L'immunité innée

L'immunité innée correspond à la première étape de défense de l'organisme contre les pathogènes. C'est une réponse rapide, contrairement à l'immunité adaptative. Cette dernière s'installe plusieurs heures, voir plusieurs jours après l'entrée d'un pathogène dans l'organisme. Elle est composée par plusieurs défenses : une défense physique, avec la présence de barrières physiques telles que la peau et les muqueuses ; une défense cellulaire, avec l'attaque des pathogènes par les cellules immunitaires ; et enfin une défense moléculaire, avec la coordination de la réponse immunitaire grâce aux cytokines et interférons (IFN). Elle est non spécifique, puisqu'elle ne dépend pas du type d'antigènes présent [178].

Pour être capable de répondre à la présence d'un pathogène, les cellules du système immunitaire inné doivent d'abord le détecter. Pour cela, elles possèdent à leur surface des récepteurs appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*), qui sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes exogènes (PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou des motifs moléculaires endogènes associés aux dégâts (DAMP - *Damage-Associated Molecular Patterns*) [179]. De plus, les cellules immunitaires sont en capacité de dissocier les cellules du « soi » et du « non soi », grâce à la présence de marqueurs du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA/CMH). Les cellules du « soi » expriment ces marqueurs à leur surface, ce qui n'est pas le cas des cellules du « non soi » [180].

La plupart des cellules de l'immunité innée émanent d'une cellule myéloïde progénitrice, qui est commune et qui se différencie en granulocyte (neutrophile, éosinophile, basophile), ou en monocyte. Les monocytes peuvent à leur tour se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques. Les cellules NK font également partie de l'immunité innée, mais proviennent d'une cellule lymphoïde progénitrice (**Figure 10**) [181]. Dans cette partie seront décrites les cellules considérées comme appartenant à l'immunité innée, ainsi que leurs fonctions.

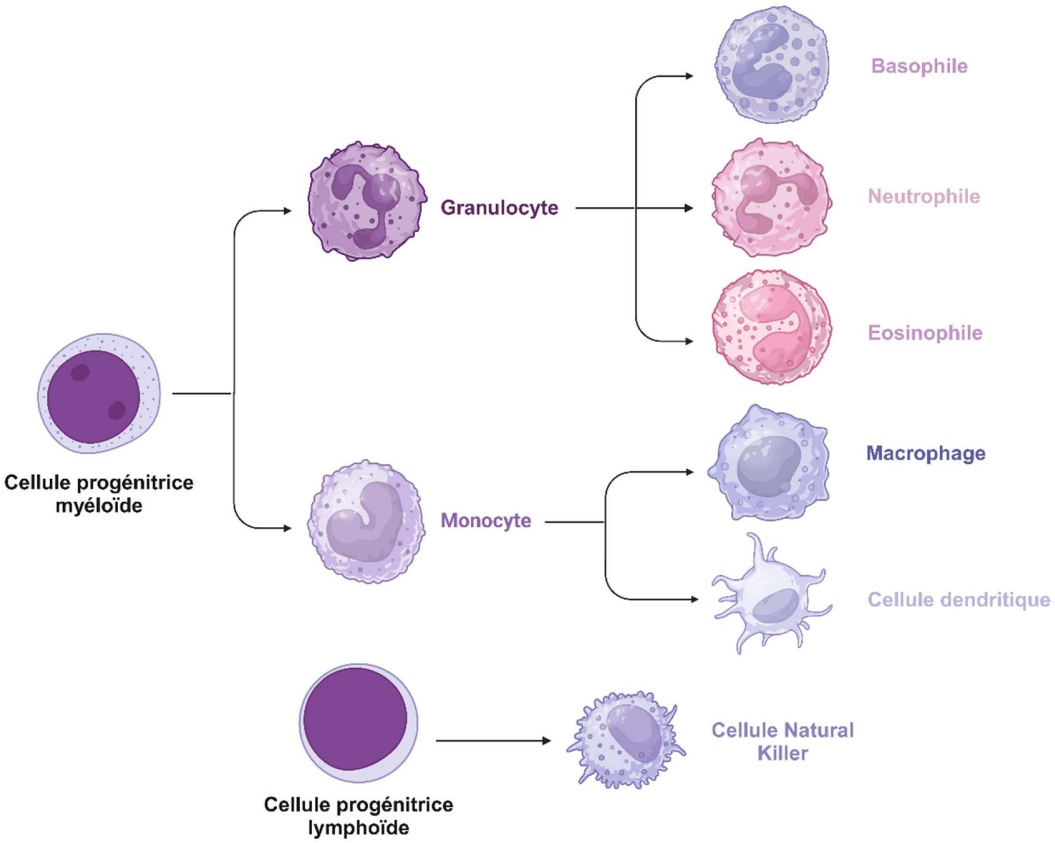


Figure 10 : Schéma représentant les cellules faisant partie de l'immunité innée.

Une cellule myéloïde progénitrice commune peut se différencier en granulocyte (neutrophile, éosinophile, basophile), ou en monocyte. Les monocytes peuvent à leur tour se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques. Les cellules NK font également partie de l'immunité innée, mais proviennent d'une cellule lymphoïde progénitrice. Figure réalisée grâce à BioRender.

3.1.1.1. Les macrophages

Les macrophages peuvent être d'origine embryonnaire et être déjà présents dans les tissus, ou provenir de la différenciation de monocytes en macrophages. Ils sont capables de phagocytose, c'est-à-dire qu'ils peuvent ingérer des particules d'origine étrangère. Une fois le pathogène ingéré, la vésicule intracellulaire contenant celui-ci, appelée phagosome, va fusionner avec un lysosome. Le pathogène va alors être détruit grâce aux enzymes lysosomales [182].

Les macrophages ont donc un rôle de destruction de pathogènes, mais peuvent aussi avoir une fonction de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour induire l'immunité adaptative. En effet, ils sont capables de présenter à leur surface des molécules du CMH de classe II, ce qui va résulter en la stimulation des lymphocytes T CD4 + [183].

Depuis une vingtaine d'années, il a été proposé une distinction entre deux types de macrophages. Ces deux types correspondent aux macrophages M1 et M2. Les M1 seraient plutôt impliqués dans la destruction des pathogènes, tandis que les M2 seraient plutôt impliqués dans les processus de cicatrisation. Ainsi, les macrophages M1 sécrètent plutôt des cytokines et molécules pro-inflammatoires telles que le TNF-α (*Tumor Necrosis Factor α*), les interleukines (IL) α, β, 6, 12, 18 et 23, et des ROS. A leur surface, nous retrouvons également la présence de récepteurs de chimiokines, CCR1, 2 et 5. Les macrophages M2, quant à eux, sécrètent plutôt des cytokines de résolution de l'inflammation, telles que l'IL 10 et le TGF-β [184, 185].

3.1.1.2. Les cellules dendritiques

Cette sous-population est également capable de phagocytose, mais possède un pouvoir de migration plus fort que celui des macrophages. Ces cellules dendritiques sont décrites comme des cellules sentinelles, puisqu'elles patrouillent dans tout l'organisme pour détecter les agents pathogènes et alerter les autres cellules du système immunitaire [186]. Une fois le pathogène capturé, elles vont le fragmenter en petits peptides immunogènes : c'est le « *processing* ». Ces peptides vont alors être chargés au niveau de molécules du CMH de classe II. Elles vont ensuite perdre leurs récepteurs de cytokines pro-inflammatoires pour en acquérir de nouveaux, qui vont leur permettre de migrer : c'est la maturation. En effet, les cellules dendritiques immatures expriment différents récepteurs de chimiokines, tels que CCR1, 2, 5, 6, et CXCR1, 2 et 4 ; lorsqu'elles vont devenir matures, elles vont augmenter l'expression d'autres récepteurs à leur surface, tels que CCR7 [187]. CCR7 va lier la chimiokine CCL21 produite par les vaisseaux lymphatiques ; ainsi, une fois matures, elles vont migrer vers les ganglions lymphatiques, pour rencontrer les lymphocytes naïfs et les activer par présentation de l'antigène [188].

La maturation des cellules dendritiques est très importante et cruciale pour l'activation des lymphocytes T. En effet, les cellules dendritiques matures vont exprimer des molécules du CMH de classe I et II. Elles vont de plus présenter des molécules co-stimulatoires : CD80/CD86 ainsi que CD40 [189]. Le complexe CMH/peptide va être reconnu par le récepteur des cellules T (TCR - *T cell receptor*). De plus, il va y avoir co-stimulation entre CD28 présent sur les cellules T CD8+ et CD80/CD86 [190], ou co-stimulation entre CD40L présent sur les cellules T CD4+ et CD40 [191]. Enfin, la sécrétion cytokinique de ces DCs matures va induire la différenciation des cellules T en cellules T effectrices, *helper* (T*helper*) ou régulatrices (Tregs).

3.1.1.3. Les granulocytes

Les granulocytes sont caractérisés par un large cytoplasme et un noyau multilobé. Ils sont divisés en trois sous-types : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Parmi ces trois sous-types, la population la plus abondante est celle des neutrophiles, qui sont capables de phagocyter et de digérer les agents pathogènes. Les granules qu'ils possèdent peuvent être déversés par exocytose pour limiter l'inflammation [192]. Les basophiles contiennent de l'histamine dans leurs granules, qu'ils déversent pour attirer d'autres cellules immunitaires et activer la réaction inflammatoire ou allergique [193]. Les éosinophiles, quant à eux, ne réalisent pas de phagocytose ; ils se fixent sur les agents pathogènes et déversent leurs granules contenant diverses substances capables de les détruire [194]. Les granulocytes n'ont pas de fonction présentatrice d'antigènes.

3.1.1.4. Les cellules Natural Killer

Ces cellules appelées tueuses naturelles, vont directement reconnaître l'existence de pathogènes à l'aide de récepteurs spécifiques : les récepteurs KIR (*Killer Ig-like Receptors*). Contrairement aux cellules T CD8+, les cellules NK sont cytotoxiques de manière naturelle et ne requièrent pas d'activation au préalable. Elles vont cibler les cellules « anormales », c'est-à-dire les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus [195].

Les récepteurs KIR reconnaissent les molécules du CMH de classe I, donc les cellules du « soi ». Ainsi, l'activation de ces récepteurs KIR va empêcher l'activité des cellules NK. Celles-ci possèdent de plus des récepteurs activateurs, appelés KAR (*Killer Cell Activating Receptors*), qui peuvent reconnaître les molécules du « non soi » et les molécules provenant de cellules stressées [196], ce qui va résulter en l'activation des cellules NK. Les cellules NK activées vont déverser leur contenu cytotoxique par dégranulation pour induire la lyse des cellules cibles. Leurs granules sont constitués de perforine, de granzymes A, B, H, K et M, et de granulysine [197]. Lors de la rencontre avec un pathogène, les cellules NK vont adhérer à la cellule cible grâce aux intégrines, et former une synapse immunologique. Les granules vont alors être transportés le long des microtubules jusqu'à la synapse, et entrer en fusion avec la membrane plasmique pour relarguer leur contenu cytotoxique [198]. Egalement, la perforine crée des pores au niveau des membranes des cellules cibles en présence de calcium, ce qui permet au granzyme B d'entrer directement dans les cellules cibles [199].

Ces cellules tueuses sont également aptes à la toxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC – *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytoxicity*). En effet, elles expriment à leur surface le marqueur CD16, qui correspond à un fragment constant d'immunoglobulines. CD16 est un récepteur de la partie Fc des anticorps ; il peut donc lier des anticorps antiviraux ou anti-tumoraux développés par le système immunitaire contre les antigènes présents sur des cellules infectées ou tumorales [200].

3.1.2. L'immunité adaptative

Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative n'est pas une réponse rapide et peut mettre jusqu'à plusieurs jours à se mettre en place. Elle est dépendante de l'activation par présentation d'antigènes et repose sur les lymphocytes B et les lymphocytes T, qui dérivent d'une cellule progénitrice lymphoïde commune (**Figure 11**). Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale, c'est-à-dire par production d'anticorps, tandis que les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire.

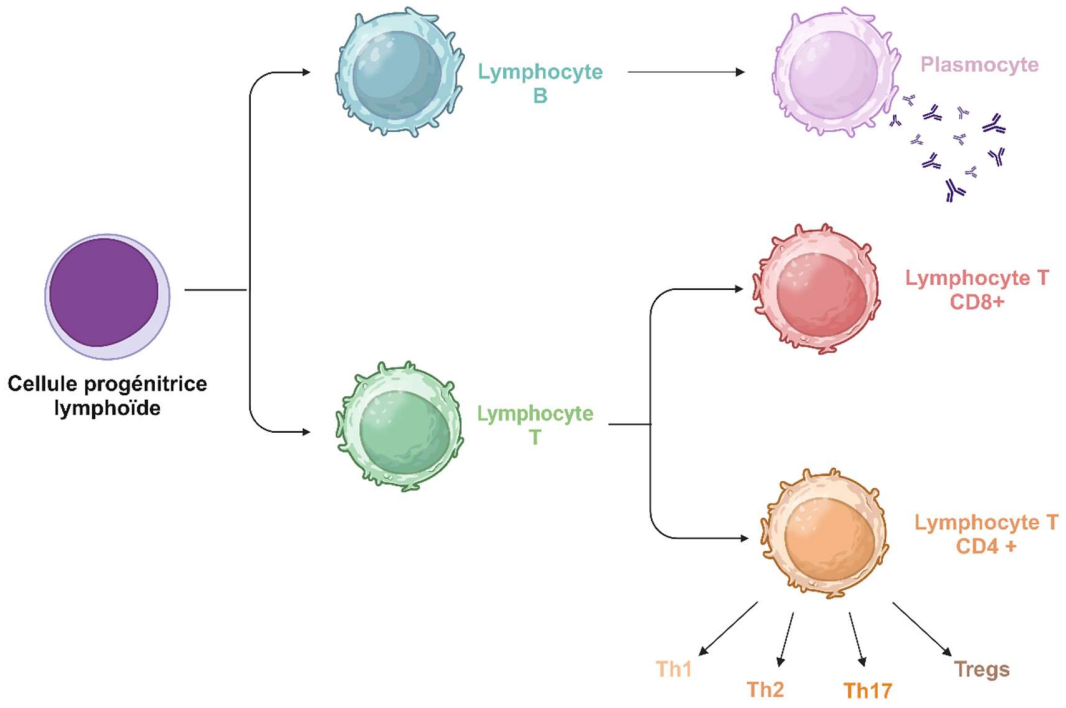


Figure 11 : Schéma représentant les cellules faisant partie de l'immunité adaptative.

Les lymphocytes B et T dérivent d'une cellule progénitrice lymphoïde. Une fois activés, les lymphocytes B alors appelés plasmocytes, vont être responsables de la production d'anticorps. Les lymphocytes T peuvent se différencier en lymphocytes T CD8+ ou T CD4+. Ces derniers vont à leur tour subir une différenciation, soit en lymphocytes T helper 1, 2, 17 ou en Tregs. Figure réalisée grâce à BioRender.

3.1.2.1. Les lymphocytes B

Au niveau de la membrane des cellules B naïves se trouvent des immunoglobulines, petites structures protéiques, qui vont lier les antigènes. Ainsi, les antigènes présentés par les CPA activent directement les cellules B par liaison sur leur récepteur spécifique BCR (*B-Cell Receptor*), aussi appelé zone d'ancrage membranaire. Il existe également des immunoglobulines solubles, appelées anticorps, qui sont produites par les plasmocytes (lymphocytes B activés), et qui vont se fixer sur les agents pathogènes [201].

Les antigènes sont reconnus par les lymphocytes B de manière thymus-dépendante ou thymus-indépendante. Dans le mode thymus-dépendant, les lymphocytes

B sont activés par un lymphocyte T CD4+, lui-même activé par un antigène. Dans ce cas, les cellules dendritiques ont présenté un épitope de l'antigène à la cellule T CD4+, qui va elle-même fixer cet épitope sur son récepteur pour le présenter au CMH de classe II du lymphocyte B, via l'interaction du CD40L du lymphocyte T avec le CD40 du lymphocyte B. Ceci va induire une réponse spécifique avec sécrétion d'anticorps et mémorisation de l'agent pathogène par le système immunitaire [202]. Dans le mode thymus-indépendant, les lymphocytes B sont activés indépendamment des cellules T CD4+. C'est un processus non spécifique qui n'induit pas de mémoire du système immunitaire, mais qui induit quand même la production d'un seul type d'anticorps (Immunoglobine M) [203].

3.1.2.2. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont séparés en lymphocytes T CD4+ et CD8+, qui expriment respectivement les marqueurs CD4 et CD8. Les cellules T CD4+ peuvent à leur tour être différenciées en quatre sous-types : les T *helper* Th1, Th2, Th17 ainsi que les Tregs [204]. Cela va dépendre du type de signal induit par les cellules dendritiques. Par exemple, une sécrétion d'interféron gamma et d'IL-12 va induire une différenciation en Th1, tandis que la sécrétion de TGF-β et d'IL-2 va plutôt résulter en une différenciation en Tregs [205, 206].

Les lymphocytes Th1 favorisent l'immunité cellulaire mentionnée précédemment, *via* les cellules T CD8+ et les macrophages, en produisant de l'IFN gamma, de l'IL-2 et de la lymphotoxine ; tandis que les lymphocytes Th2 soutiennent la production d'anticorps par les lymphocytes B, en produisant de l'IL 4, 5, 6, 10 et 13, et favorisent donc l'immunité humorale [207]. Les lymphocytes Th17, quant à eux, vont favoriser les réponses inflammatoires grâce à la production d'IL 17, 21 et 22 [208]. Enfin, les cellules Tregs sont définies par l'expression de différents marqueurs : CD4, CD25 ainsi que Foxp3. Elles sont essentielles à la régulation de l'inflammation et la prévention de maladies auto-immunes, puisqu'elles exercent une modulation de l'activité des cellules T effectrices *via* différents mécanismes. Parmi ces mécanismes, nous retrouvons la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TGF-β, la cytolyse des cellules avec le déversement de

granzyme ou de perforine, et la suppression de la fonction des cellules dendritiques ou même de leur maturation [209].

Nous pouvons retrouver les lymphocytes T CD8+ naïfs dans le sang ainsi que les organes lymphoïdes secondaires. En cas de pénétration par un agent pathogène, ils vont être activés par les cellules dendritiques. Cela va induire leur prolifération ainsi que leur différenciation en cellules effectrices, pour ensuite migrer au niveau de l'endroit où se trouvent les pathogènes. Une fois le pathogène éliminé, une partie d'entre eux va se différencier en lymphocytes T mémoires. Ceux-ci ne sont plus activés, mais sont prêts à se différencier à nouveau en cellules effectrices en cas de nouvelle stimulation par le pathogène, pour induire une réponse plus rapide [210].

Les cellules T CD8+ peuvent atteindre un état d'épuisement après une exposition prolongée aux antigènes. Cet état est décrit par une perte graduelle de leurs fonctions effectrices, ainsi que de l'expression de molécules de contrôle immunitaire, telles que CTLA-4, PD-1, et LAG-3 [211].

3.2. Le système immunitaire dans le contexte du cancer

Le chapitre précédent fait état des différents composants du système immunitaire et de leurs fonctions dans l'homéostasie et la défense de l'organisme contre les agents pathogènes externes et les cellules infectées/transformées. Malgré ce système robuste, les cellules malignes parviennent à s'esquiver de la surveillance et de la destruction médiée par le système immunitaire pour progresser. Dans cette partie seront décrits les différents mécanismes grâce auxquels les cellules tumorales peuvent tromper les cellules du système immunitaire, et ainsi échapper à leur surveillance.

L'échappement des cellules tumorales comprend trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Il s'agit de la théorie des trois E, aussi appelée *immuno-editing* des cancers [212].

Lors de l'initiation tumorale, les cellules saines peuvent subir des modifications génétiques et devenir cancéreuses. Lors de la première phase, l'élimination, les cellules du système immunitaire sont capables de reconnaître les cellules anormales et de les éliminer par les mécanismes décrits précédemment. Durant la phase d'équilibre, il y a une balance entre l'accumulation de cellules cancéreuses et la réponse anti-tumorale du système immunitaire ; ainsi, la tumeur ne se développe pas. Cette phase est également appelée phase de latence, et peut durer plusieurs années. Cependant, l'élimination constante des cellules tumorales va créer une pression de sélection, et favoriser l'apparition et la croissance de cellules cancéreuses portant de plus en plus de mutations, et de ce fait, de plus en plus résistantes au système immunitaire. C'est là que commence l'étape d'échappement [213].

Pour échapper au système immunitaire, les cellules cancéreuses utilisent différents mécanismes : une baisse de l'expression d'antigènes tumoraux, une déficience dans le recrutement des CPA et leur maturation/activation, l'élaboration d'un TME immunosuppresseur, et la dérégulation du réseau de cytokines et de chimiokines [214] (**Annexe III**) (**Figure 12**).

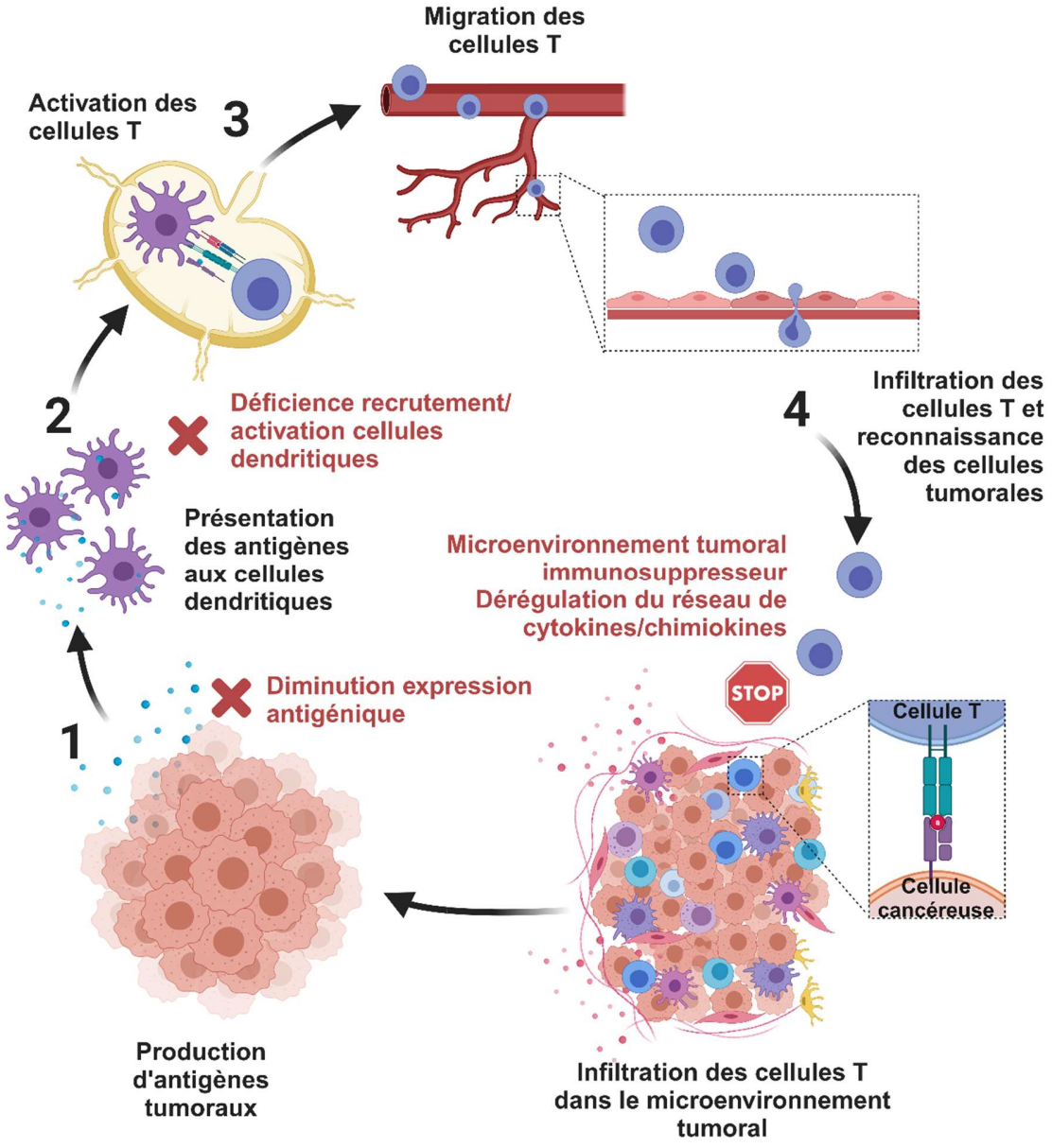


Figure 12 : Schéma représentant les mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses pour échapper au système immunitaire.

*La réponse immunitaire se déroule en plusieurs étapes : (**1**) La production d'antigènes tumoraux par les cellules cancéreuses, (**2**) La capture de ces antigènes par les cellules dendritiques, (**3**) La présentation antigénique aux cellules T pour induire leur activation et (**4**) La migration des lymphocytes T activés pour infiltrer le TME. Les mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses pour échapper au système immunitaire sont représentés en rouge à chaque étape. Figure adaptée de Benoit et al., Cells,* ***2023 (Annexe III)****.*

3.2.1. La diminution de l'expression d'antigènes tumoraux spécifiques

Cette reconnaissance des antigènes tumoraux constitue une étape clé du cycle immunitaire anti-tumoral. Les antigènes tumoraux peuvent être divisés en deux groupes : nous retrouvons les antigènes spécifiques de la tumeur (TSA – *Tumor-Specific Antigens*) produits uniquement par les cellules cancéreuses et non par les cellules saines, et les antigènes associés à la tumeur (TAA – *Tumor-Associated Antigens*). Ces derniers peuvent être produits à la fois par les cellules cancéreuses et par les cellules saines, mais sont présents de manière plus importante à la surface des cellules cancéreuses [215].

Ces antigènes sont générés à partir d'un vaste répertoire de gènes qui ont subi diverses mutations, pour finalement exprimer des protéines anormales. Fondamentalement, les antigènes sont nécessaires pour déclencher une réponse immunitaire innée, puis engendrer une réponse immunitaire adaptative après présentation répétée [216]. Après leur recrutement, les CPA seront en charge de présenter des fragments d'antigènes aux cellules T afin de les activer pour tuer les cellules cancéreuses et éliminer les tumeurs [217]. Cependant, le système immunitaire ne peut pas reconnaître la majorité des antigènes tumoraux, car ils sont considérés comme des protéines du soi [218]. En effet, les TAA sont des auto-antigènes qui ne subissent pas de mutations et qui sont exprimés dans les tissus sains. De ce fait, il y a une absence d'immunogénicité et une tolérance par les cellules immunitaires [215].

3.2.2. La déficience dans le recrutement des CPA ainsi que leur maturation/activation

Après la reconnaissance des antigènes tumoraux, la deuxième phase correspond à la présentation de ces antigènes par les CPA. Elles vont les présenter aux cellules T. Plusieurs sous-types de CPA ont été caractérisées. Les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) sont regroupées en cDCs de type un (cDC1s) et de type deux

(cDC2s). Nous retrouvons également les DCs plasmacytoïdes (pDCs), les DCs dérivées de monocytes (MoDCs), également connues sous le nom de cellules dendritiques inflammatoires (iDCs), les macrophages et les cellules de Langerhans [219].

Bien que chaque sous-type de CPA soit responsable de différentes fonctions dans la réponse immunitaire, les cDC1s sont les plus importantes pour la réponse immunitaire anti-tumorale car elles sont responsables de l'engendrement de la réponse anti-tumorale médiée par les cellules T CD8+ après la présentation d'antigènes tumoraux par le biais du CMH-I [220]. Il est désormais bien établi que la présentation croisée d'antigènes médiée par les cDC1s favorise une réponse cytotoxique clé dans le TME, bien que d'autres sous-types de cellules dendritiques, telles que les MoDCs, peuvent également participer à la présentation croisée des antigènes et à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques [221]. En outre, les cDC1s sont importantes dans la réponse à la thérapie anti-PD-L1 [222], puisque la survie des patients a été positivement corrélée à l'abondance des cDCs1 infiltrant les tumeurs. Cela fait des cDC1s un facteur clé de la réponse anti-tumorale [222-224].

Pour induire une réponse efficace par les lymphocytes T, les cellules dendritiques doivent être activées. Comme mentionné précédemment, cette activation se caractérise par l'expression de récepteurs PRR et la liaison de PAMPs ou de DAMPs [225]. Une faible production ou l'absence de PAMPs ou de DAMPs pourrait être engendrer l'absence de maturation des cellules dendritiques et, en conséquence, l'absence d'activation des cellules T naïves. En outre, l'activation des CPA est pilotée par la stimulation de leurs récepteurs CD40. Cette stimulation régule l'expression des récepteurs co-activateurs CD80 et CD86, présents au niveau des cellules T [226]. Un défaut de stimulation des CPA entraîne donc une réduction des réponses anti-tumorales induites par les cellules T CD8+.

Dans des conditions hypoxiques, une diminution des marqueurs de différenciation et de maturation des cellules dendritiques (CD40, CD80, CD86) est observée, ainsi qu'une diminution de leur capacité de présentation des antigènes aux cellules T [227]. De plus, VEGF induit par HIF-1α en hypoxie inhibe la maturation des DCs et accroît l'expression de PD-L1 à leur surface [228, 229]. En outre, l'hypoxie induit l'expression

d’un large panel de gènes codant pour des chimiokines par les cellules dendritiques [230] (**Tableau 6**) :

Tableau 6 : Les différents gènes codant pour des chimiokines ou leurs récepteurs régulés en hypoxie dans les cellules dendritiques.

L’hypoxie entraîne une augmentation ou une diminution de l’expression par les cellules dendritiques de gènes codant pour des chimiokines ou leurs récepteurs. Les chimiokines sont capables d’attirer les cellules immunitaires. Adapté de Winning et al., J Immunol Res, ***2016.***

Gène régulé par l’hypoxie dans les DCs	Augmentation ou diminution de l’expression par l’hypoxie	Fonction
CX3CR1, CCR3, CCR2, CXCR4	Augmentation	Liaison des chimiokines CX3CL1, CCL2, CCL3, CXCL19, CXCL10, et CXCL11
CCL13, CCL14, CCL24, CCL26	Diminution	Réponse Th2, migration des basophiles et éosinophiles
CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8	Augmentation	Recrutement des neutrophiles
CCL20, CCL3, CCL5	Augmentation	Recrutement des lymphocytes T activés, des monocytes et des DCs immatures
CCL18, CCL23	Diminution	Recrutement des cellules T naïves

Cela signifie que l'hypoxie ne favorise pas seulement la migration des DC matures, mais qu'elle module également leur répertoire inflammatoire afin d'attirer d'autres cellules immunitaires et de diriger l'activation des lymphocytes T.

3.2.3. La création d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur

Les cellules immunitaires suppressives telles que les TAMs, les CAFs, les Tregs et les MDSCs sont des composants majeurs impliqués dans l'établissement d'un TME immunosuppressif. Les TAMs sont recrutés dans le TME et subissent une polarisation pour générer des macrophages affichant un phénotype anti-tumoral (M1) ou des macrophages présentant un phénotype pro-tumoral (M2) [231]. Les macrophages M2 pro-tumoraux favorisent l'angiogenèse, la formation de métastases, ainsi que les voies de signalisation clés impliquées dans la résistance aux traitements [232].

Contrairement aux fibroblastes normaux qui sont activés à la suite du processus de cicatrisation, de l'inflammation ou de la fibrose, les CAFs sont des cellules stromales activées de manière constitutive qui produisent de la MEC, des facteurs de croissance et des cytokines, afin de promouvoir l'angiogenèse et de recruter des cellules immunitaires suppressives [233].

Les Tregs sont parmi les cellules immunosuppressives les plus abondantes dans le TME. Comme mentionné précédemment, ils sont importants dans la préservation de l'homéostasie immunitaire ; leur présence est associée à un mauvais pronostic [234]. Les Tregs sont également associés à la progression du cancer, à l'invasion et aux métastases ; ils constituent des cibles d'intérêt dans le traitement du cancer [235].

Enfin, les MDSCs, cellules immatures d'origine myéloïde qui apparaissent au cours d'une inflammation chronique ou à des stades de cancer avancés, sont des régulateurs majeurs de la progression tumorale en sécrétant des cytokines telles que le TGF-β, le VEGF et la MMP9 pour favoriser l'angiogenèse et le processus métastatique [236]. Les MDSCs interagissent également avec les cellules NK, les cellules T, et les macrophages pour exercer des effets immunosuppresseurs et inhiber leur activation. De plus, les MDSCs favorisent la prolifération et l'activation des Tregs [237].

Outre la présence de cellules immunosuppressives, plusieurs voies ont été identifiées comme des composants clés impliqués dans le fonctionnement des lymphocytes T. En effet, une perte d'expression du gène *PTEN* a été corrélée à

l'expression de cytokines immunosuppressives et à la diminution du nombre de cellules T dans le TME, en plus d'une résistance à l'immunothérapie [238]. Une autre voie impliquée dans l'exclusion des cellules T est la voie WNT/β-caténine. Dans le mélanome, l'activation intra-tumorale de la β-caténine a été associée à l'absence de cDC1s et de cellules T CD8+ effectrices, ainsi qu'à une résistance aux traitements anti-PD-L1 et anti-CTLA-4 [239].

En plus des cellules immunitaires suppressives décrites ci-dessus, le stress hypoxique dans le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans la résistance immunitaire et contribue à l'affaiblissement de la destruction tumorale médiée par les cellules immunitaires [143, 240-243] (développé dans la partie II). Comme mentionné précédemment, il a été montré que l'hypoxie favorise l'établissement d'un TME immunosuppresseur. En effet, les facteurs HIFs augmentent l'infiltration de cellules immunosuppressives telles que les MDSCs, les Tregs et les macrophages associés aux tumeurs [137-139].

De nouvelles données émergentes démontrent que l'hypoxie est impliquée dans l'altération du métabolisme et des métabolites tumoraux, la régulation du pH et la surexpression de plusieurs points de contrôle immunitaire, notamment les points de contrôle immunitaire des macrophages, CD47, PD-L1 et HLA-G [145, 241-243]. L'hypoxie est donc une cible de choix pour encourager les réponses immunitaires anti-tumorales. Cibler l'hypoxie ou des facteurs en aval de la voie de la réponse à l'hypoxie a démontré pouvoir renforcer la destruction des cellules tumorales médiée par les lymphocytes T et les cellules NK [244-246].

3.2.4. La dérégulation du réseau de cytokines et de chimiokines

Plusieurs cytokines influencent la progression des cancers ainsi que la réponse aux traitements contre le cancer. Par exemple, dans le cancer urothélial métastatique et le cancer du côlon, le TGF-β contribue à l'absence de cellules T infiltrées et à la faible réponse à l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 [247]. Le blocage du TGF-β combiné au

traitement anti-PD-L1 contribue à une hausse de l'infiltration des cellules T et à une baisse de la croissance tumorale dans des modèles murins [248]. Outre le TGF-β, l'IFN gamma (IFNγ), l'IL-2 et l'IL-9 contribuent également à l'efficacité de la thérapie anti-PD-1 [249]. En effet, l'IFNγ régule l'expression de PD-L1 via JAK1, JAK2 et différents STATs [250]. L'IL-2 a une fonction fondamentale résultant en l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4+ et CD8+, et sa combinaison avec l'immunothérapie anti-PD-1 a montré de résultats prometteurs [251-253]. Enfin, l'IL-9 augmente la présentation des molécules du CMH de classe I et la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD8+, et pourrait donc accroître l'efficience de l'immunothérapie anti-PD-1 [249, 254].

Le réseau de chimiokines, cytokines chimio-attractantes, joue un rôle important dans le trafic des cellules immunitaires et l'infiltration immunitaire. Dans le contexte du cancer, les voies inflammatoires sont dérégulées, ce qui entraîne une libération accrue de chimiokines. Ce dérèglement a un impact sur la progression cancéreuse, en affectant l'infiltration des cellules immunitaires dans le TME. En effet, il a été rapporté que les chimiokines CXCL9, 10, 11 et 16 ainsi que le CX3CL1 sont responsables du recrutement des cellules T et des cellules NK dans les tumeurs [255]. Les chimiokines CCL19 et 21 peuvent favoriser le recrutement des cellules dendritiques dans les sites d'amorçage des cellules T, conduisant ainsi à leur activation [256]. Une hausse de CXCL16 a été mise en relation avec une augmentation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ infiltrant la tumeur et un meilleur pronostic pour les patients atteints de cancer colorectal [257]. Dans le mélanome, les chimiokines CCL2, 3, 4 et 5 ainsi que CXCL9 et 10 ont été signalées comme induisant une migration efficace des cellules T dans le TME [258]. Dans des tumeurs de mélanome murin, le ciblage de HIF-1α a induit une hausse de la chimiokine pro-inflammatoire CCL5, associée à une meilleure infiltration des cellules T CD4+ et CD8+ [259] (**Annexe II**). Les chimiokines et leurs récepteurs, leurs fonctions, leur régulation par l'hypoxie ainsi que leurs rôles dans la progression tumorale seront décrits dans la partie ci-après.

4. Les récepteurs de chimiokines : classiques versus atypiques

4.1. Les chimiokines : structure et fonctions

Les chimiokines sont de petites molécules chimio-attractantes, d'environ 70 à 100 acides aminés, qui possèdent toutes une séquence et une structure similaires, avec des motifs conservés : les ponts disulfures. Il existe quatre sous-familles de molécules chimio-attractantes, définies en fonction de l'espace entre les deux premiers résidus cystéine : XC, CC, CXC et CX3C (**Figure 13**).



Figure 13 : Schéma représentant la structure des différentes sous-familles de chimiokines.

La chaîne peptidique est représentée en bleu, et les ponts disulfures sont représentés en rouge. C = cystéine. Figure tirée de Sahingur SE et Yeudall WA, Front. Immunol. ***2015****.*

Parmi la sous-famille CXC, nous retrouvons les chimiokines CXCL1, à 17 ; pour la sous-famille CC, nous y trouvons les chimiokines CCL1 à 28. La sous-famille XC possède seulement deux chimiokines, XCL1 et XCL2. Enfin, la sous-famille CX3C ne contient qu'une seule chimiokine : CX3CL1 [260].

En plus de leur classification structurelle, les chimiokines peuvent être classifiées en fonction de leur fonction : homéostatique et/ou inflammatoire. Les chimiokines à fonction homéostatique sont produites de manière constitutive par certains tissus ; en revanche, les chimiokines inflammatoires sont produites en réponse à des stimuli : infection, inflammation, cancer. Après un stimulus, les chimiokines sont produites par le tissu ou les leucocytes infiltrés dans ce tissu, ou dans le cas du cancer, par les cellules

cancéreuses et les cellules du stroma. Les chimiokines inflammatoires sont représentées par les CCL1 à 5, et les CXCL1 à 11 [261].

Le rôle des chimiokines est d'induire la migration des cellules immunitaires ainsi que leur activation [187]. En se fixant sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules, elles vont intervenir dans de nombreux processus physiologiques, tels que l'organogenèse, l'hématopoïèse, l'apoptose, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire [262]. Elles sont considérées comme des chefs d'orchestre, puisqu'elles vont coordonner le fonctionnement du système immunitaire. Ces récepteurs spécifiques seront décrits dans la partie suivante.

4.2. Les récepteurs de chimiokines conventionnels

4.2.1. La structure et la fonction des récepteurs de chimiokines conventionnels

Ces récepteurs conventionnels correspondent à des récepteurs à 7 segments transmembranaires (R7TM) couplés aux protéines G. Nous distinguons quatre types différents : les récepteurs CCR1 à 10 qui vont lier les chimiokines de la sous-famille CC, les récepteurs CXCR1 à 7 qui vont lier les chimiokines de la sous-famille CXC, les récepteurs XCR1 et 2 qui vont lier les chimiokines CXCL1 et 2, et enfin le récepteur CX3CR1, qui va lier la chimiokine CX3CL1 [263, 264].

Les chimiokines se lient aux récepteurs au niveau des boucles extracellulaires ou de l'extrémité N-terminale de ceux-ci. Une fois liées, la partie N-terminale du récepteur va pénétrer dans la partie heptahélique pour induire un changement de conformation, qui va se traduire par des signaux intracellulaires et l'activation de voies de signalisation [264]. De plus, ces récepteurs de chimiokines possèdent au niveau de leur seconde boucle intra-cellulaire un motif conservé, appelé DRYLAIV, qui permet la liaison de protéines G aux récepteurs [265, 266]. Ce motif est décrit par la séquence d'acides aminés suivante :

Asparagine – Arginine – Tyrosine – Leucine – Alanine – Isoleucine – Valine (Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ile-Val) [266].

4.2.2. Les récepteurs conventionnels et leurs chimiokines dans le développement des cancers

Les chimiokines et leurs récepteurs conventionnels sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (embryogenèse, hématopoïèse, cicatrisation) et pathologiques (asthme, allergies, maladies auto-immunes, développement tumoral). En effet, il a été montré que chaque récepteur de chimiokines a un rôle dans au moins une fonction immune bien précise, allant de la surveillance immunitaire à la présentation antigénique [267]. Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement à l'implication des principaux couples chimiokines/récepteurs de chimiokines dans la progression du cancer.

Un gradient de molécules chimiques est responsable du déplacement des cellules immunitaires : c'est la chimiotaxie. C'est de cette façon qu'elles sont recrutées au niveau des sites infectieux, ou dans ce cas, au niveau des sites tumoraux. Le recrutement de ces cellules va être déterminé par les récepteurs de chimiokines qu'elles expriment à leur surface, mais aussi par la nature des chimiokines produites par les cellules du TME [268].

Parmi les récepteurs de chimiokines conventionnels impliqués dans la progression tumorale, il a été montré que le récepteur CCR4 joue un rôle important dans le recrutement des cellules Tregs, cellules immunosuppressives qui jouent une fonction prépondérante dans le maintien de l'homéostasie ainsi que la réponse immunitaire à diverses pathologies. Dans le cas du cancer, les cellules Tregs inhibent la réponse immunitaire et favorisent la croissance tumorale [269]. Cette immunosuppression est médiée par les chimiokines CCL17 et CCL22 dans les cancers du sein, les cancers gastriques et les cancers de l'œsophage [270-272]. De plus, il a été démontré que CCR4 favorise la résistance à des agents chimiothérapeutiques, par exemple le 5-fluorouracil [273]. Egalement, les Tregs exprimant le récepteur CCR4 facilitent la formation de

métastases après radiothérapie en interagissant avec les TAMs [274]. Des anticorps anti-CCR4 sont actuellement étudiés en essais cliniques pour déterminer leur potentiel pour éliminer les Tregs dans les tumeurs solides [275] et les cancers liquides [276]. CCR10 induit également le recrutement des Tregs via le ligand CCL28, qui est surexprimé chez les patients atteints de cancer colorectal [277]. Le récepteur CCR4 est également impliqué au niveau du recrutement des cellules Th2 [278] et Th17 [279].

Un autre récepteur de chimiokines essentiel dans le développement tumoral est CCR1. Nous retrouvons son expression sur les lymphocytes T CD8+, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. En effet, il a été montré que l'invasion par les cellules de la microglie associées aux tumeurs est médiée par CCR1 dans les glioblastomes multiformes. L'infiltration de ces macrophages était associée à un taux de malignité plus élevé et un pronostic plus défavorable [280]. CCR1 est également impliqué dans la migration des cellules tumorales dans les cancers du sein [281], le recrutement des TAMs dans les carcinomes hépatocellulaires *via* CCL16 [282], et est considéré comme cible thérapeutique potentielle pour le mélanome et les lymphomes [283, 284].

CCR5 est retrouvé au niveau des cellules Th1, Th17, T CD8+, NK, dendritiques et des monocytes/macrophages. Il correspond également à un récepteur de chimiokines clé dans la progression tumorale. L'expression de CCR5, notamment avec la liaison de CCL5, est liée à une hausse de la charge mutationnelle des tumeurs ainsi qu'une augmentation de PD-L1, et une augmentation de l'infiltration immunitaire dans le cancer colorectal [285]. Il promeut également la migration et l'invasion dans l'adénocarcinome du côlon grâce à la liaison de CCL3 et la voie de signalisation Akt [286], et la progression du cancer colorectal *via* l'axe CCL8/CCR5/mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) [287]. CCR5 est également impliqué dans le cancer du sein. De fait, pour ce dernier, un antagoniste de l'axe CCL5/CCR5 a permis de supprimer la croissance tumorale et le processus métastatique [288]. L'inhibition de l'axe CCL5/CCR5 s'est également montrée efficace dans la réduction de la formation de métastases pour les carcinomes épidermoïdes buccaux [289].

Le récepteur CX3CR1, qui est exprimé par les cellules Th1, les lymphocytes T CD8+, les cellules NK et les monocytes/macrophages est un acteur clé du développement tumoral. En effet, CX3CR1 a récemment été identifié comme un biomarqueur potentiel du TME et du pronostic dans les cancers épithéliaux ovariens [290]. Son ligand, CX3CL1, intervient dans la prolifération des cellules malignes dans ce type de cancers [291]. Il a également été montré que CXCR31 joue un rôle dans la résistance à la radiothérapie dans le cancer du poumon [292] et que sa surexpression est associée à la prolifération des cellules tumorales ainsi qu'au processus métastatique dans les cancers gastriques [293]. Dans les cancers du pancréas, le couple CX3CL1/CX3CR1 active la cascade Akt/NFκB, menant à une prolifération des cellules tumorales et une résistance à l'apoptose [294].

Parmi les chimiokines impliquées dans le développement des cancers, nous retrouvons notamment les chimiokines CCL2 à 5, et les chimiokines CXCL9 et 10. En effet, ces chimiokines ont été associées au recrutement des cellules T CD8+ dans les métastases de mélanomes et dans le TME des cancers de la vessie [258, 295]. Elles constituent ce qu'on appelle la signature inflammatoire, composée également des gènes *CD8A, ICOS (Inducible T-cell COStimulator), GZMK (Granzyme K), HLA-DMA (Major Histocompatibility Complex, Class II, DM Alpha), HLA-DMB (Major Histocompatibility Complex, Class II, DM Beta), HLA-DOA (Major Histocompatibility Complex, Class II, DO Alpha) et HLA-DOB (Major Histocompatibility Complex, Class II, DO Beta)* [295].

Les chimiokines et les récepteurs conventionnels impliqués dans le recrutement de chaque type de cellules immunitaires au sein du site tumoral sont indiqués dans le **Tableau 7** :

Tableau 7 : Tableau récapitulant les différents types de cellules immunitaires et les couples chimiokines/récepteurs de chimiokines impliqués dans leur recrutement.

Les différents types de cellules immunitaires (lymphocytes T CD4+, TCD8+, monocytes/macrophages, cellules NK, neutrophiles, cellules dendritiques, MDSCs) expriment des récepteurs de chimiokines variés, qui peuvent lier un panel de chimiokines et résulter en chimiotactisme.

Type de cellule immunitaire		Récepteurs de chimiokines à leur surface	Ligands
Lymphocytes T CD4+	**Th1**	CCR5 CXCR3 CX3CR1	CCL5 CXCL9, 10, 11 CXC3CL1
	Th2	CCR4 CCR8	CCL17, 22 CCL1
	Th17	CCR2 CCR4-7	CCL2 CCL5
	Tregs	CCR4 CCR10	CCL22 CCL28
Lymphocytes T CD8+		CCR1, 3, 5 CXCR3 CX3CR1	CCL3, 5 CXCL9, 10, 11 CX3CL1
Cellules NK		CCR2, 5 CXCR3 CX3CR1	CCL2, 3, 5, 7, 8, 11, 13 CXCL9, 10 CX3CL1
Monocytes/Macrophages		CCR1, 2, 5 CX3CR1	CCL2, 3, 4, 5, 7, 8 CX3CL1
Neutrophiles		CCR2 CXCR1, 2	CCL2 CXCL5, 6, 8
Cellules dendritiques		CCR1, 3, 5, 6	CCL5, 20

	CXCR1, 2, 4	CXCL8, 12
MDSCs	CCR2 CXCR2, 4	CCL2 CXCL5, 12

4.2.3. La régulation des chimiokines et leurs récepteurs par l'hypoxie tumorale

4.2.3.1. La régulation des récepteurs de chimiokines conventionnels par l'hypoxie

L'hypoxie régule de nombreux récepteurs de chimiokines dans un contexte tumoral. Certains d'entre eux possèdent même des motifs HRE dans leur promoteur [296, 297]. Le **Tableau 8** résume les récepteurs de chimiokines régulés par l'hypoxie :

Tableau 8 : Les récepteurs de chimiokines régulés par l'hypoxie dans le cancer.

Différents récepteurs de chimiokines CC- et CXC- sont régulés par l'hypoxie dans un contexte tumoral. Certains contiennent des motifs HRE dans leur promoteur.

Abréviation : CCU = Cancer du col de l'utérus.

*Informations tirées de Korbecki et al., Int J Mol Sci **2020** et Korbecki et al., Int J Mol Sci **2021**.*

Récepteur de chimiokines	**Ligands**	**Type de régulation par l'hypoxie**	**Présence de motifs HRE dans le promoteur**
Récepteurs CC-			

CCR1	CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23	Diminution de l'expression par les macrophages et monocytes	Oui
CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13	Augmentation de l'expression par macrophages M2 Augmentation de l'expression par monocytes *via* RAGE (*receptor for advanced glycation end-products*)	Oui
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5	Diminution de l'expression par les macrophages Augmentation de l'expression par certains types de cellules cancéreuses (sein, glioblastome)	Oui
CCR6	CCL20	Augmentation de l'axe CCL20/LARC (*liver and activation-regulated chemokine*)	Oui
CCR7	CCL19, CCL21	Augmentation de l'expression par cellules de cancer du sein, de l'ovaire, de la tête et du cou, du poumon Augmentation de l'expression par macrophages ainsi que cellules NK	Oui
CCR10	CCL27, CCL28	Augmentation de l'expression par cellules de cancer de l'ovaire	Non déterminé
Récepteurs CXC-			

CXCR1	CXCL6, CXCL8	Augmentation de l'expression par cellules du CCU	Non déterminé
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	Augmentation de l'expression par cellules du CCU	Non déterminé
CXCR3	CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11	Augmentation de l'expression par cellules de cancer rénal	Non déterminé
CXCR4	CXCL12	Augmentation de l'expression par de nombreux types de cellules cancéreuses (sein, chondrosarcome, colon, glioblastome, pourmon, mélanome…)	Oui
CXCR5	CXCL13	Non déterminé	Oui
CXCR7	CXCL12	Augmentation de l'expression par cellules de glioblastome et prostate mais pas par cellules de leucémie et sein	Non déterminé

4.2.3.2. La régulation des chimiokines par l'hypoxie

En plus de leurs récepteurs, les chimiokines sont également régulées par l'hypoxie [296, 297]. Le **Tableau 9** résume les différentes chimiokines, leurs ligands, leurs fonctions et leur régulation dans des conditions hypoxiques :

Tableau 9 : Les chimiokines régulées par l'hypoxie dans le cancer.

*Différentes chimiokines CC- et CXC- sont régulées par l'hypoxie dans un contexte tumoral. Certaines contiennent des motifs HRE dans leur promoteur. Informations tirées de Korbecki et al., Int J Mol Sci **2020** et Korbecki et al., Int J Mol Sci **2021**.*

Abréviations : CAFs, cancer-associated fibroblasts; CCU = cancer du col de l'utérus; MDSCs, myeloid-derived suppressor cells; TAMs, tumor-associated macrophages; TANs, tumor-associated neutrophils; Tregs, regulatory T cells; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes.

Chimiokines	Récepteurs	Type de cellules recrutées dans le TME	Type de régulation par l'hypoxie
Chimiokines CC-			
CCL2	CCR2, CCR4	MDSCs, TAMs, Th17, TILs, Tregs	Diminution : cellules de gliome, de mélanome, HUVECs, monocytes, macrophages Augmentation : cellules de cancer du sein, poumon, myélome **Promoteur contient HRE**
CCL3	CCR1, CCR5	CAFs, MDSCs, TILs, Tregs	Diminution : cellules NK et macrophages Augmentation : MDA-MB-435S et MCF-7, cellules de leucémie myéloïde aigüe **Promoteur contient HRE**
CCL4	CCR1, CCR5	CAFs, MDSCs, TILs, Tregs	Augmentation : macrophages, cellules du CCU et de leucémie myéloïde aigue
CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	MDSCs, TAMS, TILs, Tregs	Augmentation : cellules de leucémie myéloïde aigue, myélome, MDA-MB-231, ainsi que MDA-MB-435 Diminution : cellules NK activées, monocytes et TAMs **Promoteur contient HRE**

CCL7	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	TAMs	Augmentation : chondrocytes et leucémie myéloïde aigüe Absence de motifs HRE dans le promoteur
CCL8	CCR3, CCR5	TAMs, Tregs	Diminution : monocytes Augmentation : cellules du CCU
CCL11	CCR3, CCR5	Eosinophiles	Augmentation : cellules du CCU Augmentation : TAMs dans cancer du sein
CCL15	CCR1, CCR5, CCR8	MDSCs, TAMs	Augmentation : TAMs Diminution : cellules de carcinome hépatocellulaire
CCL16	CCR1, CCR5, CCR8		Augmentation : cellules de carcinome hépatocellulaire
CCL17	CCR4	Eosinophiles, Th17, TILs, Tregs	Augmentation : MDA-MB-231 (mais pas MCF-7), cellules du CCU et du cancer de l'ovaire
CCL18	CCR8	Tregs	Augmentation : monocytes et macrophages
CCL19	CCR7	TILs, Tregs	Augmentation : cellules du CCU Diminution : monocytes
CCL20	CCR6	Th17, Tregs	Augmentation : cellules de gliome, de carcinome hépatocellulaire, de cancer de l'ovaire, de cancer de la prostate, monocytes et macrophages **Promoteur contient HRE**
CCL21	CCR7	TILs, Tregs	Augmentation : cellules du CCU et de cancer du sein
CCL22	CCR4	Eosinophiles, Th17, TILs, Tregs	Augmentation : macrophages M2, cellules du CCU et du cancer de l'ovaire

CCL26	CCR3, CX3CR1	Eosinophiles, MDSCs, TAMs	Augmentation : cellules cancéreuses de l'ovaire et carcinome hépatocellulaire, TAMs dans carcinome hépatocellulaire
CCL28	CCR3, CCR10	TILs, Tregs	Augmentation : cellules du CCU, carcinome hépatocellulaire, cancer du poumon, de l'ovaire et mélanome
Chimiokines CXC-			
CXCL1	CXCR2	MDSCs, TANs, Tregs	Augmentation : cellules de leucémie myéloïde aigüe, du CCU, d'hépatocarcinome, de cancer de prostate, de cancer de poumon, macrophages et MDSCs Diminution : mélanome ainsi que cellules de cancer de l'ovaire **Promoteur contient HRE**
CXCL2	CXCR2	MDSCs, TANs	Augmentation : cellules de leucémie myéloïde aigüe, de CCU, d'hépatocarcinome, de cancer de la prostate Diminution : cellules du cancer de l'ovaire et de mélanome **Promoteur contient HRE**
CXCL3	CXCR2	TANs	Augmentation : monocytes, MDSCs et cellules du cancer de la prostate Diminution : cellules du cancer de l'ovaire, cellules de mélanome
CXCL4	CXCR3	TILs, Tregs	Augmentation : cellules de mélanome
CXCL5	CXCR2	MDSCs, TANs	Augmentation : monocytes **Promoteur contient HRE**
CXCL6	CXCR1, CXCR2	TANs	Augmentation : cellules de carcinome hépatocellulaire et de cancer de la prostate

			Diminution : monocytes, cellules du CCU et du cancer du poumon **Promoteur contient HRE**
CXCL7	CXCR2	TANs, TAMs	Augmentation : cellules du CCU
CXCL8	CXCR1, CXCR2	TAMs, TANs, MDSCs	Augmentation : cellules du cancer du pancréas, de l'ovaire, du mélanome, de rhabdomyosarcome, neutrophiles et HUVECs
CXCL9	CXCR3	TILs, Tregs	Augmentation : cellules d'hépatocarcinome
CXCL10	CXCR3	TILs, Tregs	Augmentation : cellules de carcinome hépatocellulaire Diminution : cellules du CCU, de cancer du sein, de l'ovaire, du colon, du poumon **Promoteur contient HRE**
CXCL11	CXCR3	TILs, Tregs	Diminution : cellules du CCU, monocytes
CXCL12	CXCR4, CXCR7	MDSCs, TAMs, TANs, Tregs	Augmentation : cellules du CCU, du cancer rénal, de l'ovaire, de myélome et de glioblastome Diminution : cellules de mélanome et MDSCs
CXCL13	CXCR3, CXCR5	MDSCs, Tregs	Non déterminé **Promoteur contient HRE**
CXCL14	Inconnu	CAFs, TILs	Augmentation : cellules du CCU **Promoteur contient HRE**
CXCL16	CXCR6	TAMs, TILs, Tregs	Augmentation : cellules de carcinome hépatocellulaire, de cancer du sein et HUVECs

4.3. Les récepteurs de chimiokines atypiques (ACKRs)

4.3.1. Les différents membres de la famille des ACKRs : description et fonctions

La famille des récepteurs atypiques de chimiokines est divisée en quatre membres : *Atypical Chemokine Receptor 1* (ACKR1), *Atypical Chemokine Receptor 2* (ACKR2), *Atypical Chemokine Receptor 3* (ACKR3) et *Atypical Chemokine Receptor 4* (ACKR4). Comme les récepteurs de chimiokines conventionnels, ce sont des R7TM. En revanche, ils possèdent une mutation au niveau du motif DRYLAIV de la seconde boucle intracellulaire, qui joue un rôle essentiel dans le couplage des protéines G aux récepteurs. De ce fait, ils sont incapables d'induire les voies de signalisation découlant des protéines G. Pour cette raison, ils sont qualifiés de récepteurs de chimiokines « atypiques » [261]. A la place, les récepteurs vont recruter la β-arrestine, ce qui va mener dans la plupart des cas à leur internalisation [298, 299]. Dans cette partie, nous décrirons les quatre membres de cette famille, leurs ligands et leurs fonctions.

4.3.1.1. ACKR1

Le récepteur ACKR1 était précédemment appelé *Duffy Antigen Receptor for Chemokines* (DARC). Au niveau cellulaire, nous le retrouvons principalement au niveau des érythrocytes et de l'endothélium vasculaire. Au niveau tissulaire, il est principalement exprimé au niveau du système digestif, des tissus reproducteurs tels que l'endomètre, le placenta et le testis, et au niveau des reins et de la peau comme le montre la **Figure 14**.

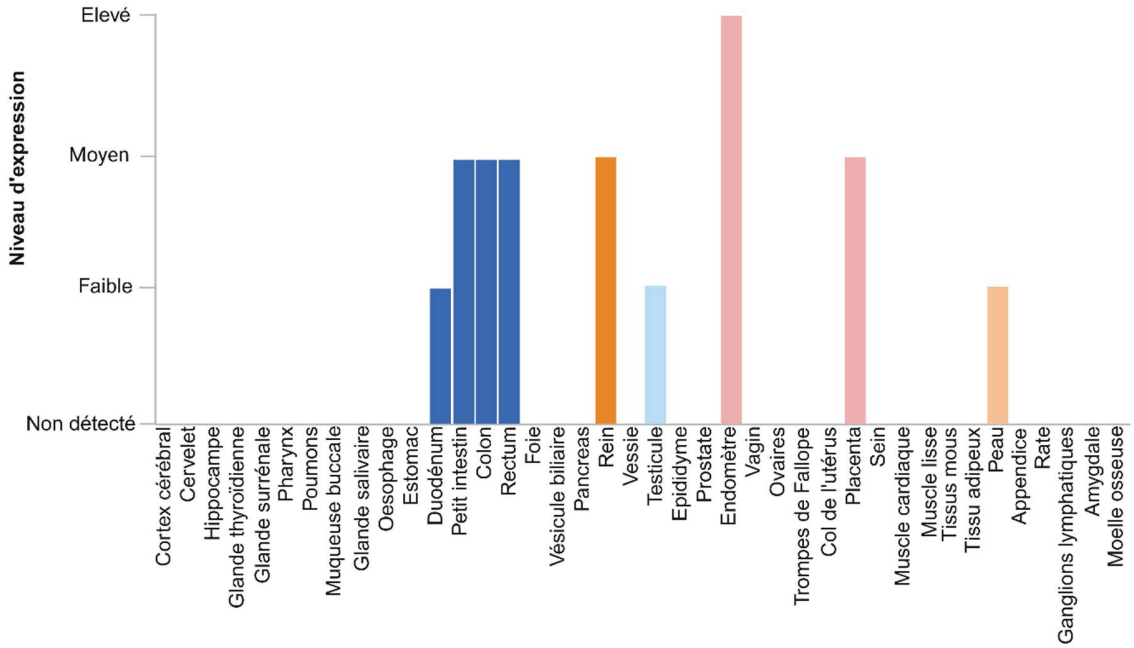


Figure 14 : Représentation de l'expression de ACKR1 au niveau tissulaire.

ACKR1 est principalement exprimé au niveau du système digestif, des tissus reproducteurs, des reins ainsi que de la peau. *Adapté de The Human Protein Atlas.*

ACKR1 possède sept ligands de la famille des CCL : CCL2, 5, 7, 11, 13, 14, 17 ; et cinq ligands de la famille CXC : CXCL1, 5, 6, 8 et 11 (**Figure 18**). Contrairement à ses homologues, ACKR1 ne dégrade pas les ligands qu'il lie ; il a plutôt une fonction de récepteur « présentateur », c'est-à-dire qu'il va internaliser les chimiokines de manière intacte, augmenter leur biodisponibilité et les présenter à d'autres récepteurs de chimiokines à des endroits et à des moments définis. Ainsi, ACKR1 ne va pas dégrader mais tout de même réguler la biodisponibilité des chimiokines et empêcher ou favoriser leur liaison sur d'autres récepteurs de chimiokines, qui vont eux induire une voie de signalisation. ACKR1 est en compétition avec d'autres récepteurs de chimiokines conventionnels, qui peuvent lier les mêmes ligands : CCR 1 à 5, et CXCR1 à 3. Fonctionnellement, ACKR1 agit comme un *buffer* au niveau de la circulation sanguine, et régule la concentration en chimiokines circulantes pour empêcher des fluctuations trop importantes ou une activation excessive du système immunitaire [300, 301].

4.3.1.2. ACKR2

Le récepteur ACKR2 est également connu sous les noms D6 ou CCBP2 (*Chemokine-binding protein 2*). Au niveau cellulaire, nous le trouvons principalement au niveau des cellules endothéliales lymphatiques des tissus périphériques et des organes lymphoïdes, et sur différents leucocytes : lymphocytes B, cellules dendritiques, monocytes ainsi que macrophages [302, 303]. Au niveau tissulaire, nous le retrouvons principalement dans les tissus ayant une fonction « barrière » : la peau, les intestins, les poumons et le placenta (**Figure 15**).

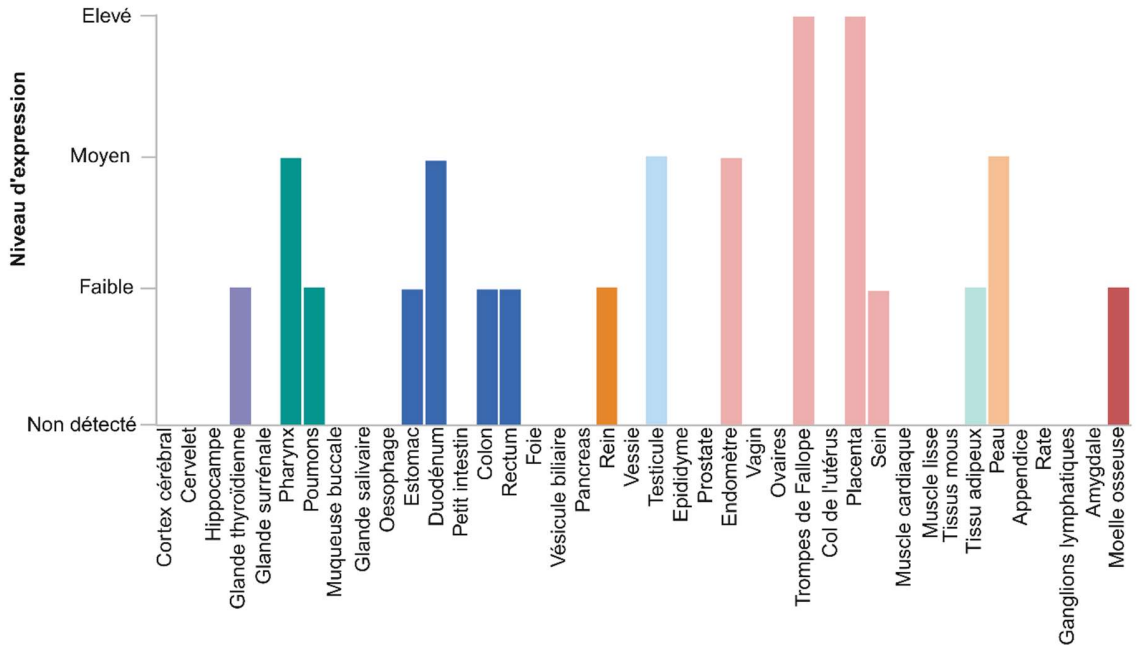


Figure 15 : Représentation de l'expression de ACKR2 au niveau tissulaire.

L'expression de ACKR2 est principalement retrouvée dans les tissus ayant une fonction « barrière » : la peau, les intestins, les poumons et le placenta. Adapté de The Human Protein Atlas.

Les ligands de ACKR2 sont uniquement composés de chimiokines inflammatoires : CCL2 à 8, CCL11 à 14, CCL17 et CCL22 (**Figure 18**). Il a longtemps été pensé que ACKR2 pouvait uniquement lier des chimiokines de la sous-famille CC ; cependant, il a été découvert récemment qu'il est également capable de lier CXCL10, chimiokine pro-

inflammatoire [304]. ACKR2 est également en compétition avec d'autres récepteurs de chimiokines conventionnels, qui peuvent lier les mêmes ligands : les récepteurs CCR1 à 5. Il est le premier récepteur de chimiokines à être décrit comme récepteur « *scavenger* » : en effet, il est capable de réguler le réseau de chimiokines car il circule de manière constitutive entre la surface cellulaire et les compartiments endosomaux pour internaliser les chimiokines qu'il lie et pour les dégrader par voie endosomale. De ce fait, ACKR2 est un acteur majeur de la régulation de la réponse inflammatoire [303].

4.3.1.3. ACKR3

Le récepteur ACKR3 est également appelé CXCR7 ou RDC1. Nous pouvons observer son expression sur les cellules endothéliales, les cellules mésenchymateuses et les lymphocytes B. Au niveau tissulaire, nous le retrouvons dans une grande variété de tissus, représentés dans la **Figure 16**.

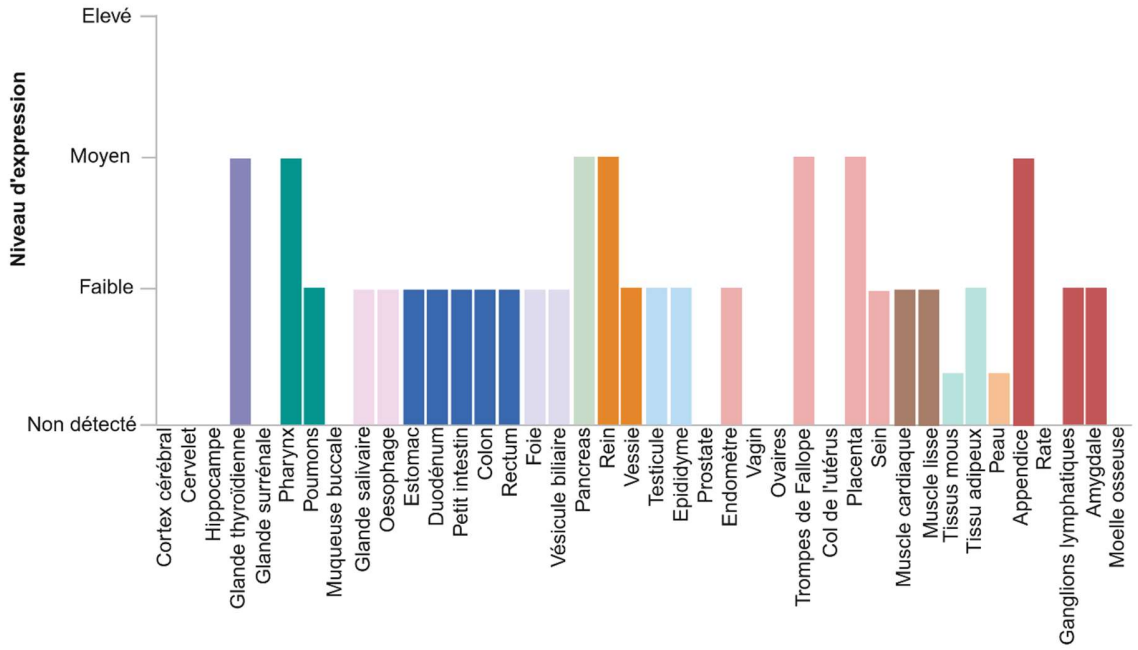


Figure 16 : Représentation de l'expression de ACKR3 au niveau tissulaire.

L'expression de ACKR3 est retrouvée au niveau d'une grande variété de tissus, notamment les tissus digestifs, reproductifs, et cardiaques. Adapté de The Human Protein Atlas.

ACKR3 ne lie que des chimiokines homéostatiques : CXCL11 et CXCL12, qui peuvent également se lier aux récepteurs CXCR3 et CXCR4 (**Figure 18**). Comme son homologue ACKR2, il circule constitutivement entre la surface cellulaire et les compartiments endosomaux, et est également qualifié de récepteur « *scavenger* ». Au niveau physiologique, ACKR3 aurait une fonction dans le développement embryonnaire en modérant le gradient de la chimiokine CXCL12 ; cependant, son implication dans d'autres voies de signalisation potentielles reste à confirmer [305, 306].

4.3.1.4. ACKR4

Le récepteur ACKR4, autrement appelé CCX-CKR ou CCRL1, est exprimé par les kératinocytes, les astrocytes, les cellules endothéliales lymphatiques et les cellules épithéliales du thymus. D'un point de vue tissulaire, il est plutôt exprimé au niveau du système digestif, des glandes surrénales, pituitaires et thyroïdiennes, des poumons et de la peau (**Figure 17**).

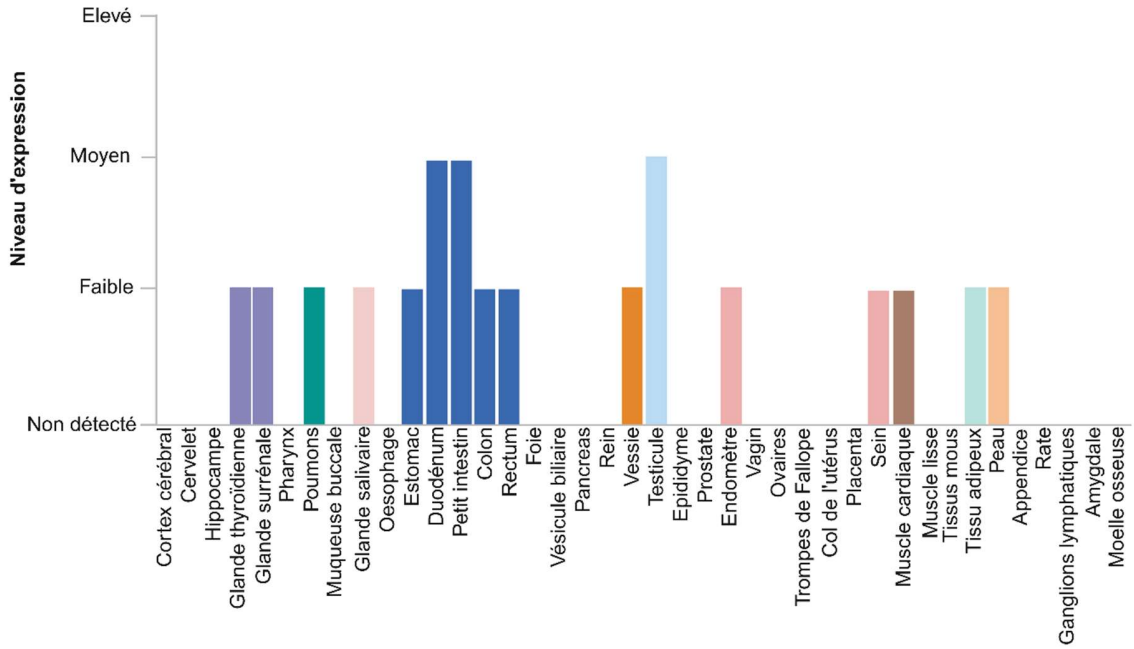


Figure 17 : Représentation de l'expression de ACKR4 au niveau tissulaire.

L'expression de ACKR4 se retrouve principalement au niveau des glandes thyroïdiennes et surrénales, des tissus digestifs, du poumon ainsi que la peau. Adapté de The Human Protein Atlas.

Les ligands de ACKR4 sont uniquement des chimiokines homéostatiques : CCL19, 21, 25 et CXCL13, qui peuvent également se lier aux récepteurs CCR7, 9 et CXCR5 (**Figure 18**). ACKR4 est l'opposé homéostatique du récepteur *scavenger* de chimiokines inflammatoires ACKR2, puisqu'il est également capable de dégrader ces chimiokines homéostatiques. Il est donc capable de réguler le réseau de chimiokines en contrôlant leur biodisponibilité ; cependant, à ce jour, l'implication de ACKR4 dans des voies de signalisation n'a pas été démontrée [300].

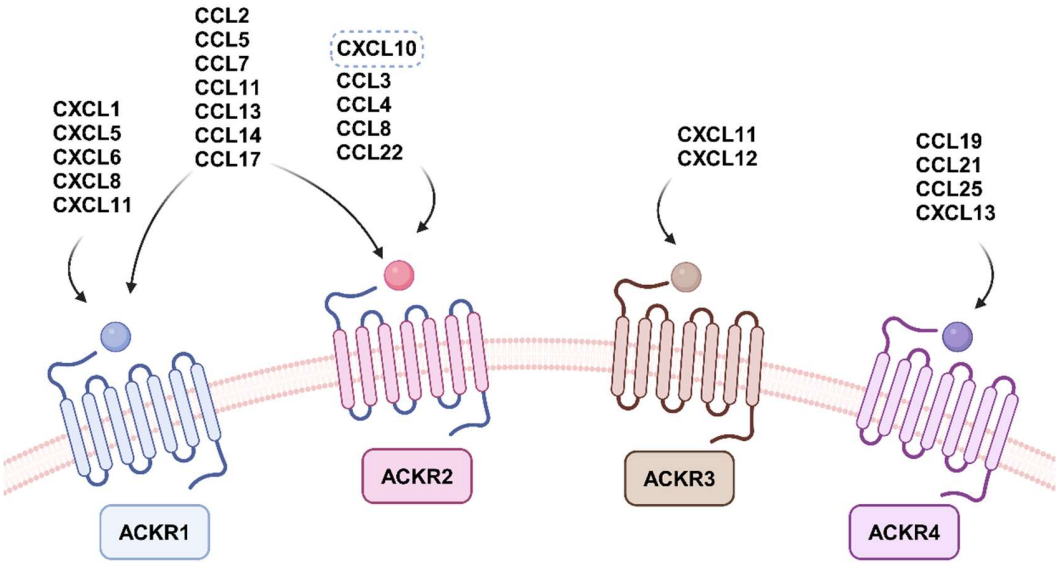


Figure 18 : Schéma représentant les récepteurs ACKRs et leurs ligands.

Les récepteurs ACKR1 et ACKR2 peuvent lier un certain nombre de chimiokines communes : CCL2, 5, 7, 11, 13, 14 et 17. Ils peuvent également lier des chimiokines qui leurs sont propres : CXCL1, 5, 6, 8 et 11 pour ACKR1, et CCL3, 4, 8, 22 et CXCL10 pour ACKR2. Le récepteur ACKR3 peut lier les chimiokines

CXCL11 et 12, et enfin ACKR4 peut lier les chimiokines CCL19, 21, 25 et CXCL13. Figure réalisée grâce à BioRender.

4.3.2. Les récepteurs atypiques additionnels

Plus récemment, de nouveaux récepteurs atypiques présentant des similitudes avec la famille des ACKRs ont été découverts. Il s'agit de GPR182, CCRL2, GPR1, PITPNM3 et C5aR2 [307].

4.3.2.1. GPR182

Le récepteur GPR182 (*Orphan G Protein-Coupled Receptor 182*) est exprimé par les cellules endothéliales du sang et de la lymphe. Ses ligands correspondent à un vaste nombre de chimiokines des sous-familles CC et CXC, notamment CXCL10, 12 et 13, et il joue un rôle dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques [308]. GRP182 est constitutivement couplé à la β-arrestine et est capable d'internaliser ses ligands, ce qui mène à leur endocytose et leur dégradation par voie endosomale [309]. Dans un contexte tumoral, il a été établi que GPR182 est surexprimé au niveau des cellules endothéliales lymphatiques. Il régule l'immunité anti-tumorale *via* l'axe CXCL9/CXCL10/CXCR3, et son inhibition améliore la réponse à l'immunothérapie dans des modèles murins de mélanome [310]. Le traitement de ces cellules endothéliales avec du DMOG (dimethyloxalylglycine), capable de mimer l'hypoxie en stabilisant HIF-1α, induisait une hausse de l'expression de GPR182, insinuant que la régulation de celui-ci pourrait être orchestrée par l'hypoxie [310, 311].

4.3.2.2. CCRL2 et GPR1

Les récepteurs CCRL2 (*CC motif chemokine Receptor-like 2*) et GPR1 (*G Protein-Coupled Receptor 1*) sont également des récepteurs couplés aux protéines G possédant une forte similitude avec les récepteurs de chimiokines conventionnels. Ils se manifestent

au niveau des cellules endothéliales, des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes T [307]. A ce jour, nous ne connaissons pas de chimiokines capables de se lier à ces récepteurs ; en revanche, ils sont capables de lier la chémérine, une molécule chimio-attractante qui ne fait pas partie de la famille des chimiokines [312]. L'expression de la chémérine est principalement observée au niveau des adipocytes. Elle est liée à diverses maladies métaboliques et inflammatoires [313]. La chémérine pourrait également être impliquée dans le développement tumoral, et son expression a été associée à une augmentation du risque de cancer gastriques, de cancer colorectal, de cancers de l'œsophage, des poumons et du foie [314]. Dans les cancers gastriques, la chémérine a été reportée comme inductrice de l'invasion des cellules cancéreuses par activation de ERK 1/2 et induction de l'expression de VEGF, MMP-7 et IL-6 [315]. Dans le cancer des ovaires, la chémérine était responsable d'une augmentation de l'expression de PD-L1, ainsi que la prolifération et la migration des cellules cancéreuses [316]. Cependant, la chémérine avait plutôt un rôle anti-tumoral dans le carcinome hépatocellulaire en diminuant la formation de métastases *via* une diminution de la voie CMKLR1 (*chemerine chemokine-like receptor 1*)-PTEN-Akt [317], et dans l'invasion osseuse des cancers du sein en diminuant le ratio RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*)/Osteoprotégérine dans les ostéoblastes, et la sécrétion de métalloprotéases [318]. Après liaison de la chémérine, CCRL2 n'induit pas l'activation de voies de signalisation ou de recrutement de β-arrestine ; en revanche, CCRL2 immobilise la chémérine à la surface cellulaire pour augmenter sa biodisponibilité [319]. GPR1, quant à lui, induit le recrutement de β-arrestine après liaison du ligand chémérine, ce qui résulte en son internalisation et sa dégradation [320].

4.3.2.3. PITPNM3

Le récepteur PITPNM3 (*Membrane-associated Phosphatidylinositol Transfer Protein 3*) est un récepteur de chimiokines, mais il ne présente pas d'homologie avec les autres récepteurs de chimiokines couplés aux protéines G. Il est exprimé par les cellules endothéliales et les lymphocytes T [307]. Son ligand est CCL18, mais il n'est pas capable de l'internaliser ; en revanche, il augmente la migration cellulaire par chimiotaxie. Dans

un contexte tumoral, il a été montré que le couple CCL18/PITPNM3 est impliqué dans la migration, l'invasion et l'EMT dans les carcinomes hépatocellulaires *via* la voie de signalisation NFκB [321]. Dans le cancer du sein, le couple CCL18/PITPNM3 participe également à l'invasion et le développement métastatique grâce à la production de CCL18 par les TAMs [322], et à l'infiltration des cellules Tregs [323].

4.3.2.4. C5aR2

Le récepteur C5aR2 (*Complement C5a Receptor 2*) est exprimé par plusieurs cellules immunitaires : les cellules myéloïdes, les lymphocytes B et T, et les cellules NK [324]. C5aR2 ne possède pas de ligand chimiokinique ; son unique ligand est C5a, fragment soluble du système du complément avec C3a [324]. Le complément est compris dans le système immunitaire inné. Il prend part à l'homéostasie et à l'élimination de pathogènes [325]. Comme ses homologues ACKRs, C5aR2 n'induit pas de voies de signalisation dépendantes des protéines G, mais se couple à la β-arrestine et internalise son ligand pour mener à sa dégradation [326]. Dans les gliomes et les cancers du sein, une expression élevée de C5aR2 a été associée avec une hausse de la progression tumorale et une diminution de la survie des patients [327, 328].

Pour note, la partie suivante développera uniquement le rôle que jouent les ACKRs originaux dans la progression du cancer et ne fera pas état des ACKRs additionnels.

4.4. La fonction des ACKRs dans le développement tumoral

L'expression des ACKRs ne se limite pas aux cellules saines : en effet, il a été montré que les ACKRs sont également exprimés par les cellules tumorales dans différents types de cancer, tels que les cancers du sein [329], du pancréas [330] et du cerveau [331, 332]. Bien que nécessitant plus d'approfondissement, de nombreuses études récentes démontrent l'implication des ACKRs dans le développement des cancers. Dans cette

partie, nous allons décrire l'implication de ces récepteurs dans différents processus de la progression tumorale.

4.4.1. L'impact des ACKRs au niveau de la prolifération des cellules cancéreuses

Pour le cancer de la prostate, l'inhibition de ACKR1 résultait en une augmentation de CXCL2 et CXCL8, favorisant ainsi la croissance tumorale [333]. Plus récemment, une étude a montré qu'une expression accrue du récepteur était corrélée à un meilleur pronostic et inhibait la progression tumorale chez des patients atteints de sarcome en régulant le TME [334].

ACKR2 a été étudié dans le syndrome de Kaposi, où il lui a été découvert un rôle plutôt anti-tumoral grâce à la dégradation des chimiokines CCL2, 3 et 5. De plus, l'expression de ACKR2 était diminuée chez les patients présentant les formes les plus agressives du syndrome de Kaposi, *via* la voie KRas/BRaf/MEK/MAPK [335]. Concernant les cancers du sein, l'expression de ACKR2 était corrélée avec une diminution de l'agressivité des tumeurs et une augmentation du taux de survie. Dans cette étude, l'expression de ACKR2 était inversement corrélée à l'agressivité des différents types de cellules cancéreuses mammaires utilisées. En outre, la surexpression de ACKR2 diminuait la prolifération et l'invasion des lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-435 *in vitro*, et la croissance tumorale, la formation de métastases, l'angiogenèse et l'infiltration de TAMS *in vivo.* Ces résultats étaient associés à une diminution de CCL2 et CCL5, qui entraînait une baisse de la densité vasculaire et de l'infiltrations des TAMs [336]. Dans le cancer du poumon, la surexpression de ACKR2 était liée à une inhibition de la prolifération *in vitro* et une diminution de la tumorigenèse *in vivo*. Dans cette étude, la surexpression de ACKR2 était également associée à une diminution de CCL2, CCL4 et CCL5, mais le lien entre l'expression de ACKR2, le réseau chimiokinique et la prolifération ou la croissance tumorale n'a pas été établi [337].

Chez des patients présentant un mélanome, l'expression de ACKR3 a positivement été corrélée avec une survie diminuée des patients. De plus, dans des modèles cellulaires et murins, ACKR3 favorisait le développement tumoral par activation de la voie Src kinase [338]. Dans les cancers de la prostate, ACKR3 favorisait la croissance tumorale par induction de la voie MAPK/ERK. ACKR3 était également surexprimé chez les patients résistants à un antagoniste des récepteurs aux androgènes, Enzalutamide [339]. Dans ce contexte, la liaison directe du récepteur aux androgènes sur ACKR3 a été démontrée, révélant que le récepteur avait un rôle direct dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses de la prostate [340]. Dans les cancers du sein, ACKR3 induisait la phosphorylation de ERK 1/2 et inhibait l'apoptose [341]. Dans les cancers du poumon, l'expression de ACKR3 était induite par TGF-β1 et augmentait la croissance tumorale [342] ; de plus, l'utilisation d'agonistes contre ACKR3 inhibait la croissance tumorale [343]. Enfin, dans les cancers du rein, ACKR3 était responsable de la croissance tumorale en activant la voie de signalisation mTOR [344].

Enfin, la surexpression de ACKR4 dans des lignées cellulaires de cancer du sein et de carcinome hépatocellulaire était liée à une baisse de la prolifération, de la croissance tumorale ainsi que le développement de métastases [345, 346].

4.4.2. Le rôle des ACKRs dans l'invasion et la formation de métastases

Chaque ACKR a été montré comme impliqué de manière positive ou négative dans les processus d'invasion et de formation de métastases.

Concernant ACKR1, son interaction avec CD82 a inhibé la formation de métastases dans les poumons en bloquant l'extravasation des cellules malignes médiée par CXCL8 [347].

Dans les cancers du sein, ACKR2 a été identifié comme médiateur clé de l'EMT, et donc de la présence de métastases, *via* la sécrétion de CXCL14 par les fibroblastes. En effet, chez des modèles *in vitro* et *in vivo*, la voie CXCL14/ACKR2 était capable de stimuler l'EMT, l'invasion des cellules tumorales et la formation de métastases *via* la

phosphorylation de ERK [348]. Le même constat a été réalisé pour le cancer des poumons non à petites cellules, dans lequel l'expression de CXCL14 et de ACKR2 sont augmentées d'après les bases de données TCGA. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'en inhibant ACKR2, la migration des cellules tumorales induite par CXCL14 était également inhibée. De plus, les résultats ont démontré que la régulation de la phospholipase Cβ3 par CXCL14 était dépendante de ACKR2, ainsi que la régulation de c-Src et en conséquence, de NFκB, menant ainsi à l'induction de la migration des cellules malignes ainsi que l'EMT [349]. Dans une autre étude, l'inhibition de ACKR2 entraînait une hausse des récepteurs de chimiokines inflammatoires CCR1, CCR2 et CCR5. Cela conduisait à la libération de neutrophiles ayant une activité anti-métastatique par la moelle osseuse. En effet, l'inhibition de ACKR2 entraînait une protection par les neutrophiles contre la formation de métastases chez des souris transplantées orthotopiquement avec un carcinome mammaire 4T1 et injectées par voie intraveineuse avec des lignées cellulaires de mélanome B16-F10 [350].

A propos de ACKR3, ce récepteur a été corrélé au développement métastatique dans différents modèles de cancers du sein, de lymphomes *via* CXCL12 ainsi que de carcinomes hépatocellulaires *via* l'augmentation d'ostéopontine [351-353]. Dans un modèle de cancer ovarien, l'expression de ACKR3 était induite par les œstrogènes et a induit la migration, l'invasion et l'EMT *via* CXCL11 [354]. Dans un modèle de rhabdomyosarcome, l'expression de ACKR3 était diminuée par l'hypoxie, ce qui modifiait l'équilibre de la signalisation du CXCL12 par les récepteurs ACKR3 et CXCR4. Ainsi, le CXCL12 activait plus fortement le récepteur CXCR4, ce qui favorisait le chimiotactisme et augmentait le potentiel métastatique des cellules [355]. Dans un modèle de cancer mammaire, la surexpression de ACKR3 a favorisé la croissance et l'angiogenèse tumorales mais a diminué l'invasion ainsi que le processus métastatique médiés par CXCL12 [356].

Dans le cancer du côlon, la surexpression de ACKR4 entraînait une baisse des processus de migration et d'invasion par inhibition de CCR7, CCR9, CXCR4 et CXCR5 [357]. En revanche, des résultats opposés furent observés avec l'utilisation de cellules de cancer du sein, avec une hausse de l'EMT ainsi que de la présence de métastases [358].

En clinique, la diminution de l'expression de ACKR4 était associée à une survie diminuée chez des patients présentant un cancer du sein, un carcinome hépatocellulaire ou un cancer du côlon [345, 346, 357]. Enfin, la surexpression de ACKR4 a été montrée comme limitant la croissance tumorale et le processus métastatique en empêchant l'action de récepteurs de chimiokines conventionnels qui ont tendance à augmenter l'agressivité tumorale, tels que CCR7, CCR9 et CXCR5 [345, 346, 357].

4.4.3. Le rôle des ACKRs dans l'angiogenèse

La surexpression de ACKR1 dans des cellules de cancer du sein, de mélanome et de cancer du poumon a permis d'inhiber l'angiogenèse et le développement de métastases par diminution de CCL2, de MMP-9 et de MVD (*Microvessel Density*), et par augmentation de l'infiltration immunitaire au sein du TME [359-361]. De plus, dans un modèle de cancer de la prostaste, l'inhibition de ACKR1 induisait la sécrétion des chimiokines pro-angiogéniques CXCL2 et CXCL8, et une augmentation de la densité vasculaire [333].

Concernant ACKR3, il a été établi qu'il peut induire la phosphorylation de eIF4E (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E*) en activant la voie Src kinase, ce qui menait à une augmentation de la traduction de HIF-1α et une augmentation de la sécrétion de VEGF par les cellules de mélanome [338]. De plus, son expression par les progéniteurs endothéliaux et les cellules endothéliales tumorales a été liée à un rôle pro-angiogénique et à la migration cellulaire [362, 363].

4.4.4. La fonction des ACKRs au niveau du trafic immunitaire

ACKR2 régule le recrutement des cellules immunitaires en liant des chimiokines pro-inflammatoires [364]. Dans des mélanomes murins, l'implication de ACKR2 dans l'infiltration des cellules NK a été démontrée. En effet, l'inhibition de ACKR2 dans ces

modèles induisait l'expression du récepteur CCR2 et le recrutement de cellules NK exprimant CCL2 au sein des tumeurs [365].

Concernant ACKR4, il est capable de lier et dégrader les chimiokines CCL19 et CCL21, qui sont également des ligands du récepteur conventionnel CCR7 et qui sont sécrétées par les cellules dendritiques et les lymphocytes T [366]. En régulant CCL21, il a été démontré que ACKR4 régule l'infiltration des lymphocytes T CD8+ et des cellules dendritiques [367], et que l'inhibition de ACKR4 entraînait une hausse de la présence intra-tumorale de cellules T CD8+ et une diminution de la croissance tumorale [368].

Ainsi, malgré de nombreuses études récentes et l'émergence de l'importance de ces récepteurs, les rôles que jouent les ACKRs dans le développement tumoral ne sont pas tout à fait clairs. En effet, bien que leur implication ait été décrite dans de nombreux processus de la progression tumorale (**Figure 19**), leur rôle semble être dépendant du contexte, du type de cancer et du type de cellules exprimant les récepteurs. En revanche, il est clair que les ACKRs ont une fonction importante dans la prolifération, l'invasion, la formation de métastases, l'angiogenèse et la migration des cellules immunitaires, ce qui souligne l'importance de comprendre et d'élucider les mécanismes impliqués dans leur régulation, dans le contexte du cancer.

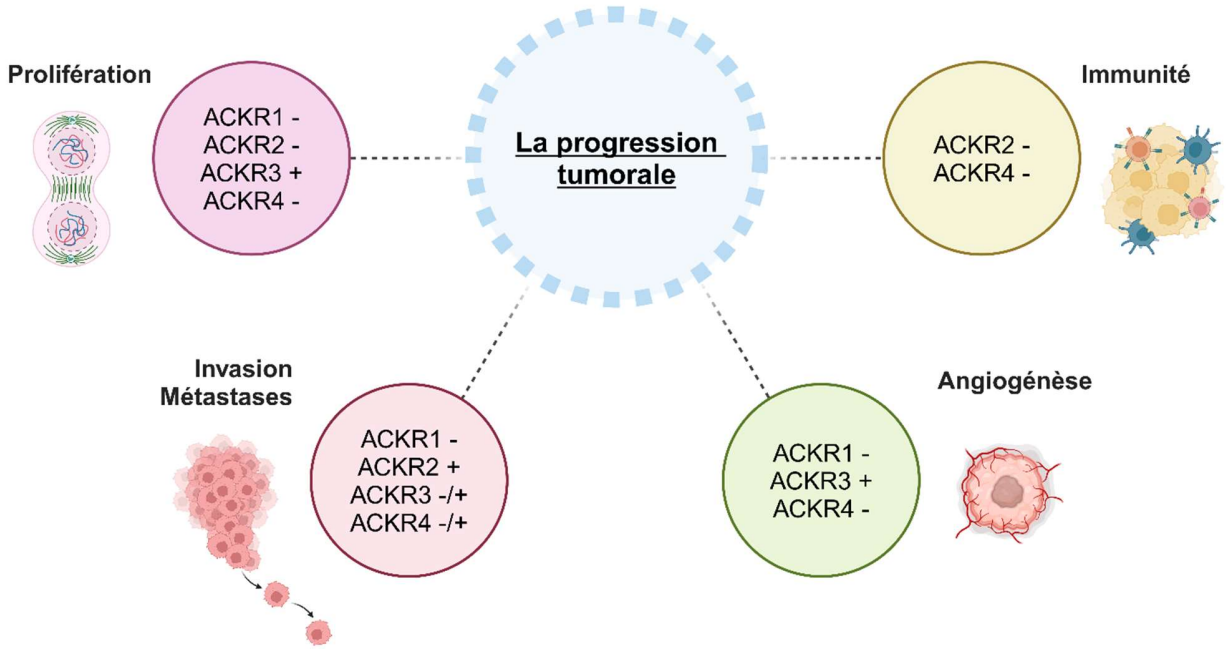


Figure 19 : Schéma résumant l'implication de chaque ACKR dans différentes étapes de la progression tumorale.

Dans un contexte tumoral, les ACKRs sont capables de promouvoir (+) ou d'inhiber (-) les processus de prolifération cellulaire, d'immunité anti-tumorale, d'angiogenèse tumorale, d'invasion et de formation de métastases. Figure réalisée grâce à BioRender.

4.5. La régulation des ACKRs par l'hypoxie

Quelques études ont établi une potentielle implication de l'hypoxie au niveau de la régulation de ACKR3 et ACKR4. En effet, le traitement de cellules souches mésenchymateuses avec des inducteurs chimiques de HIF-1α ou la culture dans des conditions hypoxiques légères (3% O_2), a induit l'expression de ACKR3 [369]. Parmi les inducteurs chimiques, nous retrouvons le desferrioxamine et le chlorure de cobalt. En outre, une hausse de l'expression de ACKR3 était observée au niveau des cellules endothéliales saines après stimulation par VEGF [370], ce qui indique une potentielle régulation de ACKR3 par HIF-1α. Concernant ACKR4, il a été identifié comme point de contrôle immunitaire dans un contexte d'hypertension artérielle pulmonaire. Son

expression était diminuée chez des souris placées dans une chambre à hypoxie à 8,5% d'O_2 pour créer un modèle murin d'hypertension artérielle pulmonaire, et a été associée à une hausse de CXCL12 et de l'infiltration immunitaire [371].

OBJECTIFS DE LA THESE

Depuis les années 2000 ont émergé de nouveaux récepteurs capables de lier et de dégrader un panel de chimiokines impliquées dans le trafic et la régulation du système immunitaire : les ACKRs. Ces récepteurs peuvent entrer en compétition avec des récepteurs de chimiokines classiques qui ont également une fonction dans l'homéostasie et la réponse immunitaire. A cause de leur impact sur le système immunitaire, les ACKRs sont également impliqués dans la progression du cancer, notamment au niveau de la prolifération des cellules tumorales, l'invasion et la formation de métastases, l'angiogenèse et l'infiltration immunitaire dans les tumeurs. Cependant, chaque ACKR semble avoir une fonction à la fois pro- et anti-tumorale ; il semblerait que ce rôle dépende du type de cancer, du type cellulaire exprimant le récepteur, ainsi que du contexte. Cela montre l'importance de comprendre la régulation de ces récepteurs dans le contexte tumoral, notamment du récepteur ACKR2, capable de dégrader les chimiokines pro-inflammatoires du TME.

De nombreuses études ont maintenant établi l'ampleur de l'implication de l'hypoxie dans les différents processus de progression tumorale, notamment due à sa fonction suppressive au niveau de la réponse immunitaire contre le cancer. L'impact de l'hypoxie sur le système immunitaire est fondamental, puisqu'il intervient dans plusieurs aspects de la réponse immunitaire contre le cancer : la création d'un TME immunosuppresseur, la surexpression de membres de couples de points de contrôles immunitaires inhibiteurs tels que PD-L1, VISTA et CD47, l'activation de l'autophagie résultant en l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules immunitaires, et l'expression de certains marqueurs du CMH de classe I pour tromper la reconnaissance du système immunitaire. De plus, l'influence de l'hypoxie tumorale sur l'expression de chimiokines et de récepteurs de chimiokines CC et CXC a été largement décrite. Plus récemment, il a été établi que l'hypoxie influence de plus l'expression de récepteurs de chimiokines atypiques, notamment GPR182 au niveau des cellules endothéliales, ACKR4 dans un contexte

d’hypertension artérielle, et ACKR3 sur les cellules souches mésenchymateuses et les cellules endothéliales de tumeurs.

Ainsi, notre hypothèse est que l’hypoxie serait en mesure de moduler l’expression de l’un des ACKRs capables de dégrader les chimiokines pro-inflammatoires du TME et d’impacter l’infiltration immunitaire anti-tumorale : ACKR2. La vocation principale de ce travail de thèse est ainsi de démontrer l’implication directe de l’hypoxie, notamment du facteur HIF-1α, dans la régulation du récepteur ACKR2 exprimé par les cellules tumorales.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées lors des expériences proviennent de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Dans le **Tableau 10** sont répertoriées les références de chaque lignée et leur provenance.

Tableau 10 : Liste des références et de la provenance des différentes lignées cellulaires cultivées lors des expériences.

Lignée	Référence	Fournisseur
4T1	CRL-2539 ™	ATCC
A-375	CRL-1619 ™	ATCC
B16-F10	CRL-6475 ™	ATCC
Caco-2	HTB-37 ™	ATCC
CT26.WT	CRL-2638 ™	ATCC
MDA-MB-231	HTB-26 ™	ATCC
MDA-MB-468	HTB-132 ™	ATCC
PY8119	CRL-3278 ™	ATCC
Renca	CRL-2947 ™	ATCC

Les cellules transformées possédant une délétion du gène *HIF-1α* ont été décrites précédemment [259]. Les différents clones sont abrégés dans le manuscrit comme mentionnés dans le **Tableau 11** :

Tableau 11 : Liste et abréviations des lignées transformées par CRISPR/Cas9 et utilisées dans ce travail de thèse.

Abréviation : CTRL = contrôle.

Lignée	CRISPR	Abréviation
B16-F10	CTRL	B16-F10 CTRL
	HIF-1α	B16-F10 HIFΔ
4T1	CTRL	4T1 CTRL
	HIF-1α	4T1 HIFΔ

1.2. Amorces pour RT-qPCR

Dans le **Tableau 12** sont décrites les amorces utilisées pour la technique de RT-qPCR, ainsi que leurs références ou séquences.

Tableau 12 : Liste des amorces utilisées lors des expériences, ainsi que leurs références/séquences et leur provenance.

Gène	Espèce	Référence	Séquence	Fournisseur
18S	Humain		5'-GAT-GGG-CGG-CGG-AAA-ATA-G-3' 5'-GCG-TGG-ATT-CTG-CAT-AAT-GGT-3'	Eurogentec
Ackr2	Souris	PPM03776A		Qiagen

ACKR2	Humain	PPH01335A		Qiagen
Ca9	Souris	PPM03340A		Qiagen
CA9	Humain	PPH01751A		Qiagen
Vegfa	Souris	PPM03041F		Qiagen
VEGFA	Humain	PPH00251C		Qiagen
Rpl13	Souris		5'-TGT-TGA-TGC-CTT-CAC-AGC-GT-3' 5'-GGA-GGG-GCA-GGT-TCT-GGT-AT-3'	Eurogentec

1.3. Particules lentivirales

Les particules lentivirales utilisées pour la surexpression de *Ackr2* ont été achetées chez le fournisseur VectorBuilder. Le vecteur utilisé est décrit dans le **Tableau 13** et la **Figure 20** (référence : VB900010-9864hpd) :

Tableau 13 : Descrption du vecteur lentiviral utilisé lors de la surexpression de Ackr2.

Référence du vecteur	VB90010-9864hpd
Nom du vecteur	pLV[Exp]-EGFP :T2A :Puro-EF1A>mAckr2[NM_001276719.1]
Taille du vecteur	10 511 bp
Taille du génome viral	7 036 bp
Type de vecteur	Vecteur lentiviral d'expression de gènes de mammifères
Promoteur inséré	EF1A
Cadre de lecture ouvert (ORF)	mAckr2[NM_001276719.1]
Marqueur inséré	EGFP :T2A :Puro

Nombre de copies du plasmide	Elevé
Résistance antibiotique	Ampicilline

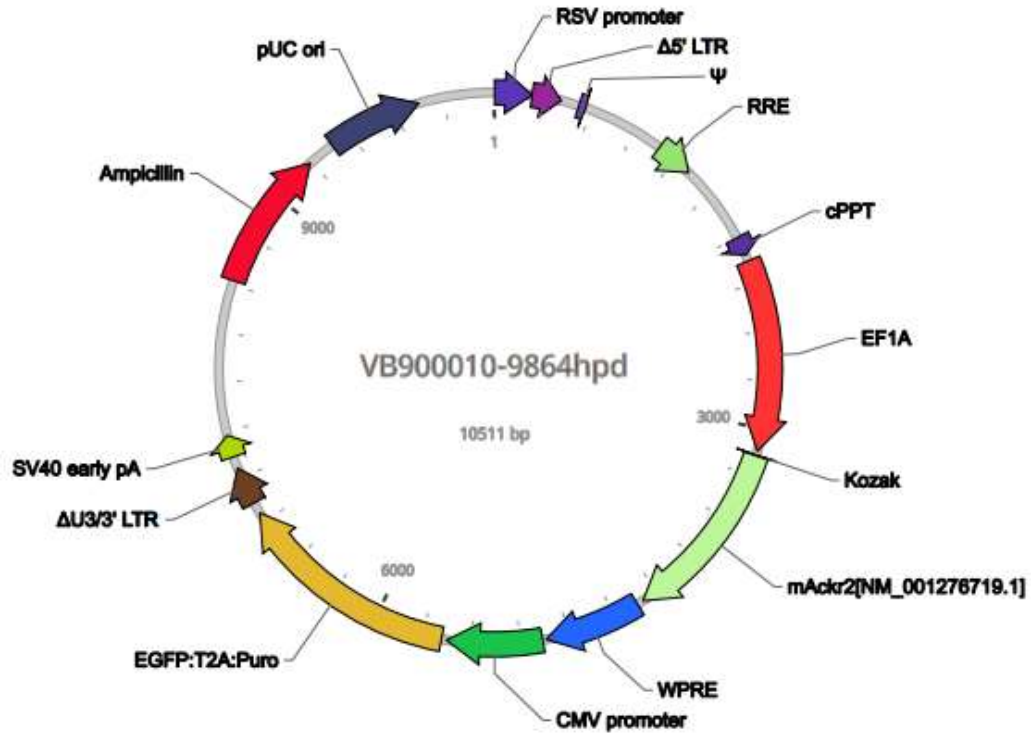


Figure 20 : Carte du vecteur lentiviral utilisé lors de la surexpression de Ackr2.

La carte est tirée du site web du fournisseur VectorBuilder (VB900010-9864hpd).

1.4. Cytométrie en flux

Cette technique a été exécutée grâce au cytomètre en flux CytoFLEX série Violet-Bleu-Rouge (V-B-R) (Beckman Coulter, modèle A00-1-1102) et du logiciel CytExpert (Beckman Coulter).

Les anticorps et réactifs utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux sont précisés dans le **Tableau 14** :

Tableau 14 : Liste des réactifs et anticorps utilisés lors de l'analyse par cytométrie en flux.

Marqueurs	Fluorochrome	Référence	Fournisseur	Dilution
Viabilité cellulaire				
LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit, for 633 or 635 nm excitation	APC-A750	L34976	Invitrogen™	1/1000
Anticorps utilisés pour le marquage de ACKR2				
CCRD6 Goat anti-Mouse	/	PA121612	Invitrogen™	1/100
CCRD6 Goat Polyclonal Antibody	/	PA121614	Invitrogen™	1/100
Donkey Anti-Goat IgG H&L	Alexa Fluor® 488	ab150129	Abcam	1/500
Goat IgG (H+L) APC-conjugated Antibody	APC	F0108	R&D Systems	1/500

2. Méthodes

2.1. Culture des lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans un incubateur saturé en vapeur d'eau, avec 5% de CO_2 et une température de 37°C.

Les lignées B16-F10, A-375 et MDA-MB-468 ont été maintenues dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, référence : 11965092, Gibco™) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF - *Fetal Bovine Serum*, référence : 26140079, Gibco™) and 1% de Pénicilline-Streptomycine (10 000 U/ml, référence : 15140122, Gibco™).

Les lignées 4T1, CT26 et Caco-2 ont été maintenues dans du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, référence : 61870036, Gibco™) avec la même concentration de SVF et de Pénicilline-Streptomycine.

2.2. Analyse de la croissance cellulaire par CellTiter-Glo®

Pour s'assurer que la transformation des cellules B16-F10 n'ait pas d'impact sur la croissance cellulaire, les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ surexprimant ou non ACKR2 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à fond blanc, à raison de 20 000 cellules par puits. Après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO_2, 100 µl de Cell-Titer Glo® (*CellTiter-Glo® 2.0 Luminescent Cell Viability Assay*, référence : G9241, Promega) par puits ont été ajoutés. La plaque a ensuite été placée sur un agitateur rotatif pendant 2 minutes pour induire la lyse des cellules, puis laissée 10 minutes à température ambiante. La luminescence de chaque puits a ensuite été enregistrée et le taux de croissance a été déterminé de la manière suivante :

$$\text{Taux de croissance} = \frac{\text{Luminescence à 48h}}{\text{Luminescence à 24h}} \text{ ou } \frac{\text{Luminescence à 72h}}{\text{Luminescence à 48h}}$$

2.3. Induction de l'hypoxie

Les cellules en condition d'hypoxie ont été placées 24 heures après ensemencement dans un incubateur Whitley H35 hypoxystation (Don Whitley Scientific), à une température de 37°C, une humidité relative de 80%, 5% de CO_2 et 1% ou 0,1% d'O_2 pendant 24 ou 48 heures. L'induction de conditions hypoxiques a été vérifiée pour chaque expérience grâce à l'analyse de l'expression de gènes cibles de HIF-1α, *CA9* et *VEGFA*, par RT-qPCR.

2.4. Induction de stress nutritionnel

Les cellules CT26 ont été ensemencées dans des T25 à raison de 200 000 cellules par flasque. Après 24 heures, le milieu a été retiré et les flasques ont été rincées avec de la solution saline (*PBS, pH 7.4*, référence : 10010023, Gibco™), avant d'ajouter 5 mL de solution saline équilibrée de Hanks (*Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS), référence : 14025092, Gibco™) ou 5 mL de milieu complet RPMI pour les conditions contrôles. Après 24h d'incubation, une partie des cellules fut récupérée pour réaliser une analyse par cytométrie en flux. L'autre partie fut récupérée pour réaliser une RT-qPCR.

2.5. Transfection de petits ARNs interférants (*siRNA*)

Pour diminuer l'expression de HIF-2α, quatre différents petits ARNs interférents (*siRNA*) ciblant HIF-2α (*FlexiTube GeneSolution GS13819 for Epas1*, référence : GS13819, Qiagen) furent transfectés en utilisant de la Lipofectamine RNAiMax (*Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent*, référence : 13778075, Invitrogen™). Pour chaque condition, les cellules CT26 ont également été transfectées avec un *siRNA* contrôle (*AllStars Negative Control siRNA*, référence : SI03650318, Qiagen).

Les cellules ont préalablement été ensemencées dans des T25 à raison de 200 000 cellules par flasque et transfectées après 24 heures d'incubation. Pour la transfection, 30 µL de Lipofectamine furent mélangés à 1 mL de milieu Opti-MEM (*Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium*, référence : 31985070, Gibco™). Dans un autre tube, 7.5 µL de *siRNA* à 50 µM ont été ajoutés à 1 mL d'Opti-MEM. Ensuite, les deux tubes contenant la Lipofectamine et le *siRNA* ont été délicatement mixés et incubés pendant 10 minutes à température ambiante. Dans le même temps, le milieu de culture fût aspiré et les flasques furent lavées au PBS. Après ces 10 minutes d'incubation, le mélange a été ajouté aux flasques (2 mL par flasque) et les flasques ont été maintenues à 37°C et 5% de CO_2 dans un incubateur. Au bout de 4 à 6 heures, 3 mL de milieu complet par flasque ont été ajoutés. Après 48 heures, les cellules ont été analysées par RT-qPCR et cytométrie en flux. Les résultats finaux considèrent le *siRNA* induisant le plus d'inhibition de l'expression de HIF-2α.

2.6. Transduction de particules lentivirales

Les particules lentivirales ont été manipulées avec un niveau de biosecurité de niveau 2+ (BSL2+). Le jour avant transduction, les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ ont été ensemencées dans des T25 à raison de 300 000 cellules par flasque dans du DMEM sans SVF et sans antibiotiques, et gardées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO_2. Le jour de la transduction, les particules lentivirales ont été réchauffées sur glace et diluées dans du milieu DMEM sans sérum et sans antibiotiques pour obtenir une multiplicité d'infection (MOI – *Multiplicity of infection*) de 10. Les cellules ont par la suite été incubées dans le mix contenant les particules lentivirales pendant 12 heures à 37°C et 5% de CO_2. Après 12 heures, le milieu contenant les particules lentivirales a été remplacé par du milieu DMEM avec 10% de SVF. Une fois les flasques confluentes (environ 4 jours après ensemencement), les cellules ont été sélectionnées grâce à un traitement par Puromycine Dihydrochloride (référence : A1113803, Gibco™) à une concentration de 2 µg/mL. Après sélection, les cellules ont été maintenues à 1 µg/mL de Puromycine. L'efficacité de transduction et le maintien du phénotype ont été suivis par un microscope EVOS M5000

(Invitrogen™) grâce à l'observation de l'expression de la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*) incluse dans la construction du lecteur lentiviral. La confirmation de la surexpression de ACKR2 a été vérifiée par cytométrie en flux et RT-qPCR.

2.7. RT-qPCR

L'ARN total a été extrait des cellules à l'aide du kit *NucleoSpin™ RNA Plus* (Macherey-Nagel™, référence : 15300205), puis la réaction de transcription inverse pour synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) a été effectuée pour 5000 ng d'ARN à l'aide du kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific™, référence : K1672) selon le programme suivant (**Figure 21**), pour 30 µL de réaction :

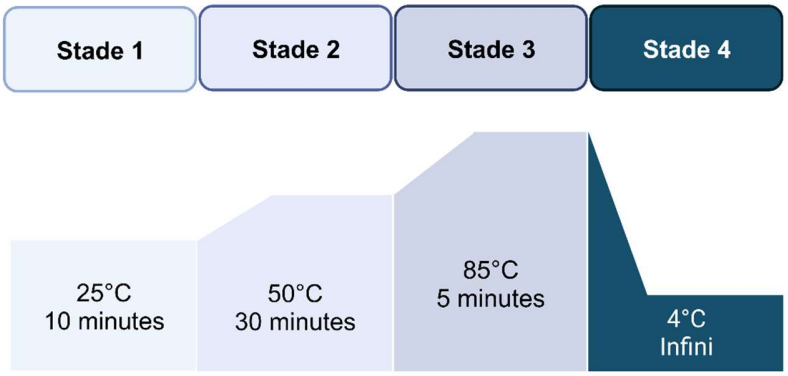


Figure 21 : Paramètres utilisés pour la réaction de transcription inverse pour la technique de RT-qPCR.

La figure a été créée grâce au logiciel BioRender.

Une fois l'ADNc synthétisé, une dilution de facteur 10 a été effectuée dans de l'eau dépourvue de RNAse (*RNAse-free water)* et le mix a été pipeté en triplicats dans des plaques 96 puits (*MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate*, référence : 4346907, Applied Biosystems™) à raison de 5 µL par puits. Pour chaque puits, un mix de 0,5 µL

d'amorces à 2,5 µM et de 4,5 µL de *SYBR Green* (*Takyon™ Low ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP*, référence : UF-LSMT-B0701, Eurogentec) a été ajouté avant d'effectuer la réaction de qPCR selon le programme suivant (**Figure 22**) :

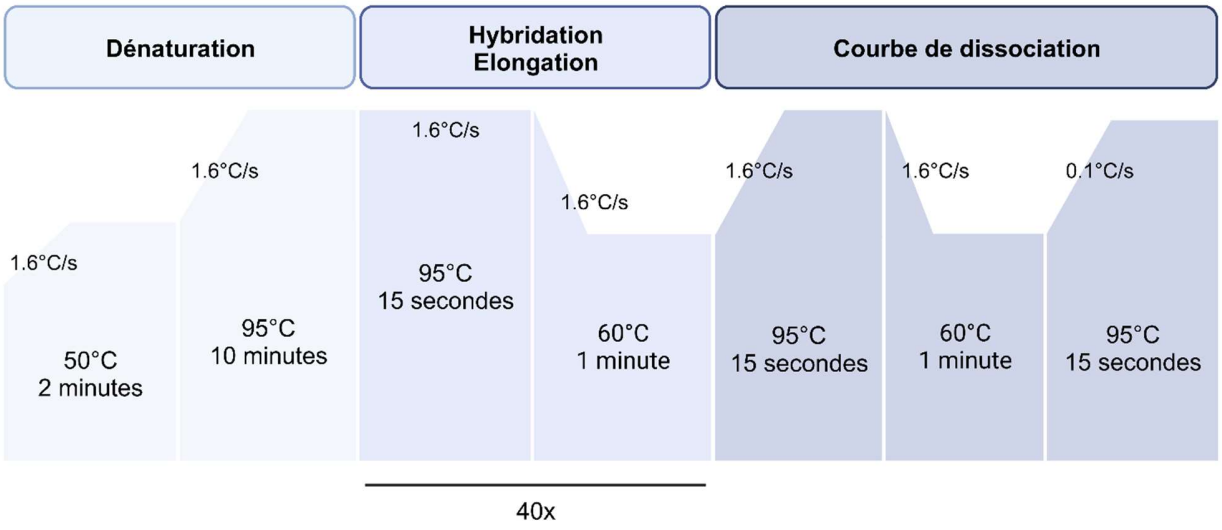


Figure 22 : Programme utilisé pour la réaction de qPCR après transcription inverse.

La figure a été créée grâce au logiciel BioRender.

Les analyses des résultats de RT-qPCR furent exécutées grâce au logiciel tableur Excel 2016 (Microsoft).

2.8. Détection des protéines par Western Blot

Les flasques contenant les cellules préalablement ensemencées ont été rincées avec du PBS avant d'ajouter le tampon de lyse (*RIPA Lysis Buffer, 10X* – référence : 20-188, Merck Millipore) additionné d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases 1x (*Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)*, référence : 78444, Thermo Scientific™). Les échantillons collectés furent vortexés puis centrifugés, à puissance

maximale pendant 10 minutes et à 4°C. De nouveaux tubes ont été mis sur glace avec le surnageant récolté des échantillons centrifugés.

Pour doser les protéines, 1 µL de chaque échantillon a été ajouté à 1 mL de bleu de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, référence : 5000006, Bio-Rad) dans des cuvettes de dosage. Après 5 à 30 minutes, la densité optique à 595 nm a été mesurée.

Le volume nécessaire pour obtenir 25 µg de protéines (pour les cellules B16-F10) ou 40 ug de protéines (pour les cellules 4T1) a été calculé. Ce volume a été mélangé avec de l'eau et du tampon de Laemmli 4X constitué de Tris HCl 1M, de Glycérol 87%, de SDS 10%, de Bleu de Bromophénol 1%, de β-mercaptoéthanol et d'eau, pour atteindre un volume final de 20 µL. Le tout a ensuite été mis à bouillir pendant 5 minutes, à une température de 95°C.

Le tout a ensuite été déposé dans les puits d'un gel SDS-PAGE 8 ou 10%, à côté d'un marqueur de poids moléculaire (*Prestained protein marker*, référence : PL00001, Proteintech). Le gel a été mis à migrer dans du tampon de migration constitué d'H_2O, de tampon de transfert 10x et de SDS 10% pendant environ une heure à 140 V.

Après migration, le gel a été démonté et placé dans un bac avec les membranes de nitrocellulose (*Amersham™ Protran® Premium Western blotting membranes, nitrocellulose*, référence : GE10600004, Merck), dans du tampon de transfert constitué de tampon de transfert 10x, d'éthanol et d'H_2O. Après montage en sandwich avec des éponges et du papier Whatman, le transfert a été réalisé pendant 1 heure et 20 minutes à 110 V.

Par la suite, la membrane a été incubée dans du lait 5% dilué dans du TBS-T pendant 30 minutes, avant d'ajouter l'anticorps primaire. L'anticorps a été dilué dans du lait 5%, et la membrane a été incubée pendant une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Après incubation, la membrane a été lavée 3 fois pendant 10 minutes au TBS-T, avant d'être incubée à nouveau pendant une heure avec l'anticorps secondaire.

Les anticorps qui ont été utilisés pour cette technique sont répertoriés dans le **Tableau 15** :

Tableau 15 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection de protéines par Western Blot.

Anticorps	Référence	Fournisseur	Dilution
HIF-1α (D2U3T) Rabbit mAb	14179	CellSignaling	1/1000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	7074	CellSignaling	1/10 000
Anti-β-Actin−Peroxidase antibody, Mouse monoclonal	A3854	Sigma-Aldrich-Merck	1/1000
Anti-p62/ SQSTM1 (C-terminus) guinea pig polyclonal	GP62-C	Progen	1/1000
LC3B Antibody	2775	CellSignaling	1/1000
Peroxidase AffiniPure™ Goat Anti-Guinea Pig IgG	106-035-003	Jackson	1/10 000

Pour la révélation, trois lavages ont été effectués pendant 10 minutes dans du TBS-T avant de déposer le substrat chimioluminescent (*Western Lightning Ultra, Chemiluminescent Substrate*, référence : NEL113001EA, PerkinElmer). La membrane a été révélée soit par caméra (ImageQuantLAS4000, GE Gealthcare Life Sciences), soit à l'aide de films autoradiographiques (*Amersham Hyperfilm MP*, référence : 28906843, Cytiva).

2.9. Mesure de la concentration en cytokines par ELISA

Les ELISA ont été effectués grâce aux kits *DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2* (référence : DY008B) et *Mouse CCL5/RANTES DuoSet ELISA* (référence : DY478) en suivant le protocole fourni par le fournisseur, R&D Systems. La densité optique a été lue à l'aide d'un lecteur de plaque CLARIOstar Plus (BMG Labtech). L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel tableur Excel 2016 (Microsoft).

2.10. Évaluation de la concentration en cytokines/chimiokines par *Cytokine array*

Le *cytokine array* a été réalisé à l'aide du *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array* (référence : ARY028, R&D Systems) en suivant le protocole du fournisseur. Le volume d'échantillon utilisé était de 500 µL par membrane. Les résultats obtenus sur films radiographiques (*Amersham Hyperfilm MP*, référence : 28906843, Cytiva) ont été analysés à l'aide du logiciel ImageJ (National Institute of Health, NIH) en mesurant la densité (*integrated density*) de chaque point.

2.11. Perméabilisation et fixation des cellules pour le marquage de ACKR2 et l'analyse de son expression par cytométrie en flux

Pour réaliser le marquage de ACKR2, les cellules préalablement ensemencées dans des T25 ont été lavées avec 1 mL de PBS. Après lavage, ces cellules ont été détachées grâce à l'ajout de 1 mL d'EDTA 10 mM dilué dans du PBS (*EDTA (0.1 mM), pH 8.0, RNase-free*, référence : AM9912, Invitrogen™) et une incubation de 5 à 10 minutes dans un incubateur à 37°C. Les cellules ont ensuite été récupérées en ajoutant 3 mL de PBS, puis centrifugées à 450g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot a été repris

dans 350 µl de MACS buffer (*autoMACS® Running Buffer – MACS® Separation Buffer*, référence : 130-091-221, Miltenyi Biotec), puis réparti dans une plaque 96 puits à raison de 100 µL par puits. La plaque a ensuite été centrifugée à 800g pendant 3 minutes à 4°C.

Le surnageant a été retiré de la plaque, puis le marqueur de viabilité cellulaire a été dilué à 1/1000 dans du MACS buffer, et ajouté dans les puits correspondants à raison de 100 µL par puits. Après 20 minutes à 4°C, 100 µL de MACS buffer ont été ajoutés et la plaque a été centrifugée à 800g pendant 3 minutes afin d'effectuer un lavage.

Pour fixer et perméabiliser les cellules, 100 µL de *Cyto-Fast Fix/Perm Buffer* (*Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer Set*, référence : 426803, BioLegend) ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite, deux lavages ont été effectués à raison de 100µL de *Cyto-Fast Perm Wash 1X* par puits et une centrifugation à 800g pendant 3 minutes.

L'anticorps primaire a été dilué dans du *Cyto-Fast Perm Wash 1X* à une dilution de 1/100 puis incubé pendant une heure à température ambiante, à raison de 100 µL par puits. Après cela, deux lavages ont été réalisés de la même façon que l'étape précédente, puis l'anticorps secondaire a été ajouté à une dilution de 1/500 dans du *Cyto-Fast Perm Wash 1X*, à raison de 100 µL par puits. Les anticorps utilisés pour le marquage de ACKR2 par la technique de cytométrie en flux sont indiqués dans le **Tableau 14**.

Deux lavages ont ensuite été réalisés de la même façon que précédemment, le premier avec du *Cyto-Fast Perm Wash 1X*, et le deuxième avec du MACS buffer. Pour acquérir les cellules au CytoFlex, celles-ci ont été reprises dans 150 µL de MACS par condition.

2.12. Marquage des tumeurs par immunohistochimie

Les marquages de CA9, CCL5 et ACKR2 ont été réalisés par l'entreprise HistoWiz (New-York, USA) sur des tumeurs provenant d'une expérience *in vivo* précédemment réalisée et décrite ici [259].

2.13. Immunoprécipitation de chromatine-qPCR (ChIP-qPCR)

2.13.1. Ensemencement, traitement et cross-linking

Les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ ont été ensemencées à raison de $1.5x10^6$ cellules par T175. Après 24 heures, les flasques ont été placées en hypoxie pour 48 heures. Les cellules ont ensuite été fixées à l'aide de 2 mL de 11% de formaldéhyde (*cross-linking*) dilué dans du tampon de fixation et ajoutés dans le milieu de culture, pendant 10 minutes. La réaction a été arrêtée avec 2,2 mL de glycine. Les flasques ont ensuite été rincées avec 20 mL de PBS et les cellules furent récoltées dans 25 mL de tampon de lyse iL1b, puis incubées pendant 20 minutes à 4°C sur un portoir rotatif avant d'être centrifugées à 500g pendant 5 minutes. Le culot fut ensuite resuspendu dans 15 mL de tampon iL2 et incubé pendant 10 minutes à 4°C, puis de nouveau centrifugé à 500g pendant 5 minutes. Enfin, le culot a été repris dans 1,67 mL de shearing buffer iS1b avec 8,4 µL de 200x protease inhibitor cocktail. Après 10 minutes sur glace, le tout a été transféré dans des microtubes (*microTUBE-130 AFA Fiber Screw-Cap*, référence : 520216, Covaris) afin de procéder à la sonication. Tous les réactifs mentionnés sans références sont fournis dans le kit utilisé pour la ChIP-qPCR (*iDeal ChIP-qPCR Kit* - référence : C01010180, Diagenode).

2.13.2. Sonication

L'optimisation de la sonication a été réalisée à l'aide du kit *Chromatin EasyShear Kit - Low SDS* (référence : C01020013, Diagenode) et du *M220 Focused-ultrasonicator* (référence : 500295, Covaris). Différentes variations de la puissance, du duty factor et du nombre de cycles ont été testées, ainsi que différents temps de sonication (2.5, 5, 10, 15, 20 minutes) jusqu'à obtenir des fragments de chromatine de taille optimale et de manière reproductible. Les paramètres optimaux optimisés sont mentionnés dans le **Tableau 16** :

Tableau 16 : Paramètres optimaux du M220 Focused-ultrasonicator utilisés pour obtenir des fragments de chromatine entre 200 et 700 paires de bases.

Taille des fragments	200 – 700 paires de bases (pb)
Puissance de pointe	75 Watt
Duty factor	5%
Nombre de cycles	200
Température	7°C (minimum 4°C – maximum 7°C)
Temps de sonication	15 minutes

2.13.3. Analyse de la taille des fragments de chromatine

La taille des fragments de chromatine a été évaluée avant chaque immunoprécipitation afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Pour ce faire, 50 µL de chromatine obtenus après sonication ont été incubés pendant 1 heure à 37°C avec 2 µL de *RNase cocktail* (*RNase Cocktail™ Enzyme Mix*, référence : AM2286, Invitrogen™) dilués dans 150 µL d'*AFA grade water* (*M220 AFA-grade Water*, référence : 520101, Covaris). Ensuite, le *cross-linking* a été défait à l'aide de 50 µL d'*Elution buffer* iE1 et 4 µL d'*Elution buffer* iE2, fournis dans le kit. Le tout a été incubé pendant minimum 4 heures à 65°C.

La purification de l'ADN a été réalisée grâce à la méthode d'extraction au phénol-chloroforme. L'ADN a été analysé sur un gel d'agarose à 1,5% qui a migré pendant 30 minutes à 100 V. La taille des fragments de chromatine a été estimée grâce à un marqueur de taille (*SmartLadder SF - 100 to 1000 bp*, référence : MW-1800-04, Eurogentec).

2.13.4. Immunoprécipitation magnétique

Afin de réaliser l'immunoprécipitation de chromatine, 30 µL de billes magnétiques par réaction ont été transférés dans un tube de 1.5 mL et ont été lavés 3 fois à l'aide d'1 mL de 1X ChIP buffer iC1b fourni dans le kit. A chaque lavage, les billes ont été resuspendues dans le tampon puis incubées pendant 5 minutes à 4°C sur un portoir rotatif, et enfin capturées grâce à un portoir magnétique. Après les lavages, les billes ont été resuspendues dans leur volume initial de buffer iC1b. Le mix suivant a été réalisé pour chaque réaction :

- 30 µL de billes magnétiques
- 6 µL de *Bovine Serum Albumin* (BSA)
- 1,8 µL de *protease inhibitor cocktail* (200x)
- 20 µL de *buffer* iC1b (5x)
- 1 µL d'anticorps contrôle (IgG) ou 7 µL d'anticorps anti-HIF1α
- 41,1 µL d'*AFA-grade water* pour les conditions contrôles ou 35,2 µL pour les autres conditions.

Le tout a ensuite été incubé pendant 4 heures à 4°C, sur un portoir rotatif. Après ce temps d'incubation, 250 µL de chromatine préalablement analysée ont été ajoutés au mix et incubés toute la nuit à 4°C. Dans le même temps, 2.5 µL de chromatine ont été mis de côté à 4°C pour servir d'INPUT.

Après incubation, les billes magnétiques ont été lavées successivement pendant 5 minutes à 4°C avec le *Wash Buffer* iW1, puis iW2, iW3 et iW4 fournis dans le kit. Ensuite, 100 µL de *DIB Buffer* complétés avec de la *Proteinase K* (1 µL pour 100 µL de buffer) ont été ajoutés pour chaque condition. Les tubes ont été incubés pendant 15 minutes à 55°c, puis 15 minutes à 100°C. Les billes magnétiques ont ensuite été récupérées grâce au portoir magnétique, et le surnageant a été transféré dans de nouveaux tubes et analysé par qPCR ou stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

2.13.5. Analyse des résultats par qPCR

Les amorces ont été créées grâce à *Primer-BLAST* (NCBI). Pour le contrôle positif, les amorces ont été créées spécifiquement pour amplifier les séquences HRE de gènes cibles de HIF-1α : *Ca9* et *Vefga*. Pour le contrôle négatif, les amorces ont été créées spécifiquement pour amplifier des séquences de *Ackr2* ne présentant pas de séquences HRE. Pour identifier la liaison de HIF-1α sur les motifs HRE du promoteur de *Ackr2*, les amorces ont été créées spécifiquement pour amplifier les séquences HRE présentes dans le promoteur de *Ackr2*. Au moins deux paires d'amorces ont été testées pour chaque gène. Pour chaque paire d'amorces, l'INPUT a été analysé à côté du contrôle négatif IgG et des échantillons immunoprécipités. Le **Tableau 17** ci-dessous présente les séquences des amorces utilisées pour les résultats finaux de la ChIP-qPCR :

Tableau 17 : Liste et séquences des amorces utilisées pour les résultats finaux de la ChIP-qPCR.

Nom donné à l'amorce	Séquence de l'amorce
mAckr2-HRE1-Forward	5'-TTCTTAAGGTCCCTCCTTCTCCTT-3'
mAckr2-HRE1-Reverse	5'-CACTGACCCAGACTATCACCTAAC-3'
mAckr2-HRE2-Forward	5'-CTGAAGAAGAGACAACAGCCACT-3'
mAckr2-HRE2-Reverse	5'-GACCTACCAGAGCCAGACTGTTT-3'
mAckr2-ctrlneg-Forward	5'-CAGAGTCCCTTAGCTAGTTCCCTC-3'
mAckr2-ctrlneg-Reverse	5'-TAGAACTCACCAAAGCTTCTTCCC-3'
mCar9-HRE-Forward	5'-GAGAGCTTCTCAGATAGGAGCCTT-3'
mCar9-HRE-Reverse	5'-CATTCGTCTCTCCAAACTCTGCAC-3'
mVegfa-HRE-Forward	5'-AGCCTCTGTTATGCCACGAT-3'
mVegfa-HRE-Reverse	5'-TGTGGGTTTCCTCACCTGAT-3'

Les valeurs de seuil de cycle (Ct) de la phase exponentielle de la qPCR ont été enregistrées pour chaque échantillon et chaque INPUT. Pour calculer la quantité relative d'ADN immunoprécipité comparé à l'ADN INPUT, la formule suivante a été appliquée :

$$\%recovery = 2^{((Ct_{INPUT} - 6.64) - Ct_{ECHANTILLON})} x100\%$$

Le chiffre 2 correspond à l'efficacité d'amplification, et 6.64 est un facteur compensatoire pour corriger la dilution de l'INPUT.

2.14. Séquençage de l'ARN

Le séquençage de l'ARN a été exécuté par l'entreprise *Eurofins Genomics* (Constance, Allemagne). L'ARN a été extrait comme mentionné dans la partie 2.7. La quantité et la qualité des ARN extraits des échantillons ont été mesurés grâce à un spectrophotomètre Nanodrop™ (ThermoScientific™) et les échantillons ont été préparés et envoyés selon les recommandations de l'entreprise. L'ARN ribosomal a été déplété et la profondeur du séquençage a été déterminée à 120 millions de reads (60 millions de paires) par échantillon. Le score de chaque gène a été calculé grâce à la formule :

$$Score_{gène} = LOG(p\text{-}value) x log2FoldChange$$

L'analyse des résultats a ensuite été réalisée grâce au logiciel GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*, Broad Institute). Le score de chaque gène calculé précédemment a été entré dans le logiciel et analysé en utilisant la base de données « m5.go.bp.v2023.Mm.symbols.gmt » et un nombre de permutations de 1000.

2.15. Analyse des tumeurs par NanoString

L'ARN de trois tumeurs de chaque groupe B16-F10 CTRL et HIFΔ a été envoyé à l'entreprise NanoString pour analyse à l'aide du panel *nCounter® PanCancer IO 360™ Panel*. Le panel d'expression génétique *PanCancer IO 360™* est un panel d'expression

génétique unique de 770 gènes qui combine des composants vitaux impliqués dans l'interaction complexe entre la tumeur, le TME et la réponse immunitaire, ce qui permet une caractérisation à multiples facettes de la biologie de la maladie et l'interrogation des mécanismes d'évasion immunitaire. Les données ont été analysées à l'aide du nSolver Analysis software.

2.16. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 10 de Dotmatics.

RESULTATS

1. L'hypoxie entraîne une surexpression de ACKR2 dans différents types de cellules cancéreuses murines et humaines

1.1. Les promoteurs humains et murins de *ACKR2* présentent des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE)

Afin de répondre à l'hypothèse de ce travail de thèse, les promoteurs humains et murins de *ACKR2* ont été analysés à l'aide de l'outil MCAST (*Motif Cluster Alignment and Research Tool*) et de l'outil JASPAR, à la recherche de motifs HRE sur lesquels le dimère HIF-1α/HIF-1β peut se fixer pour induire la transcription de gènes cibles.

L'outil MCAST a permis d'identifier sept motifs HRE dans le promoteur humain de *ACKR2* (NM_001296.5), quatre d'entre eux entre les nucléotides 2010 et 2049, et les trois autres entre les nucléotides 752 et 820 (**Figure 23A**) ; et 4 motifs HRE dans le promoteur murin (NM_001276719.1), entre les nucléotides 898 et 954 (**Figure 23B**). Les paramètres de l'analyse ont été déterminés de facon à ne présenter que les résultats ayant une *p-value* inférieure à 0,05 (*).

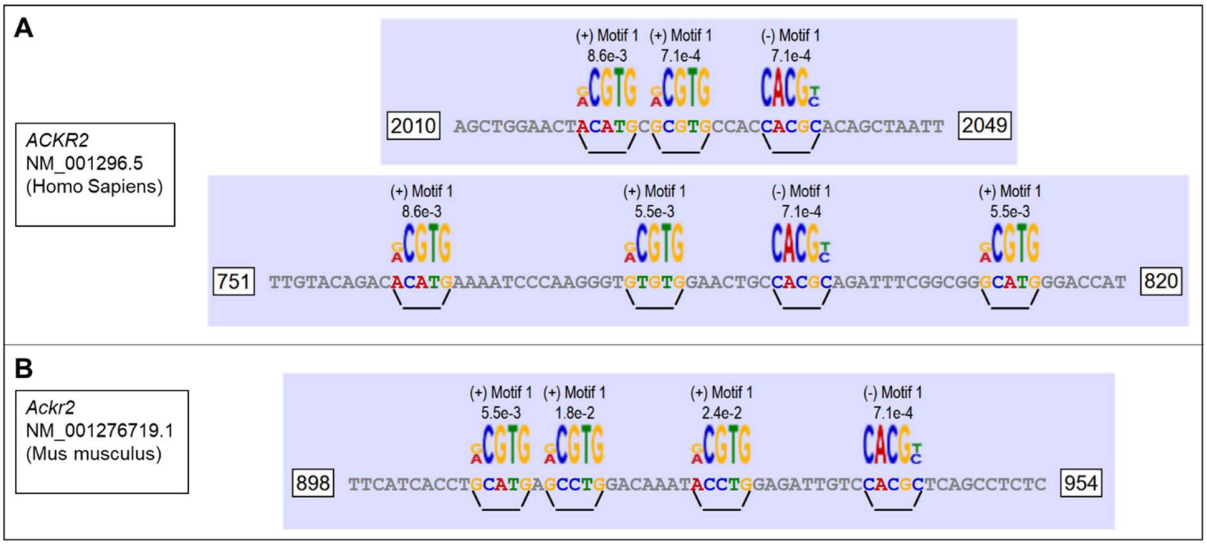


Figure 23 : Schéma représentant l'emplacement de motifs HRE au niveau du promoteur humain (A) et du promoteur murin (B) de ACKR2 déterminés par l'outil MCAST.

Les données ont été générées grâce à l'outil Motif Cluster Alignment and Search Tool (MCAST) décrit ici : Timothy Bailey and William Stafford Noble, "Searching for statistically significant regulatory modules", Bioinformatics (Proceedings of the European Conference on Computational Biology), 19(Suppl. 2):ii16-ii25, 2003 [372]. p-value < 0,05 (*).

L'outil JASPAR, quant à lui, a permis d'identifier six motifs HRE dans le promoteur humain de *ACKR2* dont seulement quatre avant le TSS (*Transcription Start Site*) (**Figure 24A**), et huit motifs HRE dans le promoteur murin dont seulement la moitié avant le TSS (**Figure 24B**). Les résultats présentés correspondent à une *p-value* très significative et inférieure à 0,001 (***).

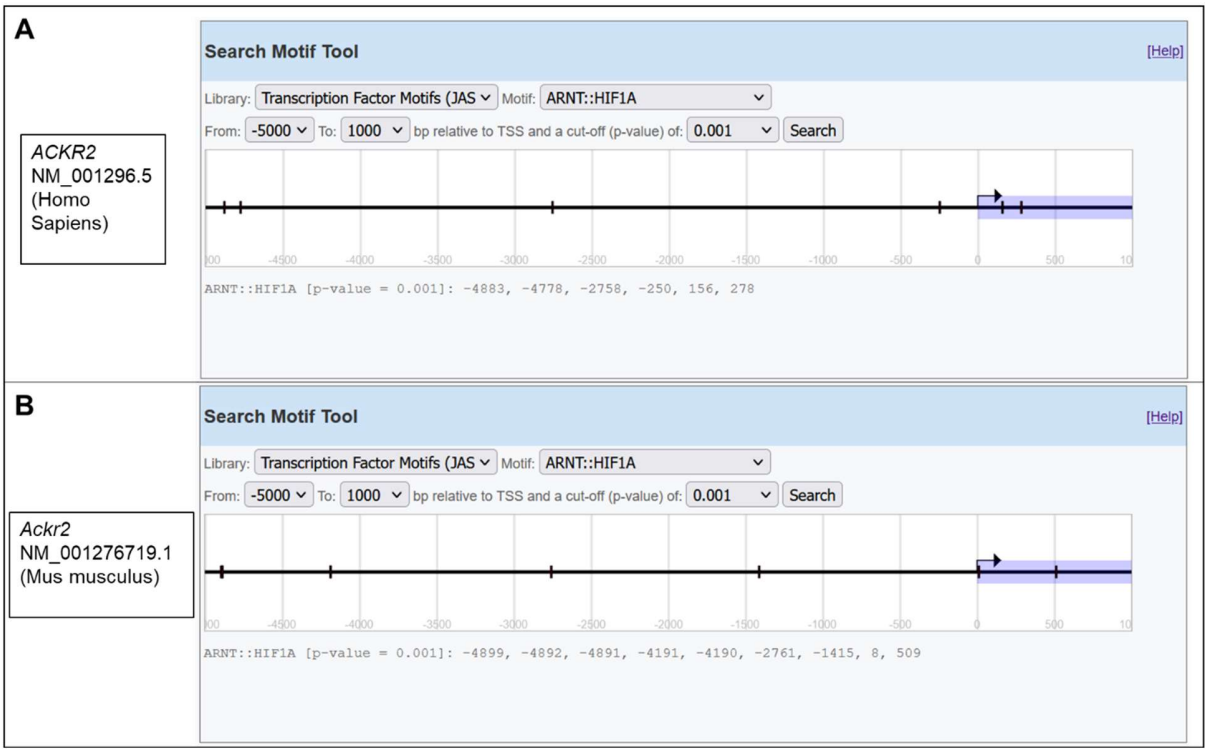


Figure 24 : Schéma représentant l'emplacement de motifs HRE au niveau du promoteur humain (A) et du promoteur murin (B) de ACKR2 déterminés par l'outil JASPAR.

Les données ont été générées grâce à l'outil JASPAR Search Motif Tool décrit ici : Sandelin A, Alkema W, Engstrom P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles Nucleic Acids Res. 2004 Jan 1;32(Database issue):D91-4 [373]. p-value < 0,001 (***).

Ces deux outils montrent que, chez l'Homme et chez la souris, le promoteur de *ACKR2* présente plusieurs motifs HRE, sur lesquels l'hétérodimère HIF-1α/HIF-1β pourrait se lier pour induire sa transcription. En d'autres termes, cela montre que ACKR2 est potentiellement régulé par les facteurs HIFs en hypoxie.

1.2. L'établissement des conditions expérimentales hypoxiques

Le niveau d'oxygène tumoral est très variable en fonction du type de tumeurs, allant jusqu'à des valeurs aussi basses que 0,01% d'O_2 en cas d'hypoxie sévère [374]. Le

niveau d'oxygène varie en moyenne de 0,3% pour les tumeurs de la prostate et du foie, à 2,5% pour les tumeurs rectales [246]. Cependant, la réponse cellulaire à l'hypoxie diffère en fonction du niveau d'oxygène. Par exemple, l'autophagie est induite par l'hypoxie à des niveaux d'oxygène entre 1% et moins de 0,02% ; cependant, l'hypoxie sévère (moins de 0,1 % d'O_2) induit l'activation d'ATM même en absence de dommages à l'ADN [375]. L'activation d'ATM été montrée à des niveaux d'oxygène inférieurs à 0,02 % d'O_2, ce qui n'était plus le cas à 0,5 % d'O_2 [376]. De plus, l'expression nucléaire de gamma-H2AX, qui indique un stress de réplication en cas d'hypoxie, est fortement induite en dessous de 0,1 % d'O_2, ce qui contribue à recruter des facteurs de réparation et à protéger les cellules contre les lésions de l'ADN [83, 376]. Notre avions déjà étudié notre principal modèle, les cellules B16-F10, dans des conditions hypoxiques à 0,1% d'O_2 [259].

L'adaptation cellulaire à l'hypoxie diffère également en fonction d'une exposition courte (*acute hypoxia* – moins de 72 heures) ou d'une exposition prolongée (*chronic hypoxia* – plus de 72 heures). En effet, en cas d'exposition courte, les niveaux de HIF-1α sont stabilisés et peuvent se déplacer vers le noyau où ils peuvent se lier à HIF-1β. Avec l'aide du cofacteur p300, l'hétérodimère induit la transcription de gènes en réponse à l'hypoxie aigüe. En cas d'exposition prolongée, les niveaux de HIF-1α se dissipent et les niveaux de HIF-2α se stabilisent. HIF-2α devient alors le facteur principal induisant la transcription des gènes [377]. De plus, même à des expositions courtes, la réponse cellulaire varie entre 24 heures et 48 heures d'exposition à des conditions hypoxiques. Par exemple, sur les cellules B16-F10, l'hypoxie engendre une baisse de l'expression du CMH-I, de manière plus importante à 48 heures qu'à 24 heures d'hypoxie [378].

Concernant ce projet, des essais préliminaires sur les cellules B16-F10 ont prouvé que l'expression de l'ARN messager de *Ackr2* était induite de la même manière à 1% qu'à 0,1% d'O_2, mais de manière significative seulement à 48 heures d'hypoxie (non significatif pour 24 heures) (**Figure 25A**). Le niveau de l'ARN messager de *Vegfa*, gène cible connu de HIF-1α, a été analysé en parallèle pour s'assurer que les conditions hypoxiques étaient bien induites après 24 et 48 heures d'hypoxie (**Figure 25A**). De plus, à 0,1% d'O_2, l'expression de la protéine ACKR2 était induite de manière plus importante à 48 heures d'hypoxie comparé à 24 heures d'exposition (bien que significative pour les deux

conditions) (**Figure 25B**), et associée à une baisse plus importante du niveau de CCL5, chimiokine régulée par ACKR2 [379, 380]. La diminution de CCL5 était significative après 48 heures, mais pas 24 heures d'exposition à des conditions hypoxiques (**Figure 25C**). En prenant en considération ces résultats et les éléments mentionnés ci-dessus, nous avons décidé de conduire toutes nos expériences *in vitro* avec des conditions hypoxiques fixées à 0,1% d'O_2, pendant 48 heures.

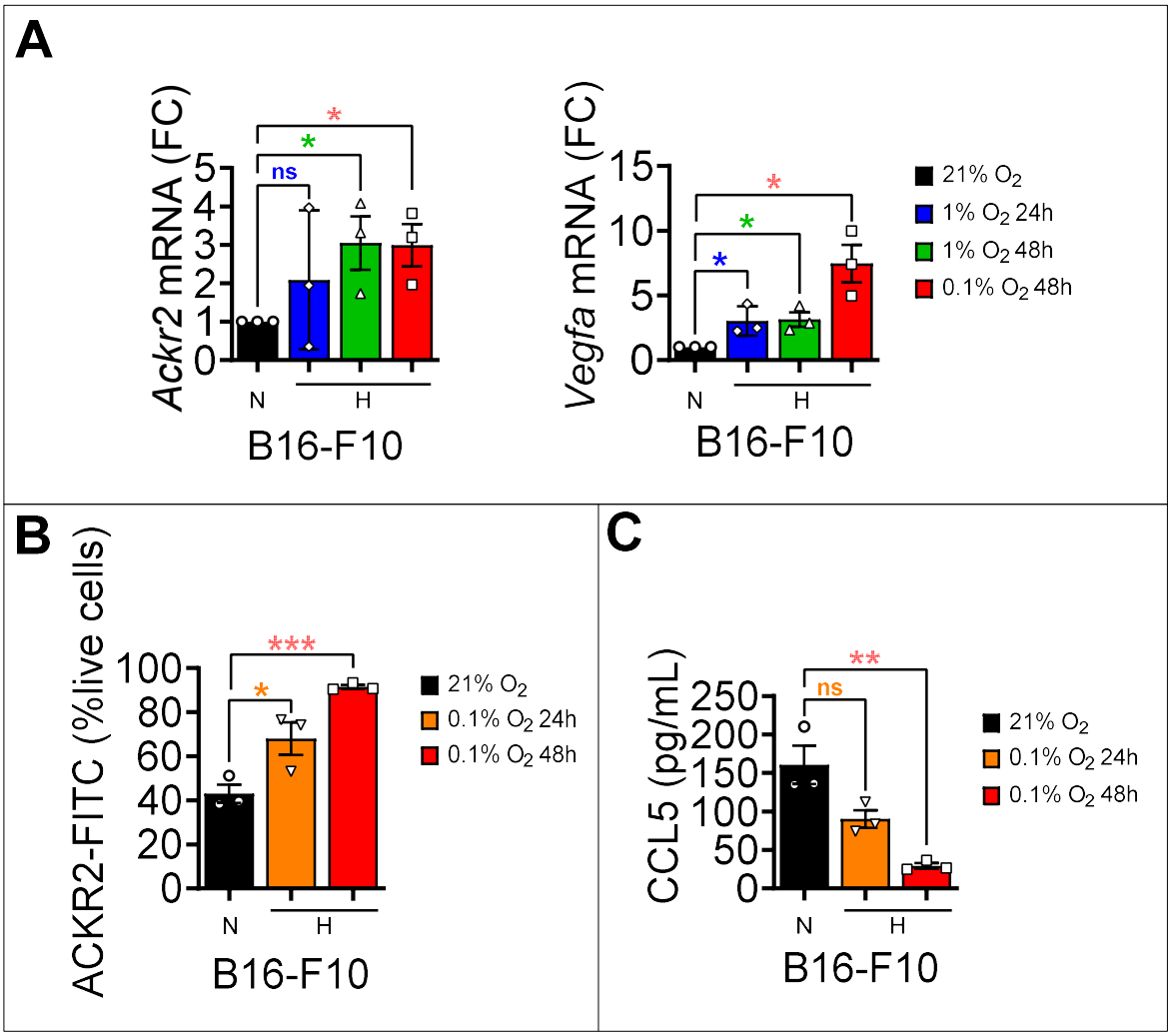


Figure 25 : L'expression de ACKR2 est augmentée en hypoxie à 1% et 0,1% d'oxygène pendant 48 heures, et associée à une diminution de CCL5 à 48 heures d'hypoxie pour les cellules B16-F10.

*(**A**) Analyse de l'ARN messager de Ackr2 et Vegfa par RT-qPCR sur les cellules B16-F10 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 1% ou 0,1% d'O_2) pendant 24 ou 48 heures. Les résultats sont rapportés en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif et * = p-value < 0,05 déterminés par un test t de Student non apparié. (**B**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux sur les cellules B16-F10 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 24 ou 48 heures. Les données sont rapportées en % de cellules positives vivantes. Elles représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif, * = p-value < 0,05 ; et *** = p-value < 0,001, déterminées par un test t de Student non apparié. (**C**) Analyse de la quantité de CCL5 par ELISA sécrétée par les cellules B16-F10 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 24 ou 48 heures. Les données sont présentées en pg/mL et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif, et ** = p-value < 0,01 déterminés par un test t de Student non apparié.*

1.3. ACKR2 est surexprimé par des cellules cancéreuses murines et humaines de mélanome en hypoxie

Ainsi, pour valider les résultats obtenus *in silico* par l'analyse MCAST et JASPAR et tester notre hypothèse *in vitro*, différentes lignées de cellules cancéreuses murines et humaines de mélanome ont été placées en hypoxie, à 0,1% d'O_2 pendant 48 heures. Le mélanome a été choisi car dans ce modèle, il a été montré que l'hypoxie favorise le développement du cancer en modulant l'expression des gènes interférant au niveau des processus de l'angiogenèse, le métabolisme, la prolifération cellulaire, les métastases et d'autres mécanismes biologiques, et donc conduisent finalement à sa progression [381, 382]. De plus, dans le mélanome, l'hypoxie conduit à la résistance aux traitements contre le cancer [383, 384], et déléter HIF-1α dans ce modèle a permis d'améliorer la réponse à l'immunothérapie [259].

Après 48 heures d'hypoxie, les cellules de mélanome murin B16-F10 et les cellules de mélanome humain A-375 ont été collectées. L'expression de la protéine de ACKR2 a

été analysée par cytométrie en flux, et l'expression de l'ARN messager par RT-qPCR. L'expression de *CA9* et de *VEGFA*, gènes cibles connus de HIF-1α, a été évaluée en parallèle pour vérifier et confirmer l'établissement de conditions hypoxiques lors des expériences.

Pour les cellules de mélanome murin B16-F10, nous pouvons observer une augmentation de plus de 50% de l'expression de ACKR2 en cytométrie en flux entre les conditions normoxiques (N) et les conditions hypoxiques (H) (**Figure 26A**). Cette augmentation est retrouvée au niveau de l'ARN messager de *Ackr2*, dont l'expression est multipliée par trois (**Figure 26B**).

Pour les cellules de mélanome humain A-375, nous pouvons observer une augmentation d'environ 30% de l'expression de ACKR2 en cytométrie en flux entre les conditions normoxiques (N) et les conditions hypoxiques (H) (**Figure 26C**). Cette augmentation est retrouvée au niveau de l'ARN messager de *ACKR2*, avec une expression quasiment multipliée par quatre (**Figure 26D**).

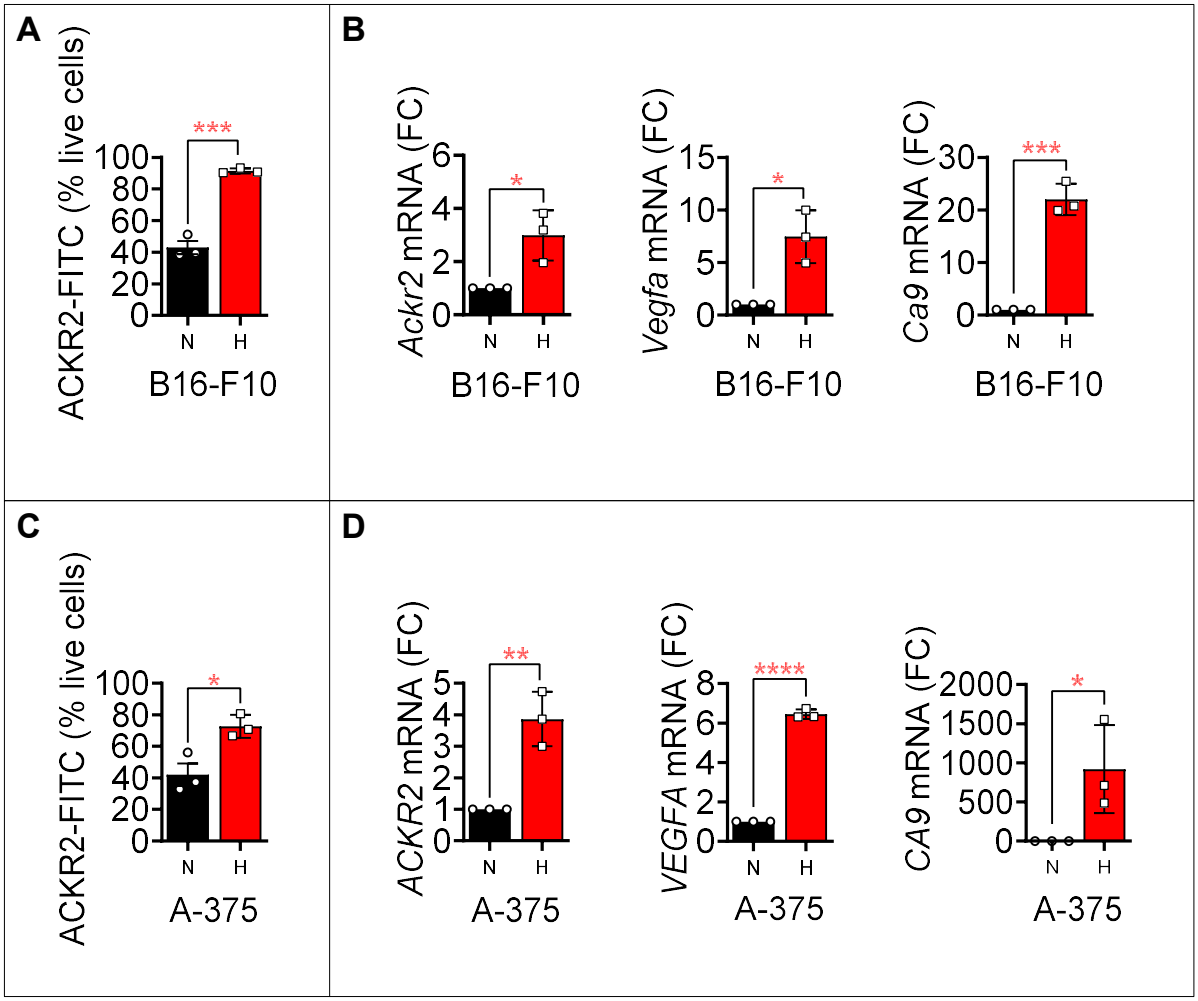


Figure 26 : L'expression de ACKR2 par les cellules de mélanome B16-F10 et A-375 est augmentée en hypoxie.

*(**A**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux sur les cellules B16-F10 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. Les données sont rapportées en % de cellules positives vivantes. Elles représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. *** = p-value < 0,001 déterminée par un test t de Student non apparié. (**B**) Analyse de l'expression de Ackr2, Vegfa ainsi que Ca9 par RT-qPCR sur les cellules B16-F10 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. L'expression des gènes Ca9 et Vegfa a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. * = p-value < 0,05 et *** = p-value < 0,001, déterminées par un test t de Student non apparié. (**C**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux sur les cellules A-375 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou*

*en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. Les données sont rapportées en % de cellules positives vivantes. Elles représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. * = p-value < 0,05 déterminée par un test t de Student non apparié. (**D**) Analyse de l'expression de ACKR2, VEGFA ainsi que CA9 par RT-qPCR sur les cellules A-375 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. L'expression des gènes CA9 et VEGFA a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. * = p-value < 0,05, ** = p-value < 0,01 et **** = p-value < 0,0001, déterminées par un test t de Student non apparié.*

1.4. ACKR2 est surexprimé par des cellules cancéreuses murines et humaines de cancer colorectal en hypoxie

L'expression de ACKR2 a également été évaluée dans des modèles cellulaires de cancer colorectal. Dans les cancers colorectal, l'hypoxie est corrélée à une mauvaise survie des patients et à l'infiltration de macrophages M2 [385]. Il a également été décrit que l'hypoxie est responsable d'une hausse de l'activité et de la malignité des cellules cancéreuses colorectales *via* l'axe PTEN/PI3K/Akt décrit précédemment [386] et l'axe IL-8/NFκB [387]. De plus, l'hypoxie induit une résistance aux médicaments dans le cancer colorectal par le biais de la boucle HIF-1α/miR-338-5p/IL-6 [388].

Ainsi, après 48 heures d'hypoxie à 0,1% d'O_2, les cellules de cancer colorectal murin CT26 et de cancer colorectal humain Caco-2 ont été collectées. L'expression de la protéine et de l'ARN messager de ACKR2 a été analysée par cytométrie en flux, et RT-qPCR respectivement, de la même manière que précédemment. L'expression de *CA9* et de *VEGFA* a été également évaluée en parallèle pour vérifier et confirmer l'établissement de conditions hypoxiques lors des expériences.

Pour les cellules de cancer colorectal murin CT26, nous observons également une augmentation de plus de 50% de l'expression de ACKR2 en cytométrie en flux entre les conditions normoxiques et les conditions hypoxiques (**Figure 27A**). Cette augmentation

est retrouvée au niveau de l'ARN messager de *Ackr2*, dont l'expression est multipliée par 10 (**Figure 27B**).

De la même façon, pour les cellules de cancer colorectal humain Caco-2, nous observons une augmentation d'environ 20% de l'expression de ACKR2 en cytométrie en flux entre les conditions normoxiques et les conditions hypoxiques (**Figure 27C**). Cette augmentation est retrouvée au niveau de l'ARN messager de *ACKR2*, avec une expression multipliée par sept (**Figure 27D**).

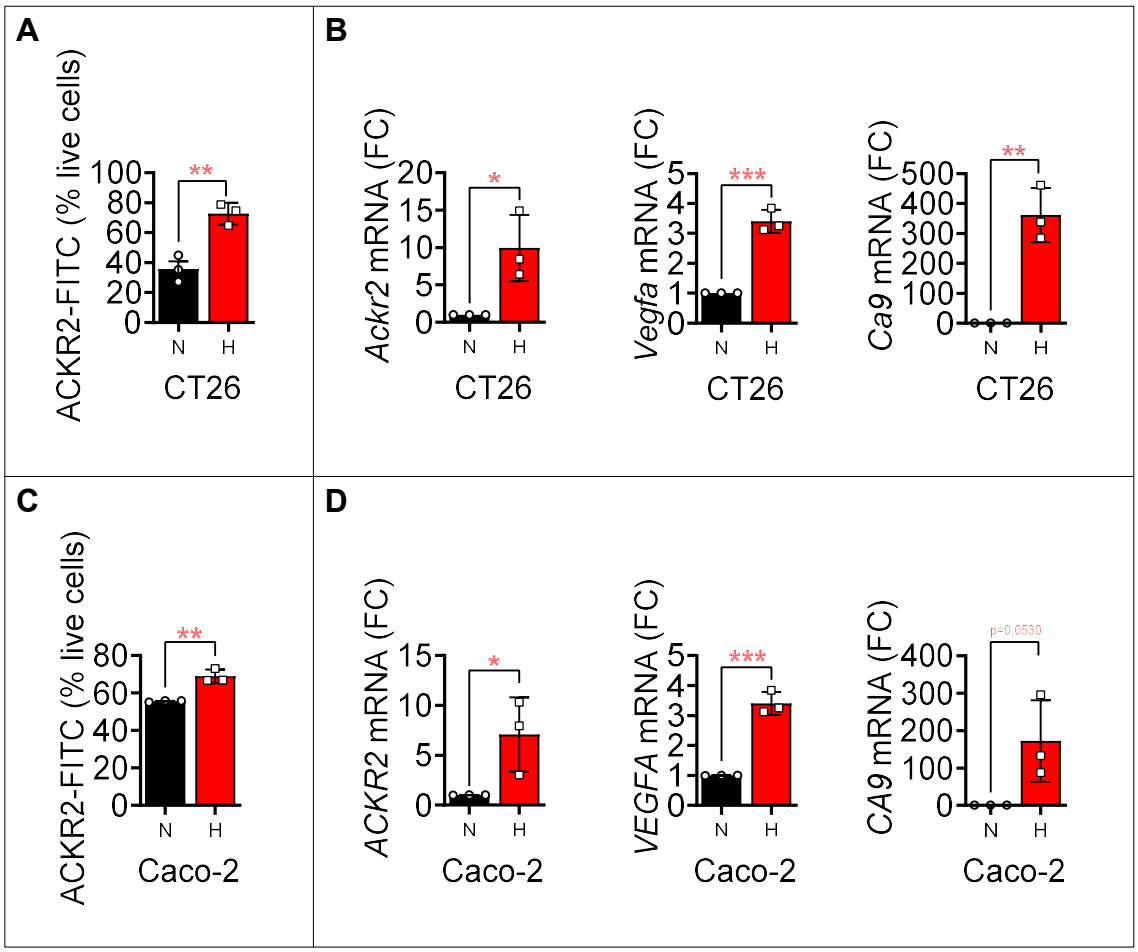


Figure 27 : L'expression de ACKR2 par les cellules de cancer colorectal CT26 et Caco-2 est augmentée en hypoxie.

*(**A**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux sur les cellules CT26 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. Les données sont rapportées en % de*

*cellules positives vivantes. Elles représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ** = p-value < 0,01 déterminée par un test t de Student non apparié. (**B**) Analyse de l'expression de Ackr2, Vegfa ainsi que Ca9 par RT-qPCR sur les cellules CT26 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. L'expression des gènes Ca9 et Vegfa a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. * = p-value < 0,05, ** = p-value < 0,001 et *** = p-value < 0,001, déterminées par un test t de Student non apparié. (**C**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux sur les cellules Caco-2 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. Les données sont rapportées en % de cellules positives vivantes. Elles représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ** = p-value < 0,01 déterminée par un test t de Student non apparié. (**D**) Analyse de l'expression de ACKR2, VEGFA ainsi que CA9 par RT-qPCR sur les cellules Caco-2 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. L'expression des gènes CA9 et VEGFA a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. * = p-value < 0,05, et *** = p-value < 0,001, déterminées par un test t de Student non apparié.*

1.5. ACKR2 est surexprimé par des cellules cancéreuses murines et humaines de cancer du sein triple négatif en hypoxie

Pour finir, l'expression de ACKR2 a également été évaluée dans des modèles cellulaires de cancer du sein triple négatif (TNBC – *Triple-Negative Breast Cancer*), les cellules murines 4T1 et les cellules humaines MDA-MB-468. Les tumeurs de TNBC sont très hypoxiques, et il a été démontré que HIF-1α régule les processus biologiques complexes du cancer du sein, par exemple la glycolyse, l'angiogenèse, l'invasion et la formation de métastases, le développement de cellules souches cancéreuses et l'échappement immunitaire, afin de promouvoir la survie et le développement du cancer du sein par l'activation de gènes cibles [389]. De plus, il a été montré que l'hypoxie inhibe l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et participe au dysfonctionnement du système immunitaire, et confère une résistance à l'immunothérapie anti-PD-1 dans le TNBC [177]. Dans ce type de cancers, l'hypoxie est également associée

à une résistance à la radiothérapie et la chimiothérapie par les mécanismes cités précédemment : la diminution de l'oxygène qui empêche la formation de ROS ou le fonctionnement des médicaments souvent dépendants de la présence d'oxygène, une vascularisation insuffisante qui entrave la pénétration des médicaments, l'acidité du TME due à l'hypoxie qui réduit l'absorption des médicaments anticancéreux, la présence de cellules de phénotype CSC, l'activation de voies immunosuppressives, la modulation de l'apoptose, l'induction de l'autophagie, l'instabilité génétique… [390].

Ainsi, de la même façon que pour les lignées précédentes, après 48 heures d'hypoxie à 0,1% d'O_2, l'expression de la protéine ACKR2 a été analysée par cytométrie en flux ; puis l'expression de l'ARN messager a été évaluée par RT-qPCR, sur des cellules de TNBC murines 4T1 et des cellules de TNBC humaines MDA-MB-468. L'expression de *CA9* et de *VEGFA* a encore une fois été évaluée en parallèle pour vérifier et confirmer l'établissement de conditions hypoxiques lors des expériences.

Pour les cellules de TNBC murin 4T1, nous pouvons observer une augmentation de l'expression de ACKR2 d'environ 15% en cytométrie en flux entre les conditions normoxiques et les conditions hypoxiques (**Figure 28A**). Cette augmentation est retrouvée au niveau de l'ARN messager de *Ackr2*, avec une expression multipliée par huit (**Figure 28B**).

Pour les cellules de TNBC humain MDA-MB-468, il est également observé une augmentation de l'expression de ACKR2 d'environ 20% en cytométrie en flux entre les conditions normoxiques et les conditions hypoxiques (**Figure 28C**). Cette augmentation est retrouvée au niveau de l'ARN messager de *ACKR2*, avec une expression multipliée par trois (**Figure 28D**).

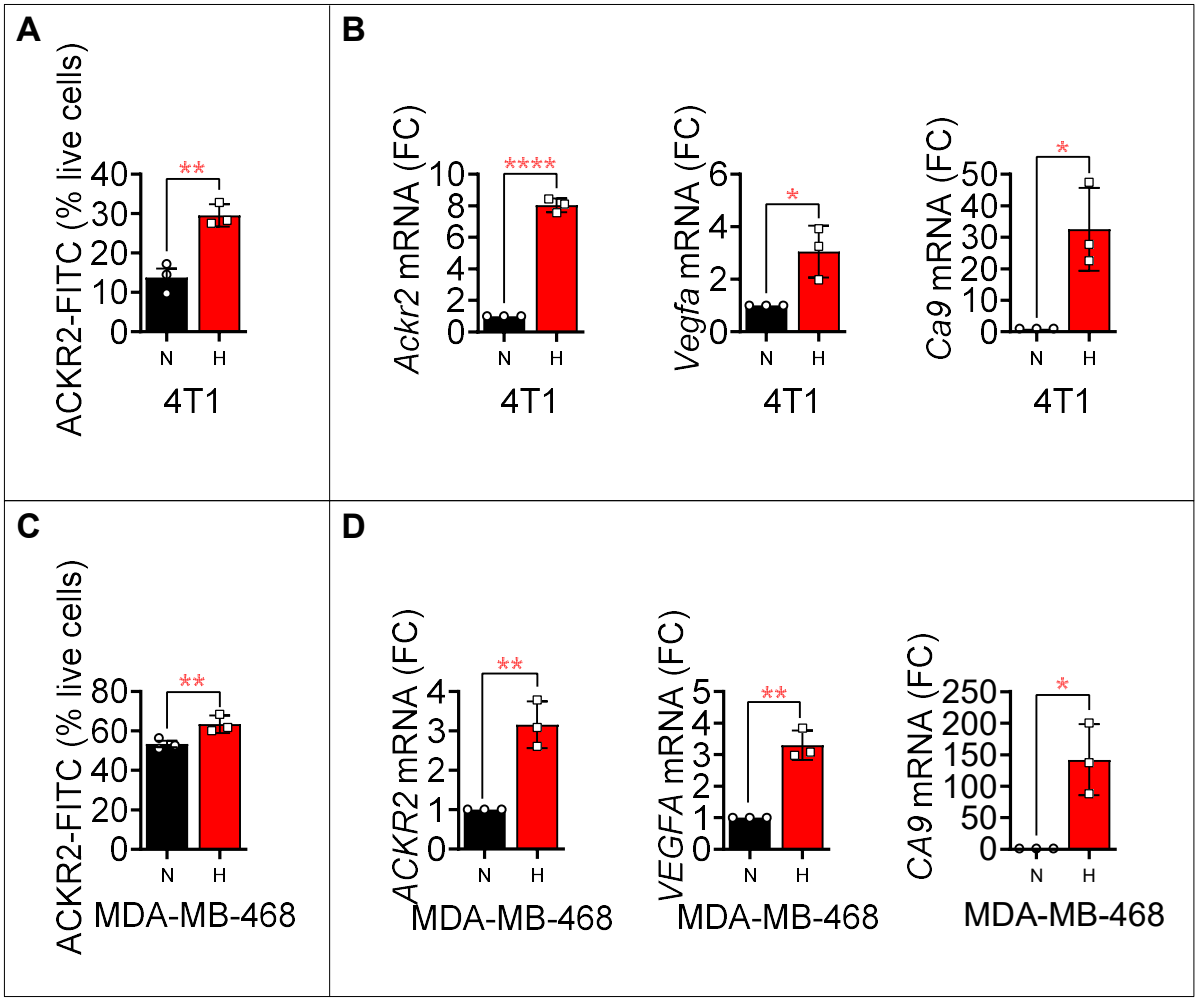


Figure 28 : L'expression de ACKR2 par les cellules de cancer du sein 4T1 et MDA-MB-468 est augmentée en hypoxie.

*(**A**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux sur les cellules 4T1 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. Les données sont rapportées en % de cellules positives vivantes. Elles représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ** = p-value < 0,01 déterminée par un test t de Student non apparié. (**B**) Analyse de l'expression de Ackr2, Vegfa ainsi que Ca9 par RT-qPCR sur les cellules 4T1 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. L'expression des gènes Ca9 et Vegfa a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. * = p-value < 0,05, et **** = p-value < 0,0001, déterminées par un test t de Student non apparié. (**C**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux sur les cellules MDA-MB-468 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H*

*– 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. Les données sont rapportées en % de cellules positives vivantes. Elles représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ** = p-value < 0,01 déterminée par un test t de Student non apparié. (**D**) Analyse de l'expression de ACKR2, VEGFA ainsi que CA9 par RT-qPCR sur les cellules MDA-MB-468 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. L'expression des gènes CA9 et VEGFA a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. * = p-value < 0,05, et ** = p-value < 0,01, déterminées par un test t de Student non apparié.*

Ces résultats permettent de valider la surexpression de ACKR2 dans des conditions hypoxiques, à la fois au niveau protéique et transcriptionnel pour différents types de modèles de cellules cancéreuses, à la fois murines et humaines : des cellules de mélanome, de cancer colorectal et de TNBC. Comme mentionné précédemment, dans ces types de cancers, l'hypoxie est associée à la progression du cancer et à la résistance aux traitements contre le cancer. Ces résultats montrent que non seulement ACKR2 est surexprimé en hypoxie, mais de plus, cette observation n'est pas limitée à un seul type de cancer, ni à une espèce.

1.6. L'augmentation de ACKR2 en hypoxie résulte en une baisse du niveau de CCL5

Pour évaluer l'aspect fonctionnel de l'augmentation de ACKR2 observée en hypoxie et étant donné son rôle de « *scavenger* » de chimiokines (incluant CCL5) [379, 380], nous avons évalué une relation potentielle entre l'expression de ACKR2 et le niveau de CCL5 dans le surnageant des cellules entre les conditions normoxiques et hypoxiques. Pour ce faire, le surnageant des cellules utilisées pour les expériences précédentes et cultivées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) a été récupéré, et la quantité de CCL5 a été mesurée par ELISA.

En hypoxie, nous observons une diminution drastique et significative de la quantité de CCL5 sécrétée par les cellules de mélanome B16-F10 (**Figure 29A**) et par les cellules de cancer colorectal CT26 (**Figure 29B**). Pour vérifier si la baisse de CCL5 observée était potentiellement liée à l'augmentation de ACKR2, un anticorps bloquant la partie N-terminale de ACKR2 servant à lier les chimiokines a été utilisé à concentration croissante sur les cellules CT26. Nous pouvons observer que plus la concentration d'anticorps bloquant augmente, plus la quantité de CCL5 augmente également en hypoxie jusqu'à atteindre une ré-augmentation significative à 30 µg/µL d'anticorps (*), et presque significative à 9 µg/µL d'anticorps (*p-value = 0,0756*) (**Figure 29C**), suggérant ainsi l'implication de ACKR2 dans la déplétion de CCL5 dans nos conditions hypoxiques.

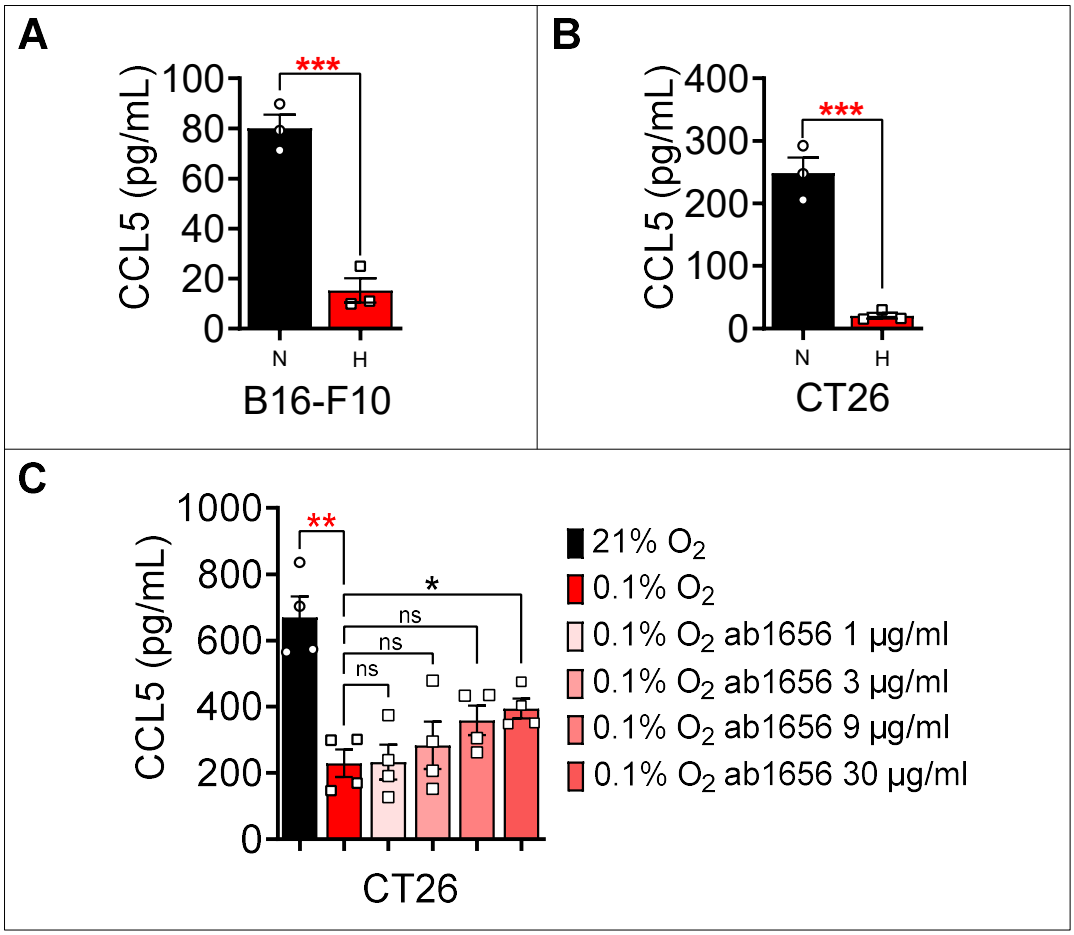


Figure 29 : La quantité de CCL5 sécrétée par les cellules B16-F10 et CT26 est diminuée en hypoxie.

*(**A**) Analyse de la quantité de CCL5 par ELISA sécrétée par les cellules B16-F10 et (**B**) CT26 cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% d'O_2) pendant 48 heures. (**C**) Analyse de la quantité de CCL5 par ELISA sécrétée par les cellules CT26 hypoxiques traitées avec un anticorps bloquant ACKR2 à concentration croissante (1, 3, 9 et 30 µg/mL). Les résultats sont rapportés en pg/mL et représentent la moyenne d'au moins trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif, * = p-value < 0,05, ** = p-value < 0,01 et *** = p-value < 0,001 déterminées par un test t de Student non apparié.*

2. La suppression de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α dans des cellules de TNBC et de mélanome hypoxiques entraîne une diminution de l'expression de ACKR2

2.1. Une diminution de l'expression de ACKR2 dépendante de l'hypoxie *in vitro* est observée dans les cellules 4T1 ainsi que B16-F10 HIFΔ

Pour évaluer l'implication du facteur de transcription HIF-1α dans la régulation de ACKR2 en hypoxie, celui-ci a préalablement été délété par CRISPR-Cas9 dans les cellules de TNBC murin 4T1 et de mélanome murin B16-F10 dans notre laboratoire. Les cellules présentant une délétion de HIF-1α ont été nommées HIFΔ. Pour confirmer la délétion, la protéine HIF-1α a été détectée par Western-Blot et l'expression de l'ARN messager de gènes cibles de HIF-1α, *Ca9* et *Vegfa*, a été mesurée par RT-qPCR en normoxie (N) et en hypoxie (H). Ensuite, l'expression de ACKR2 a été évaluée au niveau protéique par cytométrie en flux et au niveau de son ARN messager par RT-qPCR, et le niveau de CCL5 dans le surnageant des cellules a été mesuré par ELISA.

Pour les cellules 4T1, nous observons une augmentation de l'expression de HIF-1α en hypoxie pour les cellules CTRL ; cette expression n'est pas observée pour les cellules HIFΔ (**Figure 30A**). Concernant ACKR2, nous retrouvons une augmentation significative de la protéine en hypoxie pour les cellules CTRL comparé aux conditions normoxiques ; de même pour les cellules HIFΔ avec une légère augmentation de 1,96%

en hypoxie, mais nettement et significativement moins importante que celle observée pour les cellules CTRL (**Figure 30B**). Cette légère augmentation entre les cellules HIFΔ en normoxie et hypoxie pourrait être due à une régulation par un autre facteur induit par l'hypoxie, par exemple HIF-2α. En revanche, cette augmentation n'est pas observée au niveau de l'ARN messager de *Ackr2* dans ces conditions (**Figure 30C**), ce qui supposerait plutôt un mécanisme post-traductionnel (phosphorylation, glycosylation, acétylation, stimulation par liaison de ligands…).

Ainsi, l'ARN messager de *Ackr2* augmente en hypoxie dans les cellules CTRL, mais pas dans les cellules HIFΔ (**Figure 30C**). De plus, l'expression de *Vegfa* et *Ca9* n'est plus augmentée en hypoxie dans les cellules HIFΔ comparé aux cellules CTRL (**Figure 30C**), montrant l'efficacité de la délétion de HIF-1α et son impact sur son activité transcriptionnelle. Concernant CCL5, il n'y a pas de différence significative observée entre les conditions hypoxiques et normoxiques pour les cellules CTRL et les cellules HIFΔ ; cependant, la sécrétion de CCL5 semble plus importante par les cellules HIFΔ comparé aux cellules CTRL, bien que non significative à cause d'une variabilité trop importante (**Figure 30D**).

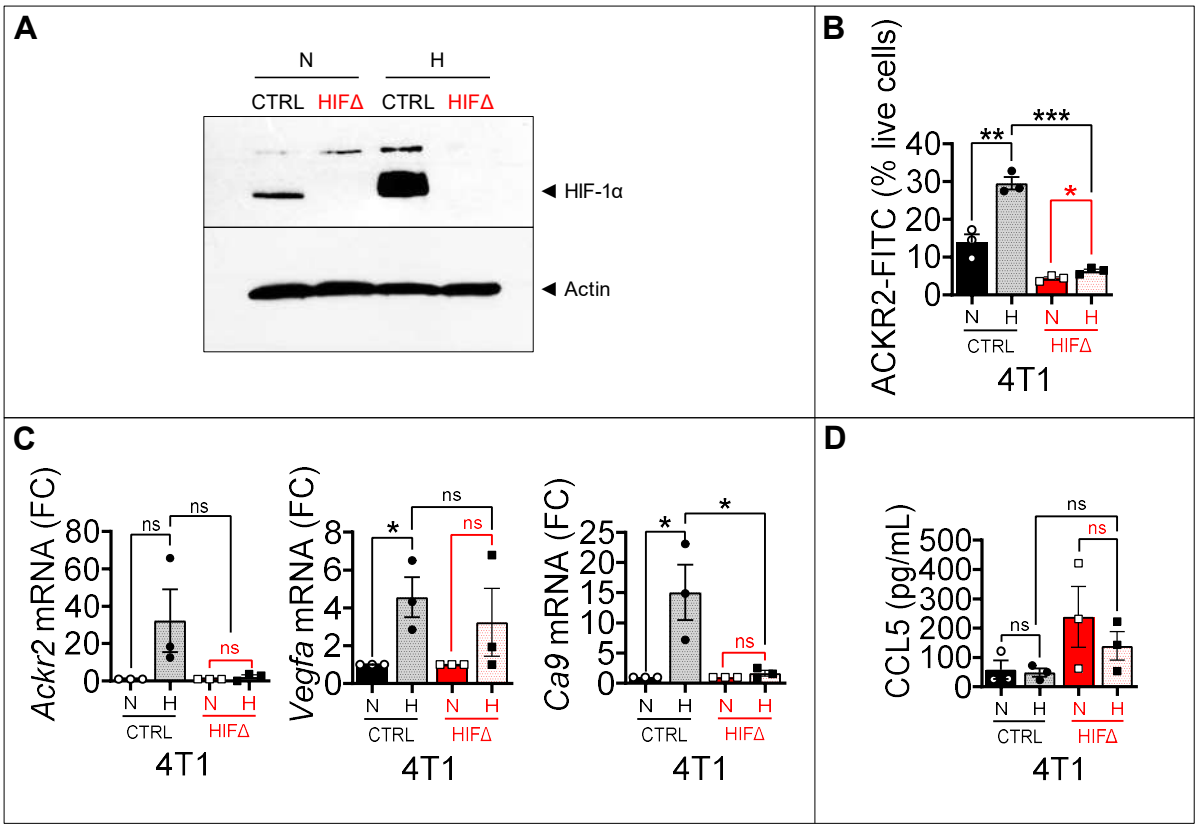


Figure 30 : L'expression de ACKR2 par les cellules 4T1 HIFΔ est diminuée en hypoxie.

*(**A**) Western-Blot de la protéine HIF-1α sur des cellules 4T1 CTRL et HIFΔ, cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% O_2) pendant 48 heures. L'actine a été utilisée comme contrôle. (**B**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie ainsi que (**C**) par RT-qPCR sur les cellules 4T1 cultivées en normoxie (N_2) ou en hypoxie (H). L'expression des gènes Ca9 et Vegfa a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en % de cellules positives vivantes ou en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif, * = p-value < 0,05, ** = p-value < 0,01 et *** = p-value < 0,001, déterminés par un test t de Student non apparié. (**D**) Analyse de la quantité de CCL5 sécrétée par les cellules 4T1 CTRL et HIFΔ cultivées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) par ELISA. Les résultats sont rapportés en pg/mL, et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif, déterminé par un test t de Student non apparié.*

Pour les cellules B16-F10, nous observons une augmentation de l'expression de HIF-1α en hypoxie pour les cellules CTRL, de même pour les cellules HIFΔ ; en revanche,

la protéine HIF-1α des cellules HIFΔ présente un plus petit poids moléculaire dû à la délétion (**Figure 31A**). Concernant ACKR2, nous retrouvons une augmentation significative de la protéine en hypoxie pour les cellules CTRL comparé aux conditions normoxiques ; de même pour les cellules HIFΔ avec une légère augmentation significative en hypoxie, mais nettement et significativement moins importante que celle observée pour les cellules CTRL (**Figure 31B**). De la même façon, l'ARN messager de *Ackr2* augmente en hypoxie dans les cellules CTRL, mais pas dans les cellules HIFΔ (**Figure 31C**). De plus, l'expression de *Vegfa* et *Ca9* n'est plus augmentée en hypoxie dans les cellules HIFΔ comparé aux cellules CTRL (**Figure 31C**), montrant que bien que la forme tronquée de HIF-1α soit toujours accumulée dans les cellules HIFΔ, elle n'induit plus la transcription de gènes cibles, ce qui correspond à nos précédentes observations [259]. Concernant CCL5, nous retrouvons une diminution significative dans les conditions hypoxiques comparé aux conditions normoxiques pour les cellules CTRL et les cellules HIFΔ ; cependant, le niveau de CCL5 semble plus important pour les cellules HIFΔ comparé aux cellules CTRL, bien que non significatif (**Figure 31D**).

Ensemble, ces résultats montrent que dans deux modèles cellulaires murins différents, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α engendre une baisse de l'expression de ACKR2 en hypoxie. Ces résultats renforcent l'hypothèse que HIF-1α pourrait être un régulateur de ACKR2 en hypoxie.

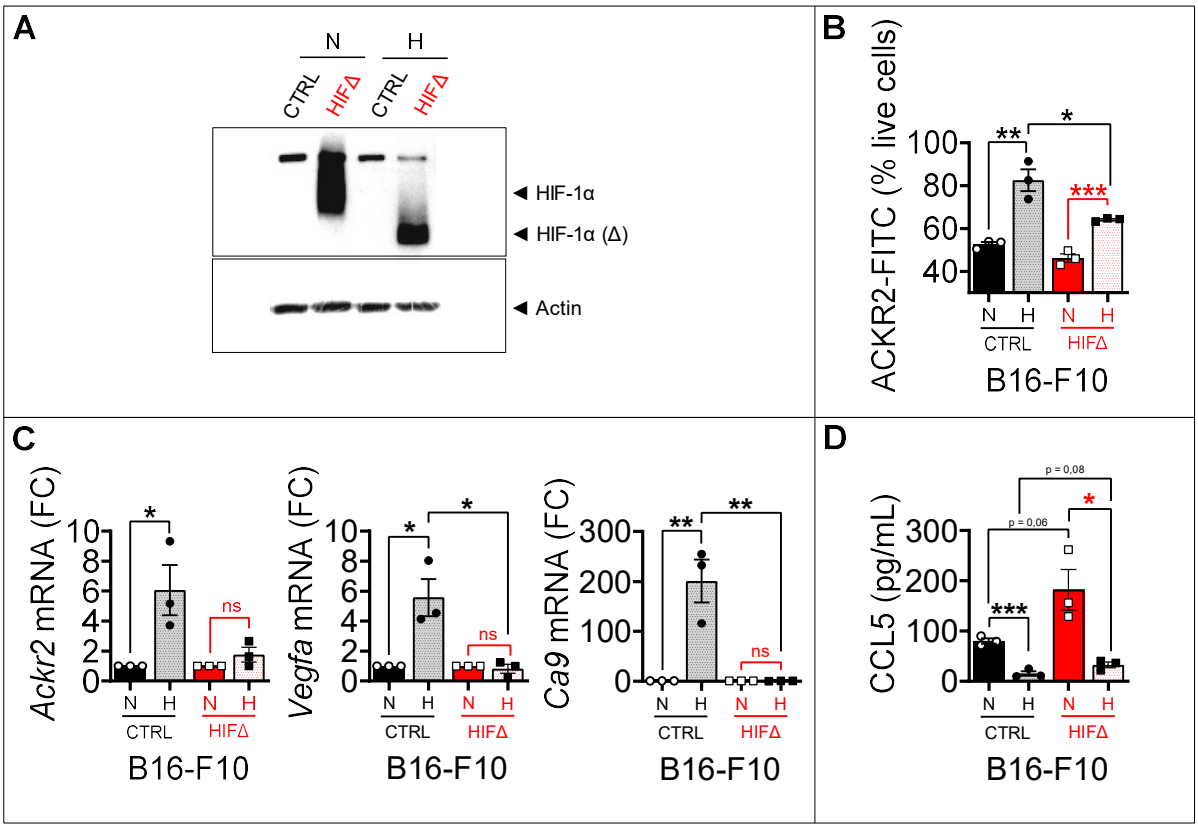


Figure 31 : L'expression de ACKR2 par les cellules B16-F10 HIFΔ est diminuée en hypoxie.

*(**A**) Western-Blot de la protéine HIF-1α sur des cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ, cultivées en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% O_2) pendant 48 heures. L'actine a été utilisée comme contrôle. (**B**) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de ACKR2 et (**C**) Analyse de l'ARN messager de Ackr2 par RT-qPCR sur les cellules B16-F10 cultivées en normoxie (N) ou en hypoxie (H). L'expression des gènes Ca9 et Vegfa a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en % de cellules positives vivantes ou en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif, * = p-value < 0,05, ** = p-value < 0,01 et *** = p-value < 0,001, déterminés par un test t de Student non apparié. (**D**) Analyse de la quantité de CCL5 sécrétée par les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ cultivées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) par ELISA. Les résultats sont rapportés en pg/mL, et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. * = p-value < 0,05 et *** = p-value < 0,001, déterminées par un test t de Student non apparié.*

2.2. La surexpression de ACKR2 dans les cellules présentant une inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α permet d'évaluer l'influence de ACKR2 sur le paysage chimiokinique

2.2.1. La caractérisation des cellules B16-F10 surexprimant ACKR2 montre l'efficacité de transduction et l'absence d'une influence sur la croissance cellulaire

ACKR2 a été surexprimé grâce à un plasmide lentiviral dans les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ pour déterminer l'impact de cette surexpression sur le paysage chimiokinique.

Dans un premier temps, la surexpression a été confirmée au niveau protéique ainsi qu'au niveau de l'ARN messager. Pour les cellules B16-F10 CTRL surexprimant ACKR2 (B16-F10 CTRL-ACKR2), nous pouvons en effet observer une augmentation de la protéine d'environ 15% et une augmentation de l'ARN messager d'environ 25 000 *fold change* comparé aux cellules transduites avec le plasmide contrôle (B16-F10 CTRL-GFP). Pour les cellules B16-F10 HIFΔ surexprimant ACKR2 (B16-F10 HIFΔ-ACKR2), nous pouvons également observer une nette hausse de la protéine d'environ 10%, et une augmentation de l'ARN messager d'environ 50 000 *fold change* comparé aux cellules HIFΔ transduites avec le plasmide contrôle (B16-F10 HIFΔ-GFP) (**Figure 32A**).

A cause de l'activité de « *scavenger* » de ACKR2 et pour s'assurer que les résultats observés dans le futur sur le niveau de chimiokines soient dus à la surexpression en elle-même et non à une différence dans la croissance cellulaire, et donc une différence dans la sécrétion de chimiokines due à un nombre diminué de cellules, la luminescence relative des cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2 a été mesurée après 24, 48 et 72 heures d'ensemencement grâce au CellTiter Glo®. Aucune différence notable n'a été observée pour chaque type de cellules (**Figure 32B**). Cela confirme que dans notre modèle, ACKR2 est bien surexprimé, et cela n'a aucun impact sur la croissance cellulaire.

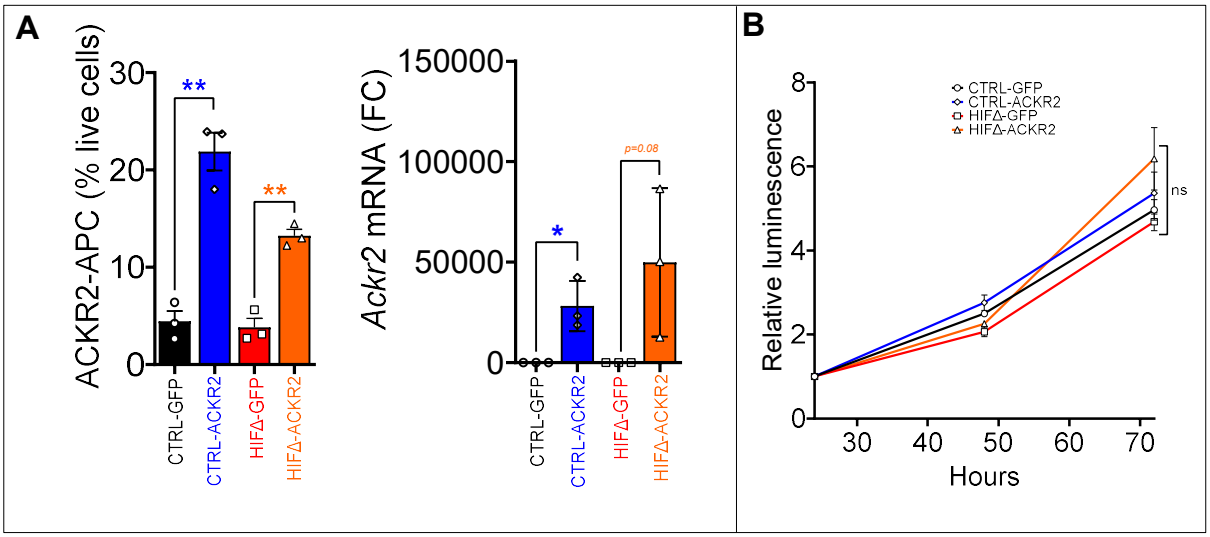


Figure 32 : La surexpression de ACKR2 par transduction est confirmée dans nos modèles cellulaires et n'impacte par la croissance cellulaire.

*(**A**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux et RT-qPCR dans les cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2. Les résultats sont reportés en % de cellules positives vivantes ou en fold change (FC) et les barres d'erreur représentent la moyenne ± SEM de trois expériences réalisées de manière indépendante. * = p-value < 0,05 et ** = p-value < 0,01, déterminées par un test t de Student non apparié. (**B**) Analyse de la luminescence relative des cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2 par CellTiter Glo® après 24, 48 et 72 heures d'incubation. Les barres d'erreur représentent la moyenne ± SEM de trois expériences réalisées de manière indépendante. ns = non significatif, déterminé par un test t de Student non apparié entre chaque groupe.*

2.2.2. La surexpression de ACKR2 dans notre modèle a une influence sur le paysage chimiokinique, notamment sur la quantité de CCL5

Pour déterminer l'impact de la surexpression de ACKR2 sur le niveau de cytokines et chimiokines de nos modèles cellulaires, le surnageant des cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2 a été analysé par *cytokine array*. Le *Mouse XL cytokine array* permet de détecter la présence de 111 cytokines et chimiokines en duplicat (**Figure 33A**). Le signal des cytokines/chimiokines qui étaient augmentées ou

diminuées de manière importante entre les deux conditions a été quantifié (**Figure 33B**). Les résultats montrent qu'en plus de CCL5, la surexpression de ACKR2 semble avoir un impact sur un panel de chimiokines pro-inflammatoires impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale, telles que CCL2, CCL3, CCL4, CCL22, CX3CL1 et CXCL10, ce qui était attendu à cause de son rôle dans la déplétion de chimiokines [379, 380]. D'après le *cytokine array*, le niveau de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, et CX3CL1 semble être diminué dans le surnageant des clones B16-F10 CTRL-ACKR2 et HIFΔ-ACKR2 comparé aux clones B16-F10 CTRL-GFP et HIFΔ-GFP respectivement. En revanche, pour CXCL10, la quantité semble diminuer dans le surnageant des clones B16-F10 HIFΔ-ACKR2 comparé aux clones HIFΔ-GFP, mais pas dans le surnageant des clones B16-F10 CTRL-ACKR2 comparé aux clones B16-F10 CTRL-GFP (**Figure 33B**). Cela pourrait s'expliquer par le fait que ACKR2 a moins d'affinité pour CXCL10 que pour les autres chimiokines [304]. Pour confirmer et renforcer ces résultats, il faudrait au moins répéter l'expérience de *cytokine array* sur deux autres réplicats indépendants, ou au mieux quantifier chaque chimiokine par ELISA sur trois expériences indépendantes.

Pour confirmer les résultats obtenus sur CCL5, la quantité de cette chimiokine dans le surnageant des cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2 en normoxie (N) et en hypoxie (H) a été déterminée par ELISA sur 3 expériences indépendantes. En normoxie, nous pouvons observer une baisse presque significative concernant la quantité de CCL5 dans le surnageant des cellules B16-F10 CTRL-GFP comparé au surnageant des cellules CTRL-ACKR2 (*p-value = 0,08*), et une baisse significative du niveau de CCL5 dans le surnageant des cellules B16-F10 HIFΔ-GFP comparé au surnageant des cellules HIFΔ-ACKR2 (**Figure 33C**). Cette diminution est similaire pour les clones CTRL et HIFΔ (environ 30%). Cela montre que dans nos modèles, la capacité de « *scavenging* » de chimiokines de ACKR2 n'est pas impactée. De plus, en hypoxie, nous n'observons aucune différence significative dans le surnageant des cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2. En outre, nous observons une baisse significative du niveau de CCL5 pour les clones B16-F10 CTRL-GFP et HIFΔ-GFP entre les conditions normoxiques et hypoxiques, ce qui n'est

plus le cas pour les clones CTRL-ACKR2 et HIFΔ-ACKR2 entre normoxie et hypoxie (**Figure 33C**). Cela suppose que la surexpression de ACKR2 a la même influence sur le niveau de CCL5 que l'induction de conditions hypoxiques, et renforce nos résultats précédents montrant une corrélation entre l'expression de ACKR2 augmentée en hypoxie et la baisse du niveau de CCL5 dans le surnageant des cellules.

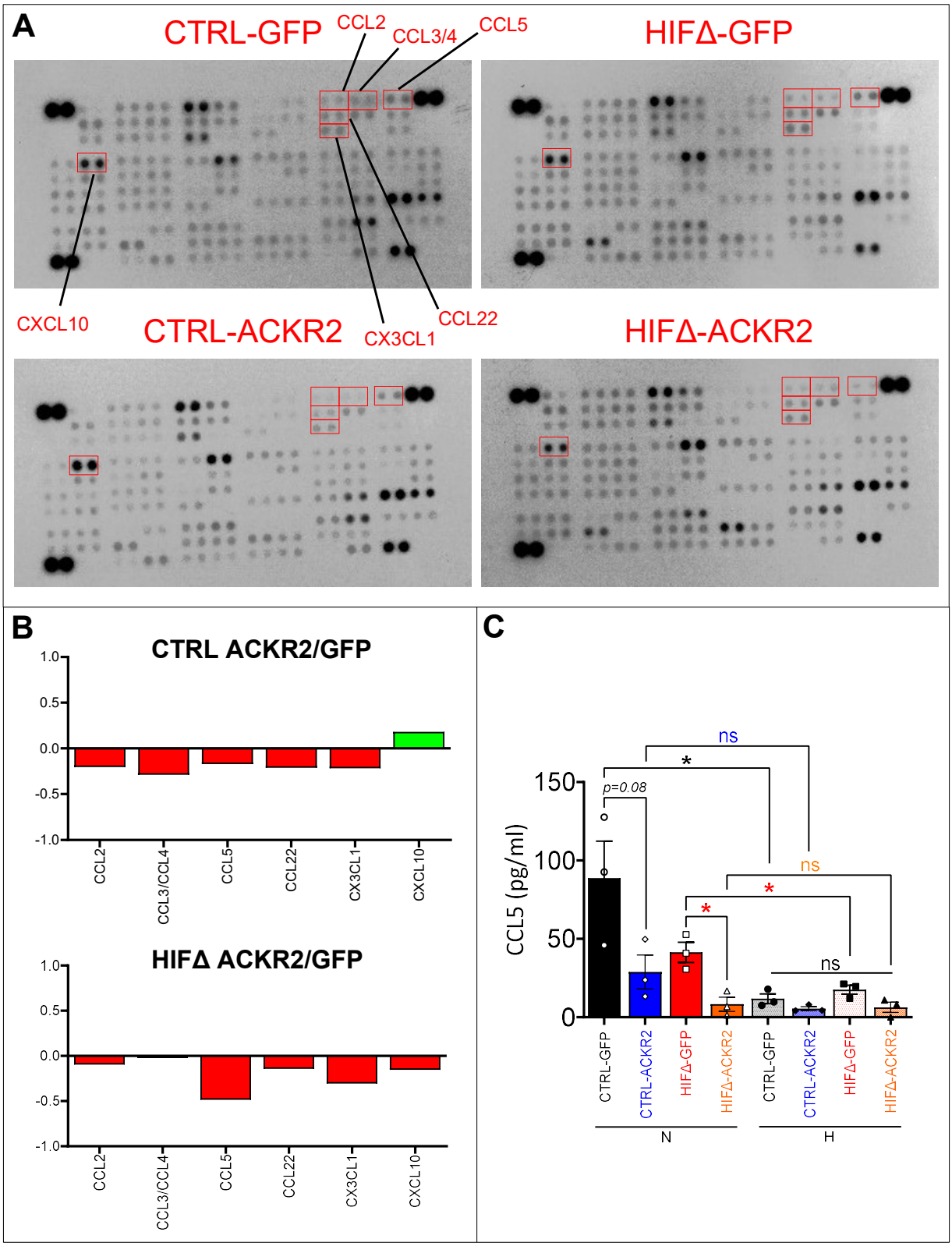

A
CTRL-GFP
CCL2
CCL3/4
CCL5
HIFΔ-GFP
CXCL10
CTRL-ACKR2
CX3CL1
CCL22
HIFΔ-ACKR2
B
CTRL ACKR2/GFP
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
CCL2
CCL3/CCL4
CCL5
CCL22
CX3CL1
CXCL10
HIFΔ ACKR2/GFP
C
CCL5 (pg/ml)
150
100
50
0
p=0.08
ns
*
CTRL-GFP
CTRL-ACKR2
HIFΔ-GFP
HIFΔ-ACKR2
N
H

Figure 33 : La surexpression de ACKR2 dans notre modèle a une influence sur le paysage chimiokinique, notamment sur la quantité de CCL5.

*(**A**) Mouse XL Cytokine Array réalisé sur le surnageant des cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2 en normoxie. Les cytokines/chimiokines d'intérêt augmentées ou diminuées sont mises en évidence en rouge. (**B**) Ratio du signal obtenu sur le Cytokine Array entre le surnageant des cellules B16-F10 CTRL-GFP et CTRL-ACKR2, et le surnageant des cellules B16-F10 HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2. L'intensité du signal a été mesurée grâce au logiciel ImageJ. Le Mouse XL Cytokine Array a été réalisé une seule fois. (**C**) Analyse de la quantité de CCL5 dans le surnageant des cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2 par ELISA après 48 heures en normoxie (N – 21% O_2) ou en hypoxie (H – 0,1% O_2). Les données sont rapportées en pg/mL, et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif et * = p-value < 0,05, déterminés par un test t de Student non apparié.*

3. La délétion de HIF-1α engendre une baisse de l'expression de ACKR2 dépendante de l'hypoxie dans des tumeurs de mélanome murin

Après mise en évidence de l'expression de ACKR2 *in vitro* et de sa régulation en hypoxie, il était important de vérifier la continuité des résultats *in vivo*. Pour ce faire, l'expression de ACKR2 a été évaluée dans des tumeurs murines B16-F10 CTRL ou HIFΔ disponibles au laboratoire, par RT-qPCR et marquage immunohistochimique.

Nous pouvons observer une diminution significative de l'ARN messager de *Ackr2* dans les tumeurs B16-F10 HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL, confirmant les résultats obtenus *in vitro* avec les cellules HIFΔ. L'expression de *Vegfa* et *Ca9* a également été analysée pour confirmer l'inactivité transcriptionnelle de HIF-1α dans ces tumeurs (**Figure 34A**). Les images d'immunohistochimie montrent également une diminution de CA9 et de ACKR2 au niveau protéique, et une augmentation de CCL5 pour les tumeurs HIFΔ comparé aux CTRL, ce qui corrèle avec les résultats observés *in vitro* (**Figure 34B**). La quantification du marquage de ACKR2 par immunohistochimie montre que l'expression

de ACKR2 est de fait significativement moindre dans les tumeurs HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL (**Figure 34C**).

Ces derniers résultats permettent de confirmer que lorsque l'activité transcriptionnelle de HIF-1α est inhibée dans les cellules B16-F10, l'expression de ACKR2 est diminuée, non seulement au niveau cellulaire mais également à l'échelle tumorale, et que cette diminution résulte en une augmentation de la chimiokine pro-inflammatoire CCL5.

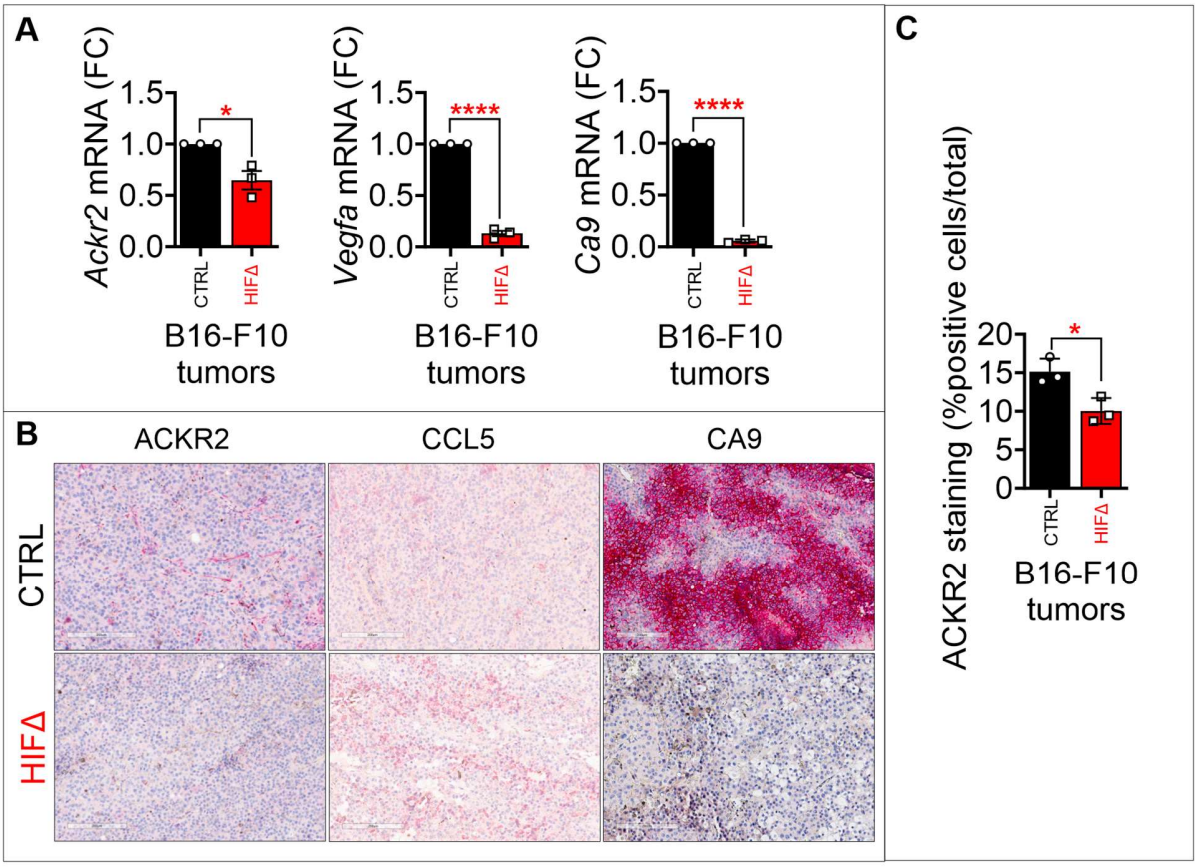


Figure 34 : L'expression de ACKR2 est significativement moindre au niveau des tumeurs B16-F10 HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL.

*(**A**) Analyse de l'expression de Ackr2, Vegfa ainsi que Ca9 par RT-qPCR dans les tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ. Les résultats sont reportés en fold change (FC) et les barres d'erreur représentent la moyenne ± SEM de 3 tumeurs par groupe. * = p-value < 0,05 et **** = p-value < 0,0001, déterminées par un test t de*

*Student non apparié. (**B**) Marquage de ACKR2, CCL5 et CA9 (en rouge) par immunohistochimie, réalisé sur des tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ. Barres d'échelle : 200 µm. (**C**) Quantification du marquage immunohistochimique de ACKR2 sur les tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ. Les données sont rapportées en pourcentage de cellules positivement marquées comparé aux nombres de cellules totales. Pour la quantification, trois zones aléatoires de trois tumeurs par groupe ont été considérées, et la moyenne a été calculée. Les barres d'erreurs représentent la moyenne ± SEM de 3 tumeurs par groupe. * = p-value < 0,05 déterminée par un test t de Student non apparié.*

4. ACKR2 est directement régulé par HIF-1α en hypoxie mais pas par HIF-2α, ni par d'autres voies importantes dans la progression tumorale

4.1. ACKR2 est directement régulé par le facteur de transcription HIF-1α en hypoxie dans les cellules B16-F10

Après avoir montré l'implication de l'hypoxie dans la régulation de ACKR2 dans nos modèles, il restait à déterminer si cette régulation est directement dépendante de HIF-1α, ou si elle fait intervenir d'autres intermédiaires en amont. Pour répondre à cette question, les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ hypoxiques furent analysées par immunoprécipitation de chromatine-qPCR (ChIP-qPCR), avec un anticorps anti-HIF-1α. La ChIP est une technique qui permet de déterminer si une protéine donnée (ici HIF-1α), se lie à un fragment précis d'ADN (ici les motifs HRE du promoteur de *Ackr2*).

Les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ ont été placées en hypoxie pendant 48 heures, de la même manière que pour les expériences précédentes. Les protéines liées à l'ADN ont ensuite été immobilisées par des liens covalents à l'endroit précis de leur interaction avec l'ADN, grâce à un traitement au formaldéhyde. Les cellules ont ensuite été lysées, puis les complexes ADN-protéines ont été fragmentés en courts segments d'environ 200 paires de bases, par sonication. Les segments ont ensuite été immunoprécipités avec un

anticorps dirigé contre HIF-1α. De ce fait, les fragments précipités correspondent aux fragments où HIF-1α est lié à l'ADN. Les segments ont également été précipités avec un anticorps anti-IgG en parallèle, pour permettre la normalisation du signal. Par la suite, les liens entre l'ADN et HIF-1α sont rompus, et l'ADN est purifié et analysé par qPCR.

Pour réaliser la qPCR, différentes paires d'amorces ont été élaborées : une paire d'amorces qui amplifie une séquence aléatoire du promoteur de *Ackr2* ne contenant pas de motifs HRE et qui a servi de contrôle négatif supplémentaire (*Ackr2-NegCTRL*) ; une paire d'amorces qui amplifie une séquence contenant un motif HRE du promoteur de *Vegfa* et qui a servi de contrôle positif (*Vegfa-HRE*) ; et deux paires d'amorces pour chaque séquence du promoteur de *Ackr2* contenant un motif HRE (*Ackr2-HRE 1.1, 1.2, 2.1 et 2.2*). Pour cette expérience, deux motifs HRE présents dans le promoteur de *Ackr2* ont été considérés (HRE 1 et HRE 2). La qPCR a également été effectuée sur une fraction non-immunoprécipitée avec l'anticorps anti-HIF1α : l'INPUT. Les valeurs de seuil de cycle (Ct) de la phase exponentielle de la qPCR ont été enregistrées pour chaque échantillon et chaque INPUT, puis la quantité relative d'ADN immunoprécipité comparé à l'ADN INPUT a été calculée et reportée en *fold enrichment*.

Ainsi, les premiers résultats de l'immunoprécipitation de chromatine montrent que pour les conditions utilisées comme contrôles négatifs, c'est-à-dire *Ackr2-NegCTRL* et toutes les conditions utilisant les cellules B16-F10 HIFΔ, la quantité relative d'ADN immunoprécipité comparé à l'ADN INPUT est autour de deux *fold*. En revanche, pour le contrôle positif *Vegfa-HRE* dans les cellules B16-F10 CTRL, il y a environ 12 fois plus d'ADN immunoprécipité par l'anticorps anti-HIF-1α comparé à l'INPUT. Pour les conditions d'intérêt, c'est-à-dire *Ackr2-HRE 1.1, 1.2, 2.1 et 2.2*, il y a entre 5 et 9 fois plus d'ADN immunoprécipité par l'anticorps anti-HIF-1α comparé à l'INPUT (**Figure 35A**). Cela signifie qu'en hypoxie, HIF-1α est capable de se lier sur les motifs HRE du promoteur de *Ackr2* dans nos cellules B16-F10 CTRL.

L'expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante pour permettre une analyse statistique. La combinaison des trois expériences montre que les résultats sont significatifs pour *Vegfa-HRE*, ce qui était attendu en tant que contrôle positif, et les résultats sont non significatifs pour *Ackr2-NegCTRL*, ce qui confirme la spécificité des

conditions expérimentales. Les résultats sont également significatifs pour le motif HRE 2 (*HRE 2.1 et 2.2*) et presque significatifs pour le motif HRE 1 (*HRE 1.1 et 1.2 – p-value = 0,06 et 0,07*) (**Figure 35B**). Cela montre qu'en hypoxie, HIF-1α est capable de se lier sur au moins un des motifs HRE du promoteur de *Ackr2* de manière significative, dans les cellules B16-F10.

Cette découverte est importante puisque c'est la première fois que HIF-1α est montré comme régulateur direct de récepteurs de chimiokines atypiques. La présence de motifs HRE dans les promoteurs de récepteurs de chimiokines conventionnels et la régulation de ceux-ci par l'hypoxie sont bien décrites dans le contexte tumoral [296, 297], ce qui n'est pas le cas pour les ACKRs, malgré quelques éléments suggérant une possible régulation de ACKR3 et ACKR4 par l'hypoxie [369-371]. Cet élément s'ajoute aux multiples rôles de HIF-1α dans la progression tumorale et pourrait expliquer partiellement l'exclusion immunitaire observée dans les tumeurs fortement hypoxiques chez les patients présentant une résistance aux traitements anti-cancéreux, notamment l'immunothérapie par blocage des points de contrôle immunitaires. En revanche, pour montrer l'activité transcriptionnelle de HIF-1α sur ACKR2, il serait intéressant de réaliser un test luciférase. Le test de la luciférase est utilisé pour déterminer si une protéine peut activer ou réprimer l'expression d'un gène cible. La ChIP permettant uniquement d'évaluer la capacité d'une protéine à interagir avec une région de l'ADN, le test de la luciférase permettrait d'établir une relation fonctionnelle entre la protéine et la quantité de produit génique qui est produite.

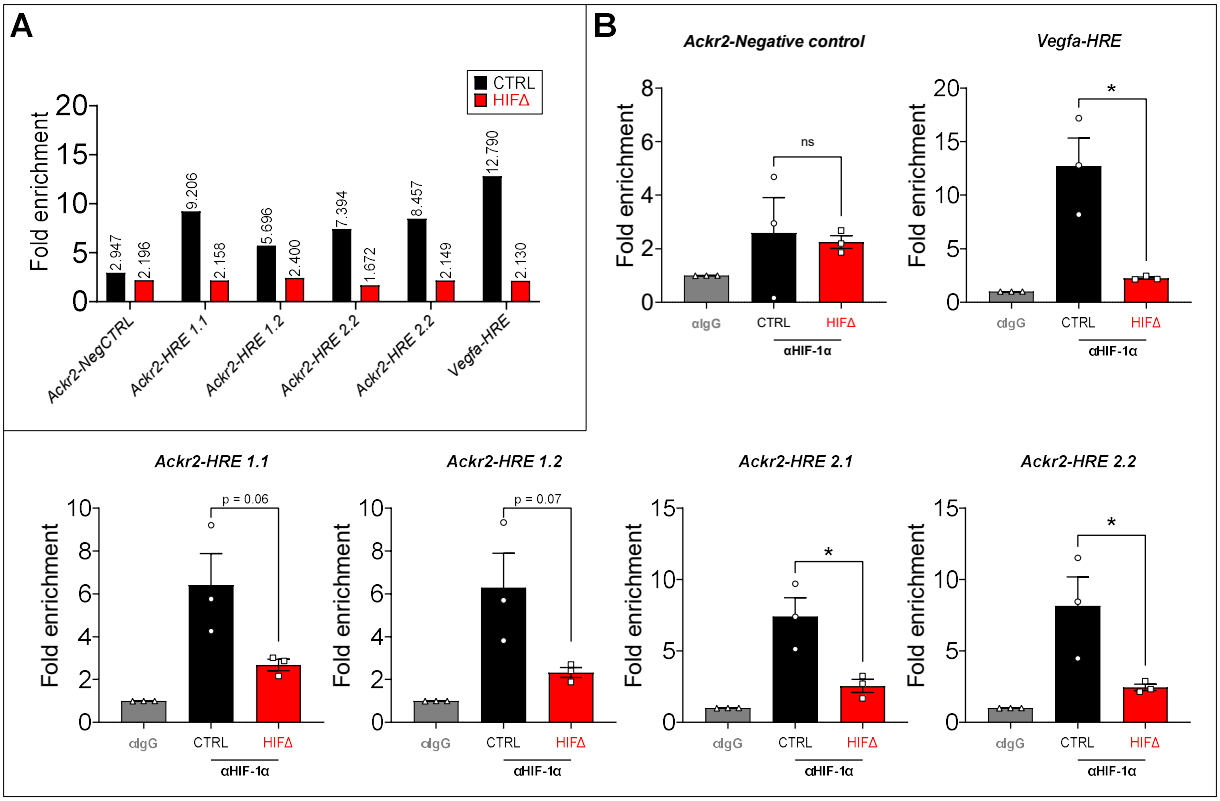


Figure 35 : Le facteur de transcription HIF-1α se lie directement sur les motifs HRE du promoteur de Ackr2 en hypoxie dans les cellules de mélanome B16-F10.

*(**A**) Graphique représentant les résultats obtenus pour l'une des expériences de ChIP-qPCR. L'immunoprécipitation de chromatine fut exécutée grâce à un anticorps anti-HIF-1α sur les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ cultivées en hypoxie pendant 48 heures (0,1% O_2), et fut suivie d'une qPCR avec des amorces permettant d'amplifier les motifs HRE de Vegfa et de Ackr2, ou d'amplifier une séquence aléatoire de Ackr2 ne contenant pas de motifs HRE (Ackr2-NegCTRL). Pour chaque motif HRE du promoteur de Ackr2, deux paires d'amorces différentes ont été utilisées (Ackr2 HRE 1.1, 1.2, 2.1 et 2.2). Pour chaque gène, les signaux obtenus par qPCR ont été normalisés par rapport à la condition IgG. (**B**) Graphiques représentant le détail des résultats obtenus par immunoprécipitation de chromatine pour trois expériences indépendantes. Pour chaque gène, les signaux obtenus par qPCR ont été normalisés par rapport à la condition IgG. Les différences statistiquement significatives entre les résultats obtenus pour les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ sont indiquées. Les résultats sont reportés en fold enrichment et les barres d'erreur représentent la moyenne ± SEM de trois expériences réalisées de manière indépendante. ns = non significatif, et * = p-value < 0,05, déterminés par un test t de Student non apparié.*

4.2. HIF-2α n'est pas impliqué dans la régulation de ACKR2 dans les cellules CT26 en hypoxie

Le facteur de transcription HIF-2α est également capable de former un dimère avec HIF-1β et de se fixer sur les motifs HRE de gènes cibles en hypoxie ; il partage même des gènes cibles en commun avec HIF-1α [42]. Pour cette raison, il était important d'évaluer l'implication de HIF-2α dans la régulation de ACKR2.

ACKR2 a été analysé au niveau de son expression sur les cellules CT26 transfectées avec un *siRNA* contre HIF-2α (*siHIF-2α*) ou un *siRNA* contrôle (*siCT*) en hypoxie. Pour les cellules CT26 transfectées avec le *siCT*, l'expression de ACKR2 était augmentée de manière significative en hypoxie comparé aux conditions normoxiques. Cette augmentation était retrouvée entre les cellules transfectées avec le *siHIF-2α* en hypoxie comparé aux cellules transfectées avec le *siCT* en normoxie ; en revanche, la transfection avec le *siHIF-2α* dans les cellules CT26 n'a pas eu d'impact sur l'expression protéique de ACKR2 comparé au *siCT* en hypoxie (**Figure 36A**).

L'ARN messager de *HIF-2α* a été analysé par RT-qPCR et montre l'efficacité de transfection, puisque l'expression de *HIF-2α* était augmentée de manière significative en hypoxie pour les cellules transfectées avec le *siCT*, et diminuée de manière significative en hypoxie pour les cellules transfectées avec le *siHIF-2α* comparé au siCT (**Figure 36B**). L'ARN messager de *Ca9* a également été évaluée par RT-qPCR pour vérifier l'induction de conditions hypoxiques. L'expression de *Ca9* est induite en hypoxie par HIF-1α, mais pas par HIF-2α [391], ce qui explique qu'il n'y ait pas de différence en hypoxie entre les cellules transfectées avec le *siCT* et les cellules transfectées avec le *siHIF-2α* (**Figure 36B**). Il n'y avait pas de différence significative au niveau de l'ARN messager de *Ackr2* après transfection des cellules avec le *siHIF-2α* comparé au *siCT* en hypoxie, ce qui corrobore ce qui était observé au niveau protéique (**Figure 36A et B**). Ces résultats montrent que contrairement à son homologue, HIF-2α n'est pas impliqué dans la régulation de ACKR2 en hypoxie. Néanmoins, il serait pertinent de répéter cette expérience sur nos autres lignées cellulaires, notamment les 4T1 et les B16-F10 CTRL et

HIFΔ, pour déterminer si c'est le cas dans ces modèles également ou si cela est limité aux cellules CT26.

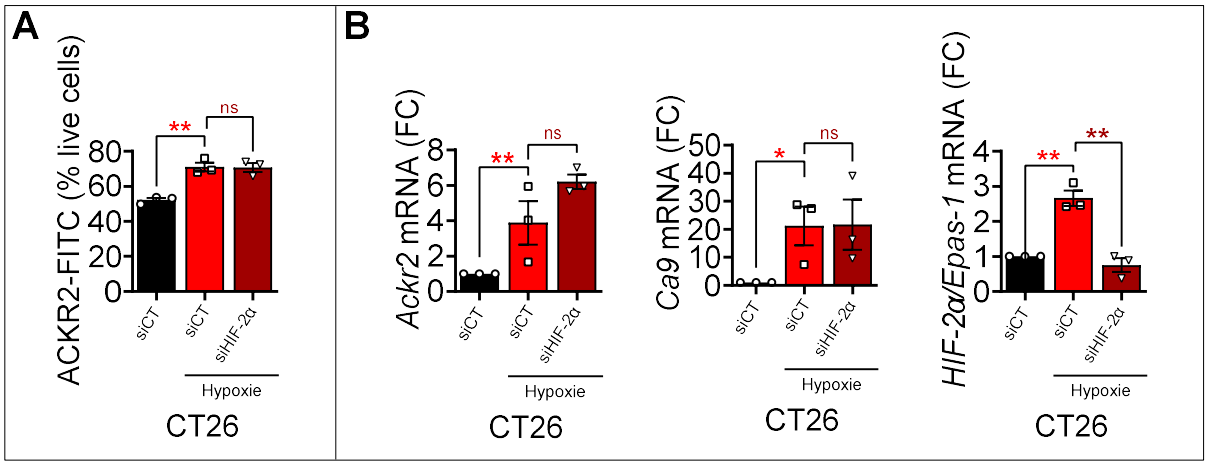


Figure 36 : Le silencing de HIF-2α par siRNA dans les cellules CT26 n'induit pas de changements dans l'expression de ACKR2 en hypoxie.

*(**A**) Analyse de l'expression de ACKR2 par cytométrie en flux sur les cellules CT26 cultivées dans des conditions normoxiques (21% O_2) ou hypoxiques (0,1% O_2) et transfectées soit avec un siRNA contrôle (siCT), soit avec un siRNA dirigé contre HIF-2α (siHIF-2α). Les données sont rapportées en % de cellules positives vivantes. Elles représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif et ** = p-value < 0,01 ; déterminés par un test t de Student non apparié. (**B**) Analyse de l'ARN messager de Ackr2, Ca9 et HIF-2α/EPAS-1 par RT-qPCR sur les cellules CT26 décrites dans (A). L'expression du gène Ca9 a également été analysée par RT-qPCR pour confirmer les conditions hypoxiques. Les résultats sont rapportés en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif, * = p-value < 0,05 et ** = p-value < 0,01, déterminés par un test t de Student non apparié.*

4.3. L'induction de l'autophagie par stress nutritionnel n'a pas d'impact sur l'expression de ACKR2 pour les cellules CT26

L'induction de l'autophagie par l'hypoxie a été largement décrite et associée à une baisse de la survie et une résistance aux traitements anti-cancéreux chez les patients [392-394]. Ainsi, il est légitime de se poser la question de l'impact de l'autophagie sur l'expression de ACKR2. Pour répondre à cette question, l'une des méthodes consiste à induire un stress nutritionnel aux cellules en remplaçant leur milieu complet par de la solution saline équilibrée de Hanks (HBSS), dépourvue de nutriments [395].

L'expression de ACKR2 a été analysée par cytométrie en flux et RT-qPCR sur les cellules CT26 cultivées soit avec du milieu complet, soit avec du milieu HBSS. L'induction de l'autophagie a été confirmée par western-blot, où une dégradation de la protéine P62 était observé pour les cellules cultivées dans le milieu HBSS comparé aux cellules cultivées dans le milieu complet (condition CTRL) (**Figure 37A**). La diminution de la protéine P62 est utilisée comme marqueur de l'induction de l'autophagie [396]. Après 24 heures dans le milieu HBSS, nous n'observions pas de différence notable concernant l'expression de ACKR2 comparé aux cellules cultivées dans le milieu complet, que ce soit au niveau protéique ou transcriptionnel (**Figure 37B**). Cela indique que l'induction de l'autophagie par stress nutritionnel n'a aucun impact sur la régulation de ACKR2 dans ces cellules.

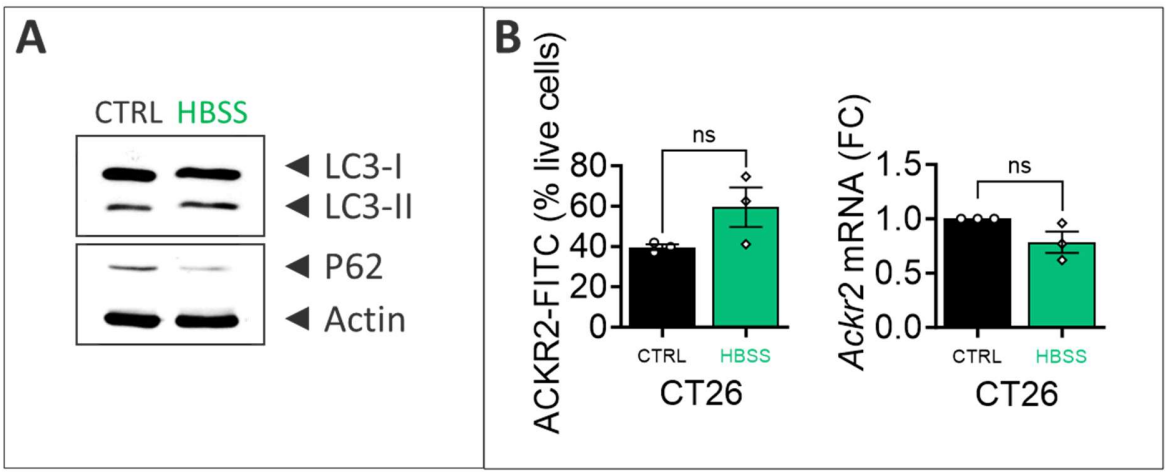


Figure 37 : L'induction de l'autophagie par stress nutritionnel n'a pas d'impact sur l'expression de ACKR2 dans les cellules CT26.

*(**A**) Western-Blot des protéines LC3 et P62 sur des cellules CT26 maintenues avec du milieu complet (CTRL) ou du milieu HBSS pendant 24 heures. L'actine a été utilisée comme contrôle. (**B**) Analyse de l'expression de ACKR2 par la technique de cytométrie en flux et par RT-qPCR sur les cellules CT26 maintenues avec du milieu complet ou du milieu HBSS pendant 24 heures. Les résultats sont rapportés en pourcentage de cellules positives vivantes ou en fold change (FC) et représentent la moyenne de trois expériences réalisées de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent la moyenne ± SEM. ns = non significatif, déterminé par un test t de Student non apparié.*

5. L'étude de la régulation de ACKR2 présente un intérêt clinique majeur

5.1. L'expression de *ACKR2* est positivement corrélée à l'expression de *CA9* dans des échantillons de patients atteints de TNBC

Après des résultats prometteurs sur des modèles cellulaires et animaux, il était important de faire le lien avec l'aspect translationnel du projet et de déterminer l'importance de l'étude de la régulation de ACKR2 dans le cancer chez l'Homme. Pour cela, dix-neuf échantillons ARN de tumeurs de patients atteints de TNBC ont été analysés par RT-qPCR pour déterminer la corrélation entre l'expression de *ACKR2* et l'expression de gènes inclus dans la signature hypoxique : *VEGFA* et *CA9*. Sur ces échantillons, nous pouvons en effet observer une corrélation positive et significative entre l'expression de *ACKR2* et de *CA9*, mais pas avec *VEGFA* (**Figure 38**). Cela est d'autant plus important que *CA9* et son expression sont corrélées de manière positive avec la taille des tumeurs, le grade, l'absence d'expression du récepteur des oestrogènes et la résistance à la chimiothérapie chez les patients atteints de TNBC [397].

Ces résultats permettent d'appuyer les résultats obtenus précédemment, en démontrant que l'expression de *ACKR2* n'est pas seulement induite en hypoxie *in vitro* et *in vivo*, elle est également positivement et significativement corrélée au statut hypoxique montré par l'expression de *CA9* au niveau de tumeurs de patients atteints de TNBC. Cela renforce l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie médiée par HIF-1α induirait ACKR2 dans les tumeurs, provoquant de ce fait la déplétion de chimiokines pro-inflammatoires dans le TME et de ce fait l'infiltration immunitaire, ce qui favoriserait la progression du cancer et la résistance aux traitements contre le cancer.

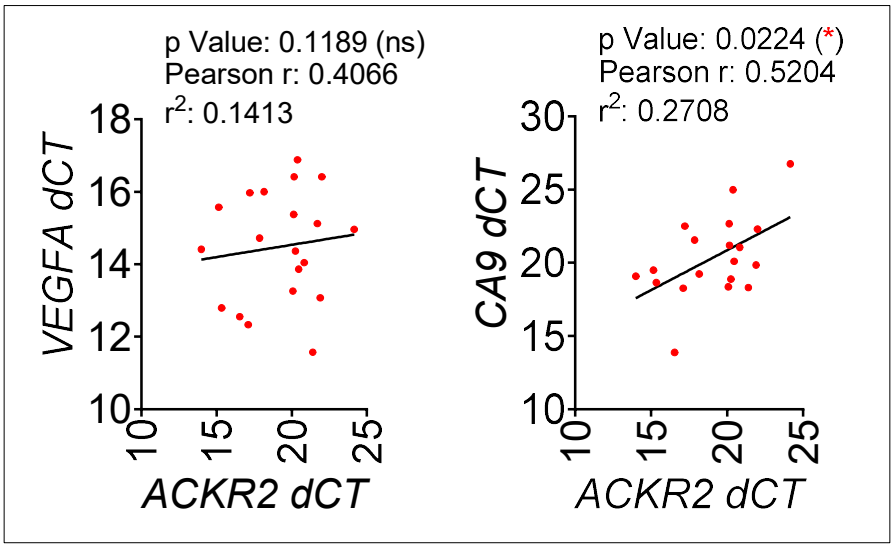


Figure 38 : L'analyse de l'ARN de 19 tumeurs démontre que l'expression de ACKR2 est positivement corrélée à l'expression de CA9 chez des patients atteints de TNBC.

*L'expression de ACKR2, VEGFA ainsi que CA9 a été analysée par RT-qPCR sur 19 échantillons de patients atteints de TNBC. Les résultats sont rapportés en différence de CT entre ACKR2 et VEGFA ou CA9. ns = non significatif, * = p-value < 0,05. r indique le coefficient de corrélation de Pearson.*

5.2. L'expression de ACKR2 et d'autres gènes impliqués dans la signature hypoxique sont positivement corrélées dans les cancers du sein et de mélanome d'après les données TCGA

Pour approfondir les résultats précédents obtenus sur dix-neuf échantillons de patients atteints de TNBC, les bases de données de *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA) ont été analysées à l'aide de l'outil *TIMER2.0*, pour déterminer de possibles corrélations entre l'expression de *ACKR2* et l'expression d'autres gènes impliqués dans la signature hypoxique dans de plus larges cohortes de patients. TCGA correspond à un programme historique de génomique du cancer, où plus de 20 000 échantillons primaires de cancer et d'échantillons normaux appariés couvrant 33 types de cancer ont été caractérisés moléculairement. L'outil *TIMER2.0* se base sur six algorithmes de pointe

pour fournir une estimation des niveaux d'infiltration immunitaire de la base de données TCGA. *TIMER2.0* propose également quatre modules pour étudier les associations entre les infiltrats immunitaires et les caractéristiques génétiques ou cliniques, et quatre modules pour explorer les associations liées au cancer dans les cohortes TCGA. Chaque module peut générer un tableau de cartes thermiques (*heatmap*) fonctionnelles, permettant à l'utilisateur d'identifier facilement les associations significatives dans plusieurs types de cancers simultanément [398].

Le module "Corrélation" présente les diagrammes de dispersion de l'expression entre une paire de gènes définis par l'utilisateur dans un type de cancer donné, ainsi que la corrélation de Spearman et la signification statistique estimée, qui peut être ajustée en fonction de la pureté de la tumeur (c'est-à-dire la proportion de cellules cancéreuses dans un échantillon). Ainsi, nous avons analysé l'expression de *ACKR2* en fonction de huit gènes impliqués dans la signature hypoxique : *DDIT4 (DNA damage inducible transcript 4)*, *LDHA*, *MXI1 (MAX interactor 1)*, *NDRG1 (N-myc downstream regulated 1)*, *P4HA1 (Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1)*, *PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1)*, *SLC2A1*, et *VEGFA [399]*. *DDIT4* et *NDRG1* sont impliqués dans la réponse au stress cellulaire, *MXI1* est un répresseur transcriptionnel, *P4HA1* est impliqué dans le remodelage de la MEC, et *PGK1* a une fonction dans la glycolyse [399]. Nous avons également inclus *HIF1A*, *CA9* et *VHL*, puisque *CA9* est utilisé comme marqueur de l'hypoxie tumorale [400] et *VHL* est un gène suppresseur de tumeur ayant une implication dans la signalisation médiée par l'adaptation à l'hypoxie [401]. Les abréviations des types de cancers de la base de données TCGA analysés sont détaillées dans le **Tableau 18** ci-dessous :

Tableau 18 : Liste des abréviations utilisées pour désigner le type de cancer analysé dans la base de données TCGA.

Abréviations	Type de cancer
ACC	Carcinome corticosurrénalien
BLCA	Carcinome urothélial de la vessie
BRCA	Carcinome invasif du sein

CESC	Carcinome épidermoïde cervical et adénocarcinome endocervical
CHOL	Cholangiocarcinome
COAD	Adénocarcinome du côlon
DLBC	Lymphome diffus à grandes cellules B
ESCA	Carcinome de l'œsophage
GBM	Glioblastome multiforme
HNSC	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou
KICH	Carcinome rénal chromophobe
KIRC	Carcinome rénal à cellules claires
KIRP	Carcinome papillaire du rein
LAML	Leucémie myéloïde aiguë
LGG	Gliome de bas grade
LIHC	Carcinome hépatocellulaire du foie
LUAD	Adénocarcinome pulmonaire
LUSC	Carcinome épidermoïde du poumon
MESO	Mésothéliome
OV	Cystadénocarcinome séreux de l'ovaire
PAAD	Adénocarcinome pancréatique
PCPG	Phéochromocytome et paragangliome
PRAD	Adénocarcinome de la prostate
READ	Adénocarcinome du rectum
SARC	Sarcome
SKCM	Mélanome cutané
STAD	Adénocarcinome de l'estomac
TGCT	Tumeur testiculaire des cellules germinales
THCA	Carcinome thyroïdien
THYM	Thymome
UCEC	Carcinome endométrial du corps utérin
UCS	Carcinosarcome utérin
UVM	Mélanome uvéal

Ainsi, nous pouvons observer une corrélation positive et significative entre l'expression de *ACKR2* et d'autres gènes inclus dans la signature hypoxique dans plusieurs types de cancers.

Par exemple, chez les patients atteints de carcinome thyroïdien (THCA), nous trouvons une corrélation positive significative entre l'expression de *ACKR2* et tous les gènes mentionnés, à l'exception de *DDIT4*. Pour les patients atteints de carcinome papillaire du rein (KIRP), nous trouvons une corrélation positive significative entre l'expression de *ACKR2* et les gènes *DDIT4*, *HIF1A*, *LDHA*, *MXI1*, *P4HA1*, *PGK1*, *SLC2A1* et *VHL*. Pour les patients atteints de mélanome cutané (SKCM), nous observons une corrélation positive significative entre l'expression de *ACKR2* et de *CA9*, *NDRG1* et *SLC2A1* dans les tumeurs primaires. Pour les patients présentant un carcinome invasif du sein (BRCA), l'analyse de l'expression des gènes permet d'oberver une corrélation positive significative entre *ACKR2* et *HIF1A*, *P4HA1*, *VEGFA* ainsi que *VHL* (**Figure 39**). Le groupe BRCA regroupe l'ensemble des sous-groupes de cancers du sein : luminal A, luminal B, HER2-positif et basal.

Il est également pertinent de remarquer que parmi l'expression des gènes inclus dans la signature hypoxique, nous observons une corrélation positive entre *HIF1A* et *ACKR2* au niveau de 16 types de cancers sur les 33 analysés, et une corrélation positive entre *VHL* et *ACKR2* dans 21 des 33 types de cancer analysés (**Figure 39**).

Ces résultats permettent de corroborer l'implication de l'hypoxie dans la régulation de ACKR2, à la fois *in vitro*, dans des modèles murins, et dans de larges cohortes de patients présentant une diversité au niveau des types de cancers.

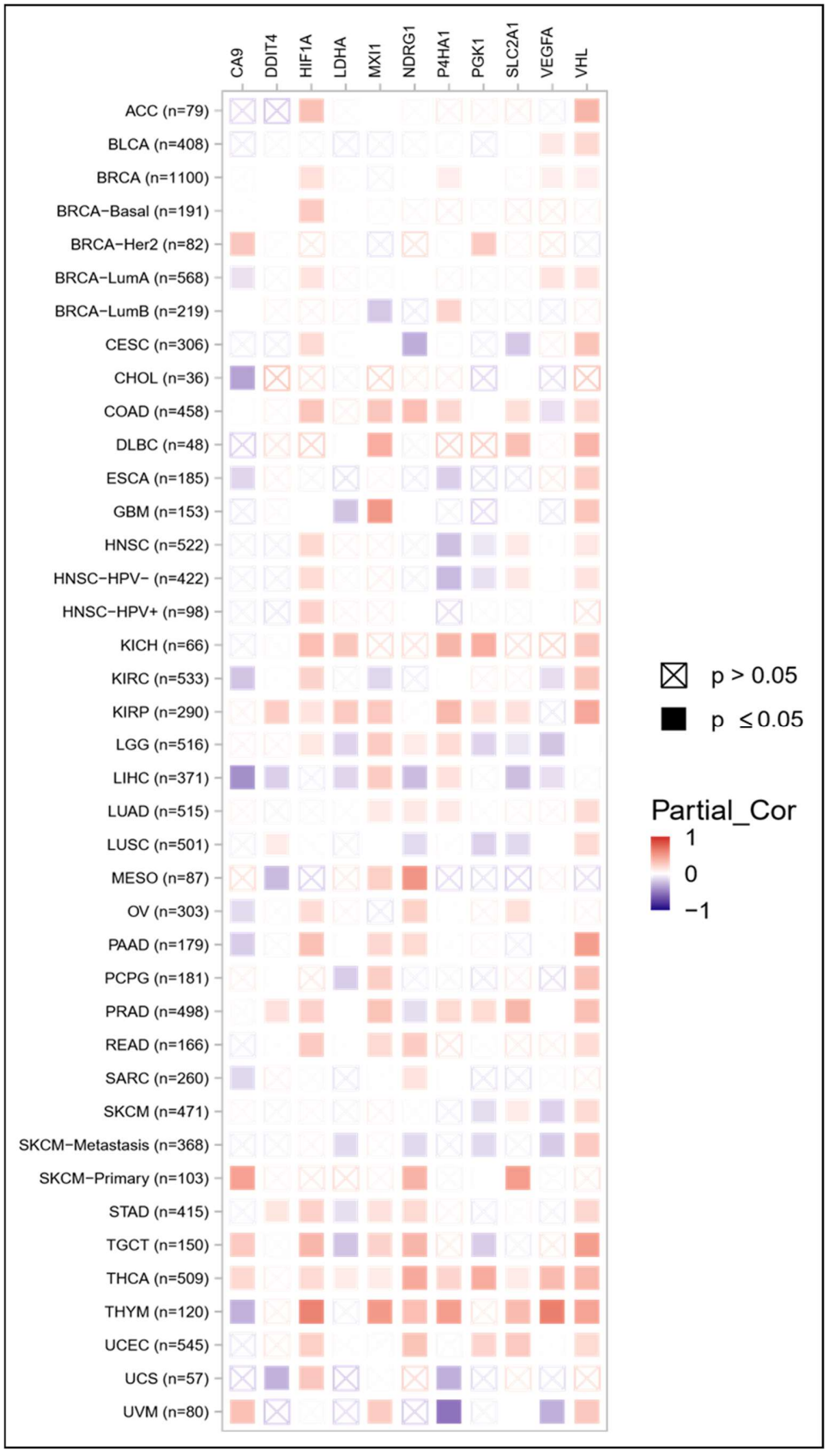

CA9
DDIT4
HIF1A
LDHA
MXI1
NDRG1
P4HA1
PGK1
SLC2A1
VEGFA
VHL
ACC (n=79)
BLCA (n=408)
BRCA (n=1100)
BRCA−Basal (n=191)
BRCA−Her2 (n=82)
BRCA−LumA (n=568)
BRCA−LumB (n=219)
CESC (n=306)
CHOL (n=36)
COAD (n=458)
DLBC (n=48)
ESCA (n=185)
GBM (n=153)
HNSC (n=522)
HNSC−HPV− (n=422)
HNSC−HPV+ (n=98)
KICH (n=66)
KIRC (n=533)
KIRP (n=290)
LGG (n=516)
LIHC (n=371)
LUAD (n=515)
LUSC (n=501)
MESO (n=87)
OV (n=303)
PAAD (n=179)
PCPG (n=181)
PRAD (n=498)
READ (n=166)
SARC (n=260)
SKCM (n=471)
SKCM−Metastasis (n=368)
SKCM−Primary (n=103)
STAD (n=415)
TGCT (n=150)
THCA (n=509)
THYM (n=120)
UCEC (n=545)
UCS (n=57)
UVM (n=80)
p > 0.05
p ≤ 0.05
Partial_Cor
1
0
−1

Figure 39 : Heatmap représentant la corrélation entre l'expression de ACKR2 et l'expression de gènes impliqués dans la signature hypoxique, dans des cohortes de patients atteints de 33 types de cancers différents.

TIMER 2.0 a été utilisé pour déterminer la relation entre les transcrits par million (TPM) de CA9, DDIT4, HIF1A, LDHA, MXI1, NDRG1, P4HA1, PGK1, SLC2A1, VEGFA et VHL avec l'expression de ACKR2 (CCBP2) dans les différentes cohortes de patients répertoriées dans la base de données TCGA. Les carrés avec une croix représentent les résultats non significatifs (p-value > 0,05), tandis que les carrés pleins représentent les résultats significatifs (p-value < 0,05). Les résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel TIMER 2.0 décrit ici : Taiwen Li, Jingxin Fu, Zexian Zeng, David Cohen, Jing Li, Qianming Chen, Bo Li, and X. Shirley Liu. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. Nucleic Acids Research 2020. [398]

5.3. L'expression de ACKR2 est corrélée à l'infiltration de certains types de cellules immunitaires chez les patients de la cohorte BRCA et SKCM

La relation entre l'expression des gènes tumoraux et l'infiltration immunitaire est d'un grand intérêt pour de nombreux chercheurs. En plus de la corrélation entre l'expression de différents gènes, l'outil *TIMER2.0* permet d'analyser l'infiltration des différentes populations immunitaires dans différents types de cancer en fonction de l'expression d'un gène d'intérêt. Le module "Gène" permet à l'utilisateur d'identifier ces relations de manière rapide, complète et impartiale. Si l'utilisateur sélectionne un gène et un type de cellule immunitaire, *TIMER2.0* génère une carte thermique des corrélations de Spearman entre l'expression du gène d'entrée et l'abondance du type de cellules immunitaires ainsi que de ses sous-types pour tous les types de cancer. Lorsque l'option "pureté ajustée" est sélectionnée, nous obtenons deux diagrammes de dispersion montrant la corrélation de l'expression du gène donné avec la pureté de la tumeur (la proportion de cellules cancéreuses dans un échantillon), et l'association de l'expression du gène avec le type de cellule immunitaire [398].

Etant donné la fonction de « *scavenger* » de ACKR2, nous pensons que dans les tumeurs hypoxiques, l'expression de ACKR2 est induite par HIF-1α, ce qui engendre une diminution des chimiokines pro-inflammatoires présentes dans le TME, et donc une

diminution de l'infiltration immunitaire. Pour approfondir cette hypothèse, l'infiltration des différentes populations de cellules immunitaires fut étudiée de manière plus approfondie grâce à l'outil *TIMER2.0* pour les cohortes de patients présentant un mélanome cutané (SKCM) ou un cancer du sein invasif (BRCA – regroupant les sous-groupes luminal A, luminal B, HER2-positif et basal).

Pour la cohorte de patients BRCA, nous pouvons observer une corrélation positive significative entre l'expression de *ACKR2* et l'infiltration de lymphocytes T CD4+. En revanche, lorsque nous regardons les sous-populations de lymphocytes T CD4+, nous remarquons une corrélation négative significative avec les sous-types Th1 et Th2, et une corrélation positive significative avec les Tregs. Nous observons également une corrélation négative significative entre l'expression de *ACKR2* et l'infiltration de lymphocytes T CD8+ et de cellules NK activées (**Figure 40**). Cela signifie que chez les patients de la cohorte BRCA, une baisse de l'infiltration de cellules immunitaires effectrices (lymphocytes T CD4+ Th1 et Th2, lymphocytes T CD8+ et cellules NK), et une hausse des cellules immunitaires immunosuppressives (Tregs) est associée à l'expression de ACKR2.

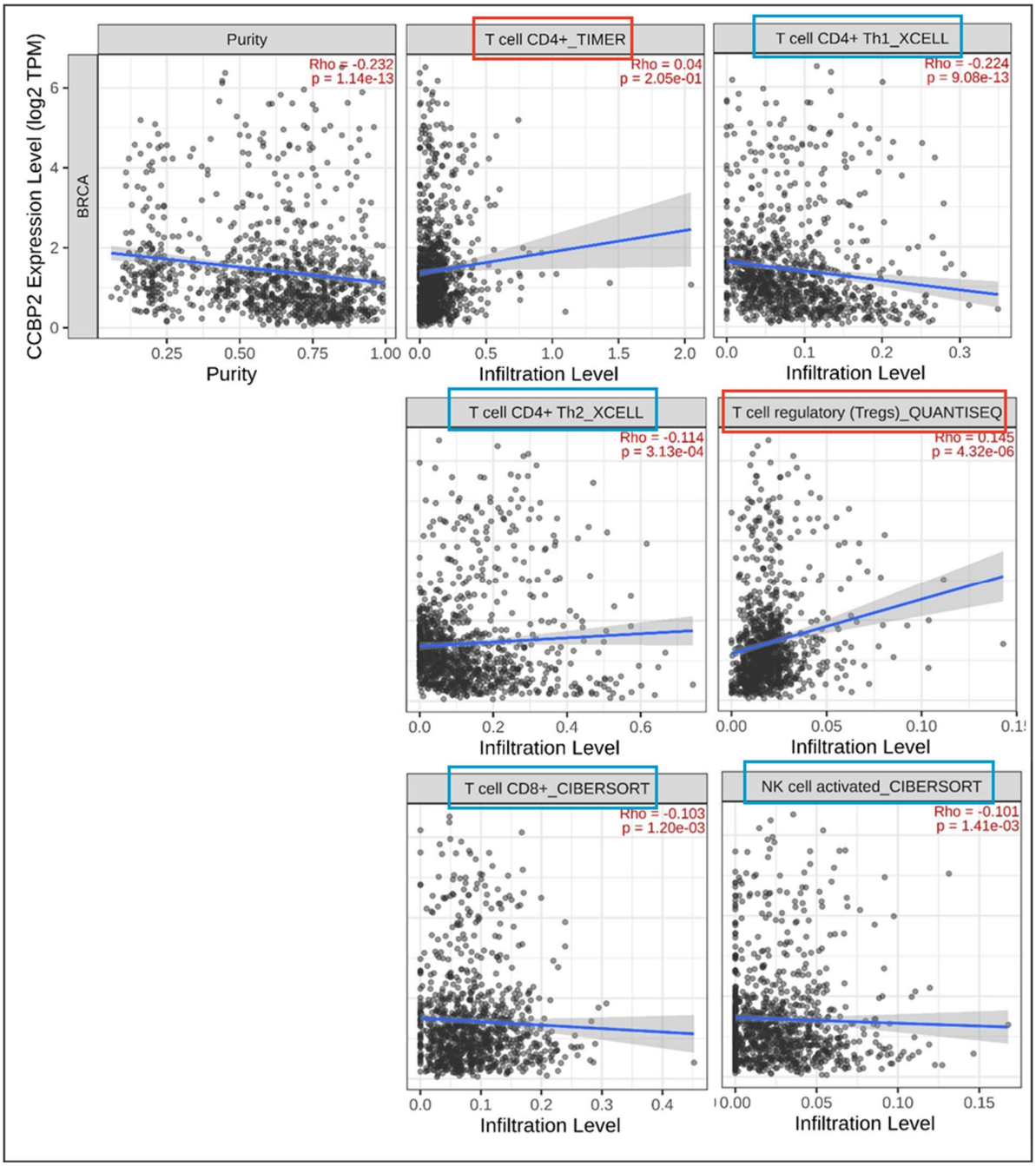


Figure 40 : L'expression de ACKR2 influence l'infiltration de différents sous-types de cellules immunitaires dans la cohorte de 1100 patients atteints de cancer du sein invasif.

TIMER 2.0 a été utilisé pour déterminer la relation entre l'infiltration des cellules immunitaires et les transcrits par million (TPM) de ACKR2 dans l'ensemble de données TCGA-BRCA. Une correction de pureté a été effectuée pour toutes les analyses. Les sous-populations immunitaires significativement corrélées à l'aide de l'algorithme indiqué (TIMER, XCELL, QUANTISEQ ou CIBERSORT) sont indiquées. Les rectangles

bleus indiquent une corrélation négative, tandis que les rectangles rouges indiquent une corrélation positive. Le logiciel TIMER 2.0 est décrit ici : Taiwen Li, Jingxin Fu, Zexian Zeng, David Cohen, Jing Li, Qianming Chen, Bo Li, and X. Shirley Liu. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. Nucleic Acids Research 2020. [398]

Pour les patients de la cohorte SKCM, nous observons une corrélation positive et significative entre l'expression de *ACKR2* et l'infiltration de lymphocytes T CD4+. Similairement à la cohorte de patients BRCA, lorsque nous regardons les sous-populations de lymphocytes T CD4+, nous remarquons une corrélation négative significative avec les sous-types Th1 et Th2, et une corrélation positive significative avec les Tregs. Nous observons également une corrélation négative significative entre l'expression de *ACKR2* et l'infiltration de lymphocytes T CD8+, et une corrélation positive significative entre l'expression de *ACKR2* et les CAFs (**Figure 41**). Cela signifie que chez les patients atteints de mélanome cutané, l'expression de ACKR2 est associée à une diminution de l'infiltration de cellules immunitaires effectrices (lymphocytes T CD4+ Th1 et Th2, et lymphocytes T CD8+), et une augmentation de cellules immunitaires immunosuppressives (Tregs et CAFs).

Ces résultats vont dans le sens de notre théorie sur l'impact de l'expression de ACKR2 sur l'infiltration immunitaire des tumeurs hypoxiques. Il serait pertinent de comparer les résultats obtenus à une expérience *in vivo* comprenant quatre groupes : B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2. Nous savons déjà que la délétion de HIF-1α engendre une baisse de ACKR2, une hausse de CCL5 et est asociée à une infiltration immunitaire plus importante comparé aux tumeurs CTRL (**Figure 34** et [259]). En théorie, nous devrions observer une diminution de CCL5 et de l'infiltration de cellules immunitaires dans les tumeurs CTRL-ACKR2 et HIFΔ-ACKR2 comparé aux tumeurs CTRL-GFP et HIFΔ-GFP.

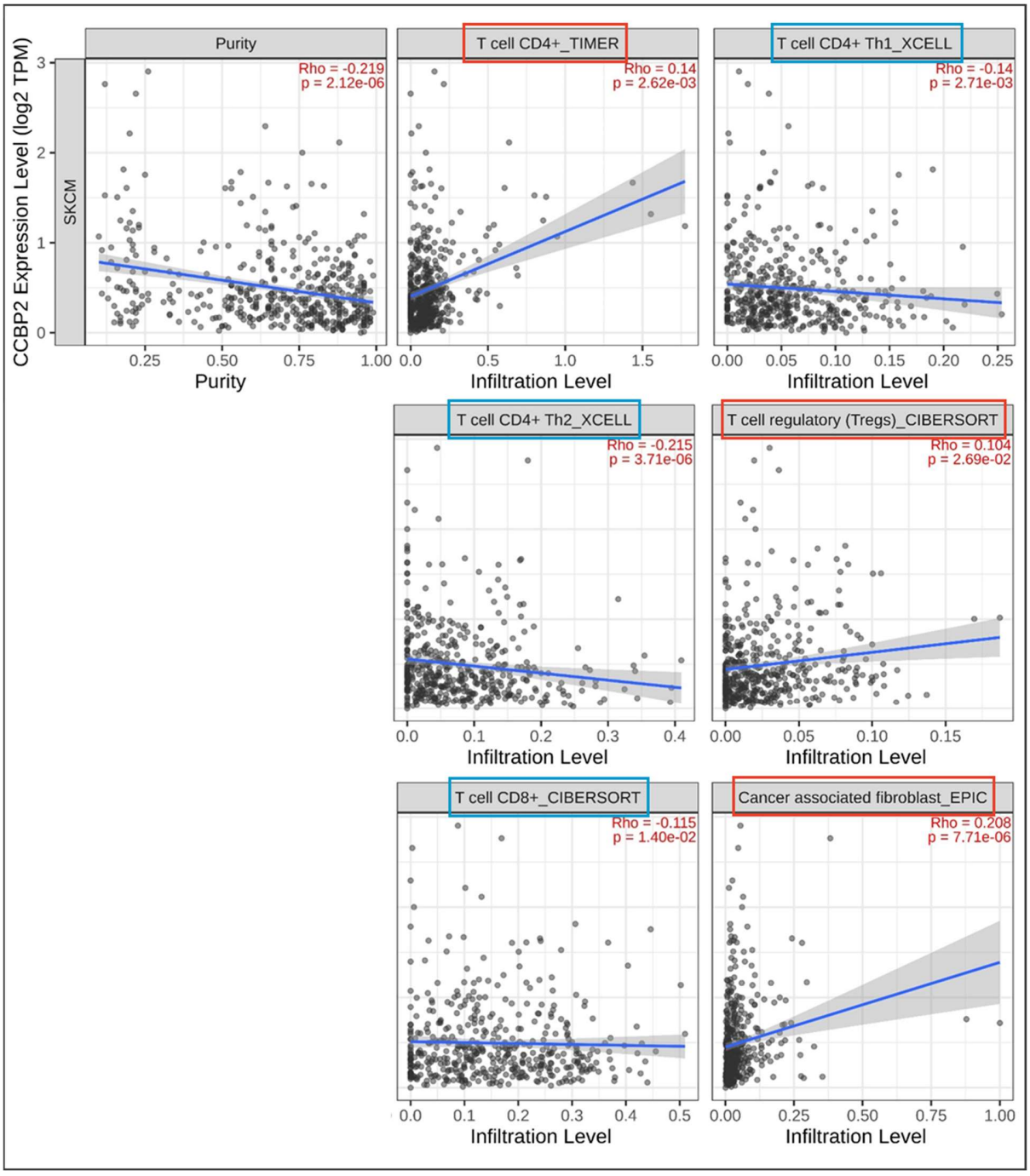


Figure 41 : L'expression de ACKR2 influence l'infiltration de différents sous-types de cellules immunitaires dans la cohorte de 471 patients atteints de mélanome cutané.

TIMER 2.0 a été utilisé pour déterminer la relation entre l'infiltration des cellules immunitaires et les transcrits par million (TPM) de ACKR2 dans l'ensemble de données TCGA-SKCM. Une correction de pureté a été effectuée pour toutes les analyses. Les sous-populations immunitaires significativement corrélées à l'aide de l'algorithme indiqué (TIMER, XCELL, EPIC ou CIBERSORT) sont indiquées. Les rectangles bleus

indiquent une corrélation négative, tandis que les rectangles rouges indiquent une corrélation positive. Le logiciel TIMER 2.0 est décrit ici : Taiwen Li, Jingxin Fu, Zexian Zeng, David Cohen, Jing Li, Qianming Chen, Bo Li, and X. Shirley Liu. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. Nucleic Acids Research 2020. [398]

6. Résultats supplémentaires : Analyse des différences transcriptomiques dans les cellules et les tumeurs de mélanome résultant de l'inhibition de HIF-1α

6.1. Analyse des différences transcriptomiques dans les tumeurs de mélanome délétées en HIF-1α

Pour approfondir nos résultats obtenus sur les tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ (**Figure 34**, [259]), une analyse NanoString a été réalisée sur trois tumeurs de chaque groupe à l'aide du panel *nCounter® PanCancer IO 360™*, qui contient 770 différents gènes permettant d'étudier l'interface entre la tumeur, le TME et la réponse immunitaire.

L'analyse des résultats obtenus grâce à la technologie NanoString expose que de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale sont diminuées dans les tumeurs HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL. Les scores de voies de signalisation condensent le profil d'expression génique de chaque échantillon en un petit ensemble de scores de voies. Les scores des voies sont ajustés à l'aide de la première composante principale des données de chaque ensemble de gènes. Ils sont orientés de manière à ce qu'un score croissant corresponde à une expression majoritairement croissante (plus précisément, chaque score de voie a des poids positifs pour au moins la moitié de ses gènes). Parmi les voies avec une différence de score la plus élevée, nous retrouvons particulièrement l'angiogenèse, l'autophagie, la régulation épigénétique, le remodelage de la MEC et le processus métastatique, le stress métabolique et la voie de signalisation Notch (**Figure 42**).

Ces résultats concordent avec la littérature, puisque comme mentionné précédemment, l'hypoxie correspond à un régulateur clé dans le métabolisme cellulaire et provoque le « *switch* métabolique » observé dans les cancers [402]. HIF-1α est également capable d'induire la transcription de gènes ayant un rôle dans l'angiogenèse, par exemple *VEGF* et *PDGF*, et de promouvoir l'angiogenèse, ainsi que le processus métastatique et la croissance tumorale. En outre, HIF-1α peut réguler l'expression de gènes encodant pour les facteurs angiogéniques Angiopoiétine 1 et 2, et PGF [127]. La formation de métastases est également favorisée *via* le remodelage de la MEC, puisque les facteurs HIFs sont impliqués dans la régulation de la dégradation de la MEC, notamment par l'activation des MMP-1 et MMP-2 [136].

Il a été montré que l'hypoxie a une fonction dans la dé-différenciation cellulaire ainsi que la formation de cellules souches cancéreuses par régulation de certains facteurs de transcription, tels que Notch et Oct4 [114]. En effet, dans des conditions hypoxiques, la signalisation Notch1 était activée et augmentait l'activité du promoteur de SOX2, promouvant ainsi la résistance aux traitements des cellules souches du cancer de l'ovaire. L'hypoxie peut également renforcer le caractère souche des cellules cancéreuses du pancréas et leur résistance thérapeutique en activant la cascade de signalisation AKT/Notch1 [116].

Outre la formation de CSCs, l'hypoxie régule également l'autophagie, notamment par induction de BNIP3 et BNIP3L, ce qui déstabilise le complexe régulateur de l'autophagie Bcl-2/Beclin 1 [164, 165]. Ainsi, il fut établi que l'autophagie engendrée par l'hypoxie entraîne la résistance des cellules malignes aux traitements anti-cancéreux [166]. En effet, l'autophagie induite par le biais de l'hypoxie va empêcher la mort des cellules tumorales médiée par les cellules cytotoxiques [147-149].

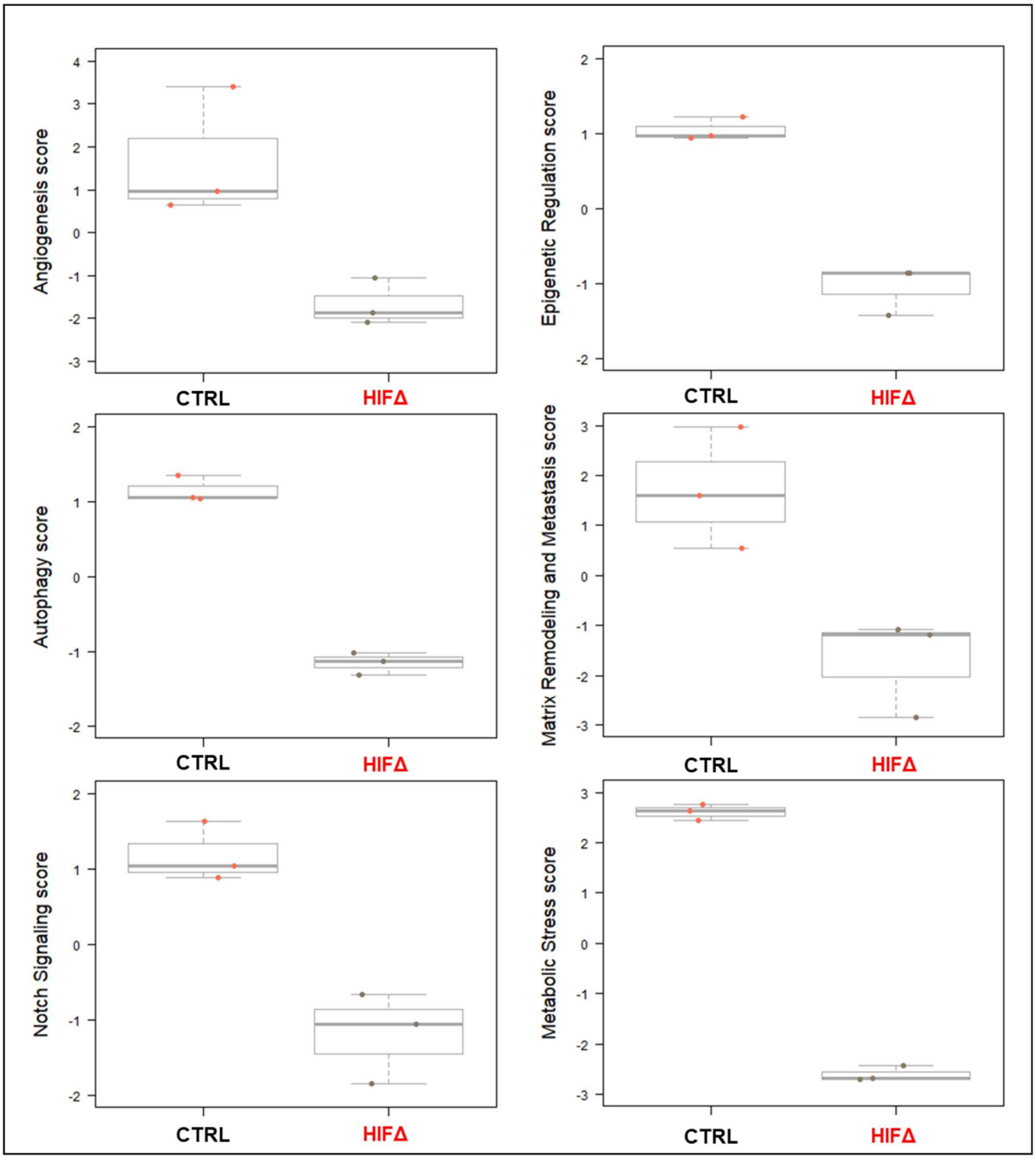


Figure 42 : L'analyse par NanoString des tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ montre l'importance de HIF-1α et de sa signalisation dans différentes voies impliqués dans le processus tumoral.

L'analyse NanoString a été réalisée pour 3 tumeurs de chaque groupe (CTRL et HIFΔ) grâce au panel nCounter® PanCancer IO 360™. Toutes les données ont été normalisées et soumises à un contrôle de qualité. L'analyse des données obtenues a été éxécutée grâce au logiciel nCounter® Advanced Analysis Software.

En plus de l'analyse des scores de voies de signalisation entre les différents groupes, la technologie Nanostring permet de faire un profilage du type de cellules immunitaires retrouvées au sein des tumeurs. Les gènes qui se sont avérés caractéristiques de diverses populations cellulaires sont utilisés pour mesurer l'abondance de ces populations (par exemple *CD3* pour les lymphocytes T, *CD19* pour les lymphocytes B, *GZMA* pour les cellules cytotoxiques, …). Ainsi, nous pouvons observer une augmentation de l'infiltration de cellules cytotoxiques, de lymphocytes T, de neutrophiles et de lymphocytes B dans les tumeurs HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL. En revanche, de manière surprenante, nous observons également une hausse de l'infiltration de lymphocytes T CD8+ en état d'épuisement (**Figure 43**).

Dans ces tumeurs, nous avions déjà évalué l'infiltration des cellules immunitaires CD45+ et des principales cellules immunitaires cytotoxiques dans les tumeurs [259]. Nous observions une hausse significative de l'infiltration de cellules NK, CD4+ et T CD8+ vivantes au niveau des tumeurs HIFΔ par rapport aux tumeurs CTRL, ce qui correspond aux résultats observés avec l'analyse Nanostring. En analysant l'expression de CD69 sur les cellules NK et CD8 + ainsi que le niveau d'IFN-γ dans le microenvironnement tumoral, il n'y avait pas d'observation de différence significative concernant l'expression de CD69, mais nous observions une hausse significative de l'IFN-γ pour les tumeurs B16-F10 HIFΔ par rapport aux tumeurs CTRL.

De plus, nous observions une hausse significative des cellules Tregs dans les tumeurs HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL, qui présentaient une diminution significative du marqueur d'activation CD69, mais pas du marqueur d'épuisement PD-1. Nos données suggèrent que l'infiltration accrue de cellules T CD4+ observée dans les tumeurs HIFΔ, pourrait être partiellement liée à une infiltration accrue de cellules Tregs. Néanmoins, nous avions utilisé le marqueur d'épuisement PD-1, tandis que la technologie Nanostring se base sur l'ARN messager de *Ptger4*, *CD244*, *Eomes* et *Lag3* [403] pour déterminer l'état d'épuisement des cellules immunitaires. Ainsi, l'utilisation d'autres marqueurs d'épuisement aurait peut-être pu permettre d'identifier avec précision une population de cellules immunitaires en état d'épuisement dans nos tumeurs HIFΔ.

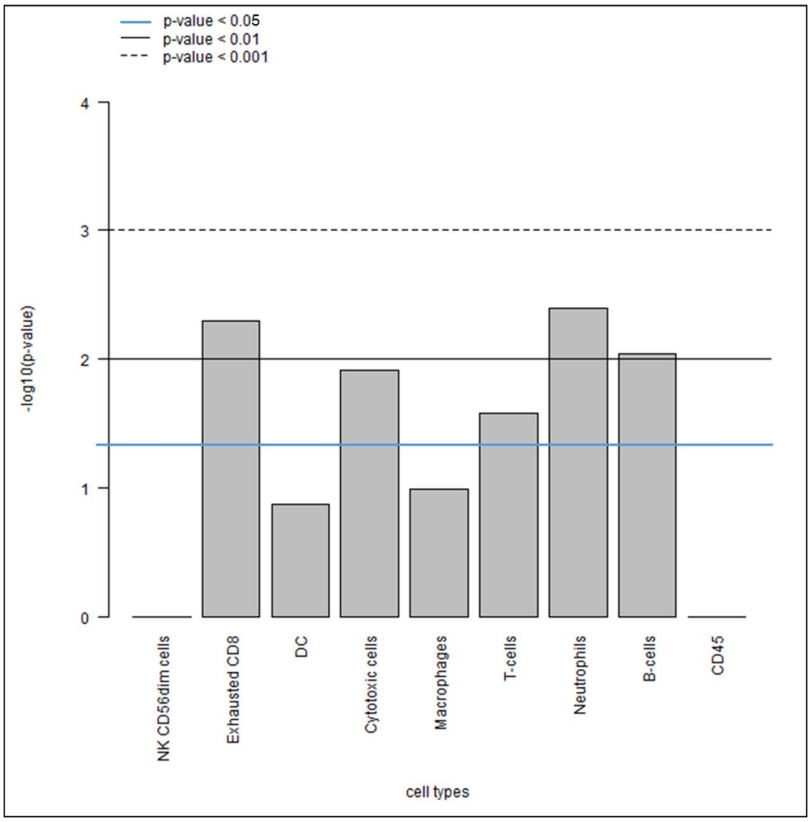


Figure 43 : L'analyse par NanoString des tumeurs B16-F10 montre une présence plus importante de cellules immunitaires effectrices dans les tumeurs HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL.

L'analyse NanoString a été réalisée pour 3 tumeurs de chaque groupe (CTRL et HIFΔ) grâce au panel nCounter® PanCancer IO 360TM. Toutes les données ont été normalisées et soumises à un contrôle de qualité. La barre bleue représente le seul de significativité (p-value < 0,05). L'analyse des données obtenues a été éxécutée grâce au logiciel nCounter® Advanced Analysis Software.

6.2. Analyse des différences transcriptomiques dans les cellules de mélanome délétées en HIF-1α

L'analyse des tumeurs par NanoString a permis d'obtenir une vision globale de l'impact de la délétion de HIF-1α concernant le TME, l'infiltration immunitaire et les voies de signalisation impliquées dans le développement du cancer. En revanche, le fait que beaucoup de voies de signalisation présentées étaient diminuées dans les tumeurs B16-F10 HIFΔ comparé aux tumeurs B16-F10 CTRL, n'a pas réellement permis d'identifier

des voies ou des facteurs de manière précise. De plus, les données obtenues résultent de l'implication de toutes les cellules présentes dans le TME, et pas seulement des cellules tumorales B16-F10 CTRL ou HIFΔ.

Pour ces raisons, un séquençage de nouvelle génération (NGS – *Next-Generation Sequencing*) a été réalisé sur l'ARN des cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ, en normoxie et en hypoxie. Le séquençage a permis de retrouver ou d'identifier différentes voies de signalisation positivement et négativement régulées en hypoxie, notamment la voie de signalisation HIF-1 comme attendu, mais aussi une diminution de l'autophagie et de plusieurs voies impliquées dans le métabolisme (métabolisme central du carbone et métabolisme du fructose et du mannose). Contrairement à l'analyse NanoString, le séquençage a permis d'identifier également une augmentation de certaines voies de signalisation : celles de l'apoptose, de l'interleukine 17, de Notch et de la voie de signalisation des récepteurs Toll-like (**Figure 44A et B**). De plus, le séquençage a permis d'identifier un panel de gènes dont l'expression varie entre les cellules B16-F10 CTRL et les cellules B16-F10 HIFΔ en hypoxie : parmi les gènes dont l'expression est diminuée dans les cellules B16-F10 HIFΔ comparé aux cellules B16-F10 CTRL hypoxiques, nous retrouvons les gènes cibles de HIF-1α, *Ldha*, *Vegfa*, *Ca9*, mais également *Bnip3*, *Pdk1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1)*, *Hk1* et *Hk2*. Parmi les gènes dont l'expression est augmentée, nous retrouvons *Jun*, *Fos*, *Cxcl10*, *Nfkbia*, *Mapk12*, *Notch1* et *Zeb1* (**Figure 44C**).

Bnip3 est un gène pro-apoptotique qui fait partie des 8 gènes dont l'expression est la plus augmentée en hypoxie, ce qui correspond aux résultats observés [68]. L'induction de *Bnip3* et *Bnip3L* par l'hypoxie déstabilise le complexe régulateur de l'autophagie Bcl-2/Beclin 1, et induit donc l'autophagie et une résistance des cellules cancéreuses aux différents traitements [164-166].

Pdk1 est une kinase jouant une fonction clé dans le métabolisme, et l'homéostasie du glucose et des acides gras par la phosphorylation de sous-unités de la pyruvate déshydrogénase. HIF-1α supprime aussi activement le métabolisme par le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) en transactivant directement *Pdk1*. PDK1 inactive l'enzyme du cycle TCA, la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui convertit le pyruvate en acétyl-CoA. Cela

permet de maintenir la production d'ATP et empêcher la production de ROS toxiques [404]. La diminution de *Pdk1* observée dans les tumeurs HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL est donc en adéquation avec les données de la littérature.

Les hexokinases 1 et 2 (Hk1 et Hk2) sont également impliquées dans le métabolisme ; elles phosphorylent le glucose pour produire du glucose-6-phosphate, première étape de la plupart des voies du métabolisme du glucose. Leur expression est augmentée en hypoxie, et impliquée dans la migration cellulaire et la tumorigenèse *via* les axes NR2F1-AS1/miR-140/HK2 et miR-487a/HIF-1α/HK2 [405, 406]. Il n'est donc pas surprenant de voir leur expression diminuer dans les cellules HIFΔ comparé aux cellules contrôles.

JUN est un facteur de transcription qui s'hétérodimérise avec des protéines faisant partie de la famille FOS afin de former un complexe de transcription AP-1, renforçant ainsi son activité transcriptionnelle. *Jun* et *Fos* sont des proto-oncogènes qui jouent un rôle dans la mort cellulaire induite par l'activation des cellules T en se liant au site promoteur AP-1 de FASLG/CD95L et en induisant sa transcription en réponse à l'activation de la voie de signalisation TCR/CD3 [407]. Les facteurs Jun et Fos sont libérés par la voie MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK). Cette voie intervient au niveau de nombreux processus. MAPK12 est une sérine/thréonine kinase qui agit comme un composant essentiel de la voie de transduction MAPK. MAPK12 est l'une des quatre MAPK qui interviennent dans les cascades de réponses cellulaires évoquées par des stimuli extracellulaires (par exemple les cytokines pro-inflammatoires ou le stress physique). En conséquence, les MAPK phosphorylent une large gamme de protéines et on estime qu'elles peuvent avoir environ 200 à 300 substrats chacune [408, 409]; il est donc difficile de conclure sur l'augmentation de ces facteurs dans les tumeurs HIFΔ sans expériences supplémentaires pour déterminer leur impact dans notre modèle.

CXCL10 est une cytokine pro-inflammatoire ayant un rôle dans une grande variété de processus : chimiotactisme, différenciation ainsi qu'activation des cellules immunitaires périphériques, régulation de la croissance cellulaire, apoptose et modulation des effets angiostatiques [410-412]. Le promoteur de *Cxcl10* contient des motifs HRE. En hypoxie, CXCL10 est augmenté dans les carcinomes hépatocellulaires, mais diminué

pour le cancer du col de l'utérus, du sein, de l'ovaire, du colon, et du poumon [297]. De plus, CXCL10 est un ligand de ACKR2 [413], ce qui pourrait expliquer son augmentation dans les cellules HIFΔ où ACKR2 est moins exprimé comparé aux cellules CTRL, et ce qui corrobore avec nos résultats précédents obtenus avec le cytokine array (**Figure 33**).

Nfkbia code pour un membre inhibiteur de la famille NFκB. Il inhibe l'activité des complexes NFκB/REL dimériques en piégeant les dimères REL (RELA/p65 et NFKB1/p50) dans le cytoplasme en masquant leurs NLS [414]. Il a été montré que l'hypoxie peut favoriser la prolifération des CSCs en activant des voies telles que celle de NFκB [121], et impacter la prolifération et la survie cellulaire en régulant de nombreux gènes anti-apoptotiques, tels que *Bcl-2*, *p53* et *NFκB* [160-162]. Ainsi, il n'est pas surprenant d'observer la hausse d'un inhibiteur de la voie NFκB dans les cellules HIFΔ comparé aux cellules CTRL.

Comme mentionné précédemment, l'hypoxie peut également renforcer le caractère souche des cellules cancéreuses du pancréas et leur résistance thérapeutique en activant la cascade de signalisation AKT/Notch1 [116]. *Notch1* est l'un des quatre gènes connus codant pour la famille des protéines NOTCH. La voie de signalisation Notch intervient dans des processus liés à la spécification du destin cellulaire, à la différenciation, à la prolifération et à la survie. L'activation de Notch est corrélée à la tumorigenèse mammaire chez la souris et une expression accrue des récepteurs Notch a été observée dans divers types de cancer, notamment le cancer du col de l'utérus, du colon, de la tête et du cou, du poumon, du rein, du pancréas, de la leucémie et du cancer du sein [415, 416]. En revanche, la fonction biologique de cette voie dépend essentiellement du contexte, et peut aussi avoir une fonction suppressive de tumeur à cause de son rôle dans la croissance et la survie cellulaire [417]. Ainsi, il est tout à fait possible que la hausse de *Notch1* remarquée dans nos cellules HIFΔ comparé aux cellules CTRL soit plutôt à vocation anti-tumorale.

Enfin, les facteurs HIFs ont une fonction dans la régulation de l'EMT par surexpression de gènes ayant une fonction dans la diminution d'expression d'E-cadhérine, permettant la perte des marqueurs épithéliaux. Ces gènes sont *SNAIL (Snail Family Transcriptional Repressor 1)*, *TWIST*, *ZEB1 et ZEB2 [131-135]*. *ZEB1* est

directement induit par HIF-1α et est associé à une hausse de l'agressivité des cancers, la formation de métastases et la reprogrammation métabolique [418-420]. Il est donc plutôt inattendu de voir son expression augmenter dans les cellules HIFΔ comparé aux cellules CTRL. En revanche, l'hypoxie n'est pas le seul régulateur de l'expression de *Zeb1* – par exemple, PRMT1 (*protein arginine methyltransferase 1*) induit l'EMT en contrôlant l'expression de *ZEB1* via la modification H4R3me2as au niveau de son promoteur dans les cancers du sein [421]. Nous pouvons imaginer que les cellules HIFΔ puissent contourner le défaut d'activité transcriptionnelle de HIF-1α en modulant d'autres gènes intervenant dans l'EMT pour promouvoir la progression tumorale.

L'implication exacte de ces gènes et leurs mécanismes de régulation par HIF-1α dans nos modèles reste à approfondir, mais cette étude permet ainsi d'avoir une vue d'ensemble sur l'impact de la délétion de HIF-1α dans la progression tumorale du mélanome.

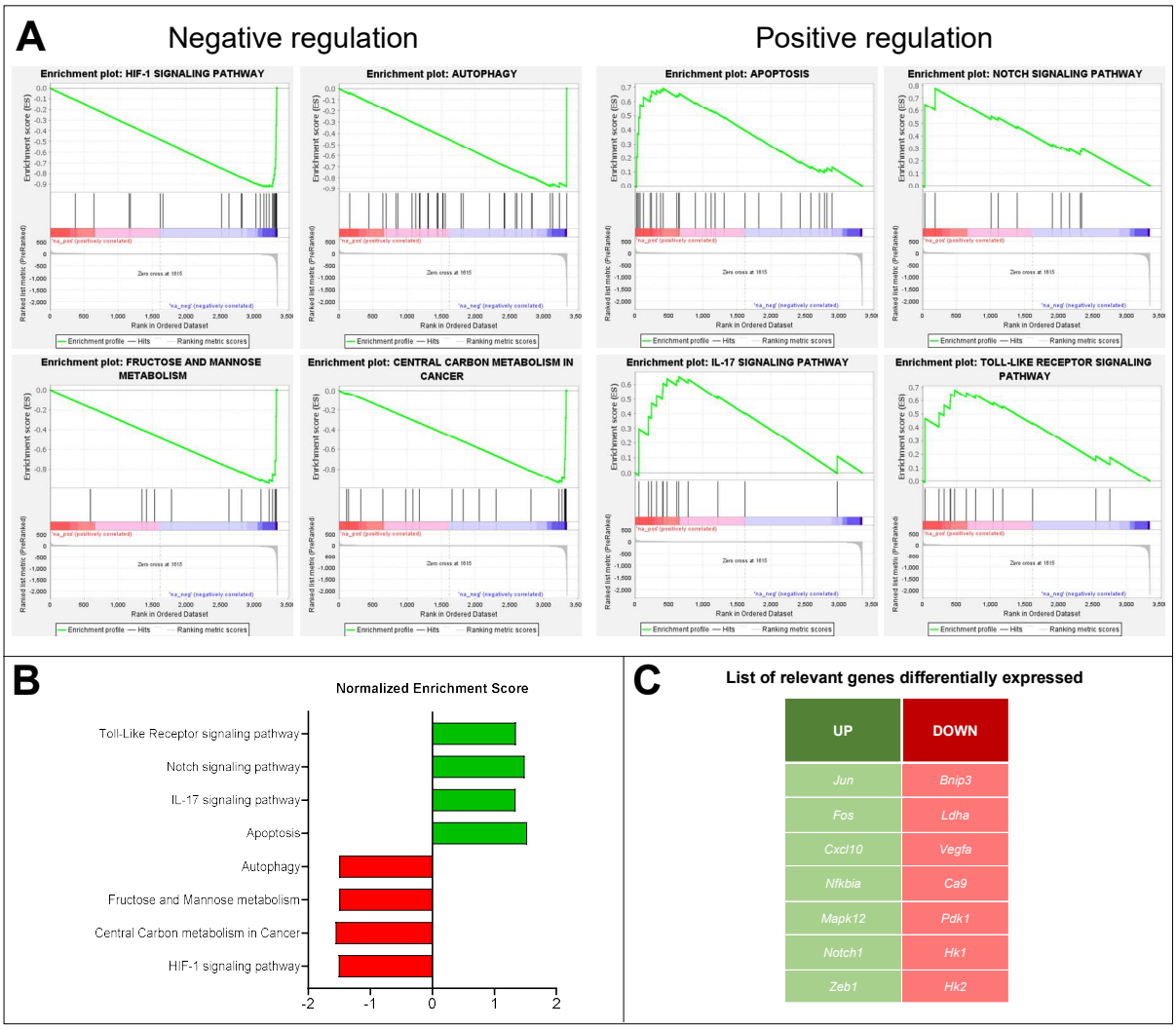


Figure 44 : Le séquençage de nouvelle génération de l'ARN des cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ en hypoxie a permis de préciser des voies de signalisation et des gènes clés impliqués dans la signalisation médiée par HIF-1α en hypoxie.

*(**A**) Diagramme d'enrichissement des principales voies de signalisation positivement et négativement régulées dans les cellules B16-F10 HIFΔ comparé aux cellules B16-F10 CTRL en hypoxie. (**B**) Graphique représentant le score d'enrichissement normalisé des principales voies de signalisation positivement et négativement régulées dans les cellules B16-F10 HIFΔ comparé aux cellules B16-F10 CTRL hypoxiques. (**C**) Tableau représentant les principaux gènes positivement et négativement régulés dans les cellules B16-F10 HIFΔ comparé aux cellules B16-F10 CTRL en hypoxie. Le séquençage a été réalisé sur trois échantillons par groupe provenant d'expériences indépendantes, et a été analysé grâce au logiciel Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Seuls les résultats significatifs sont représentés.*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. La surexpression de ACKR2 en hypoxie

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'étudier la régulation de ACKR2 et de démontrer l'implication directe de l'hypoxie, notamment du facteur HIF-1α, dans sa régulation.

Pour répondre à cet objectif, les promoteurs murins et humains de *ACKR2* ont été étudiés concernant la recherche d'éléments de réponse à l'hypoxie. Les outils JASPAR et MCAST ont permis d'identifier plusieurs motifs HRE, à la fois dans le promoteur murin et le promoteur humain de *ACKR2*, suggérant que l'hétérodimère HIF-1α/HIF-1β aurait la capacité de se lier sur le promoteur du gène. En outre, l'étude de l'expression de ACKR2 par les cellules de mélanome murin B16-F10, les cellules de cancer colorectal CT26 et les cellules de cancer du sein triple négatif 4T1 a montré qu'en hypoxie, ACKR2 est surexprimé au niveau protéique et transcriptionnel, comparé aux conditions normoxiques. Ces résultats ont été confirmés pour des lignées cancéreuses humaines homologues, A-375, Caco-2 et MDA-MB-468.

Ces résultats permettent de valider que l'expression de ACKR2 est plus élevée dans des conditions hypoxiques, à la fois au niveau protéique et transcriptionnel pour différents types de modèles de cellules cancéreuses, à la fois murines et humaines : des cellules de mélanome, de cancer colorectal et de TNBC. Comme mentionné précédemment, dans ces types de cancers, l'hypoxie est associée à la progression cancéreuse et à la résistance aux traitements contre le cancer. Ces résultats montrent que non seulement ACKR2 est surexprimé en hypoxie, mais de plus, cette observation n'est pas limitée à une espèce, ni à un seul type de cancer. En revanche, aucune différence n'a été observée concernant l'expression de ACKR2 en hypoxie par les cellules YUMM 1.7 et HCT116 (*data not shown*). Cela pourrait s'expliquer par le profil mutationnel des différentes lignées : par exemple, les cellules Caco-2 ne présentent pas de mutations

connues dans la voie PI3K-AKT-mTOR ou la voie RAS-RAF-MAPK, tandis que les cellules HCT116 arborent des mutations sur PI3K et KRAS [422]. YUMM1.7 est une lignée cellulaire de mélanome non immunogène dérivée de souris immunocompétentes génétiquement modifiées pour développer un mélanome par le biais de facteurs connus, notamment l'activation de BRAF, la perte de PTEN et la perte de CDKN2a, ce qui n'est pas le cas des cellules B16-F10 qui présentent un phénotype *wild-type* pour ces facteurs [423]. Dans la littérature, il a déjà été montré que ACKR2 est régulé à la baisse par l'oncogène K-ras chez des souris atteintes de cancer du poumon [424]. La régulation de ACKR2 par la voie KRAS/BRAF/ERK a également été démontrée dans le syndrome de Kaposi, ce qui permettait d'augmenter l'infiltration de macrophages et de ce fait, l'agressivité du cancer [335]. Ainsi, le profil mutationnel des différentes lignées, notamment au niveau de KRAS/BRAF pourrait être relevant dans la régulation de ACKR2, et cette hypothèse devrait être approfondie.

Ensuite, pour comprendre l'implication du facteur HIF-1α dans la régulation de ACKR2 en hypoxie, des cellules de TNBC 4T1 et des cellules de mélanome B16-F10 présentant une délétion de HIF-1α ont été étudiées. Les résultats montrent qu'en hypoxie, la délétion de HIF-1α entraîne une diminution de ACKR2 au niveau protéique et transcriptionnel dans les deux modèles, comparé aux cellules contrôles hypoxiques. Ensemble, ces résultats montrent que dans deux modèles cellulaires murins de types de cancers différents, la suppression de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α induit une baisse de l'expression de ACKR2 en hypoxie. Ces résultats renforcent l'hypothèse que HIF-1α pourrait être un régulateur de ACKR2 en hypoxie.

En revanche, dans les deux modèles, nous observions une hausse significative de la protéine pour les cellules HIFΔ entre hypoxie et normoxie ; cette augmentation n'était pas retrouvée au niveau de l'ARN messager de *Ackr2* dans ces conditions, ce qui supposerait plutôt un mécanisme post-traductionnel (phosphorylation, glycosylation, acétylation, stimulation par liaison de ligands…). En effet, il a été montré que le récepteur ACKR2 possède trois sites de N-glycosylation [425] et que des modifications de glycosylation sont retrouvées dans certains cancers et peuvent contribuer à leur développement [426]. Par exemple, la N-glycolysation du récepteur VEGFR peut réguler

son activation et la signalisation dépendante du récepteur dans les cellules endothéliales du TME [427]. De la même façon, EGFR qui est un récepteur à tyrosine kinase comme VEGFR, possède 13 sites de N-glycosylation ; des études antérieures ont indiqué qu'une glycosylation aberrante de EGFR pouvait affecter la conformation du domaine extracellulaire du récepteur, ce qui entraîne une activation anormale et impacte la croissance, la prolifération, la migration et le métabolisme des cellules cancéreuses [428]. De plus, il a été montré que l'hypoxie régule la N-glycosylation de certaines protéines transmembranaires, par exemple EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*) dans des cellules de cancer du sein, ce qui induisait l'EMT [429].

2. L'aspect fonctionnel de la régulation de ACKR2 en hypoxie

Pour étudier l'impact fonctionnel de l'augmentation de ACKR2 en hypoxie, la présence de l'une des chimiokines pro-inflammatoires majeures et ligand de ACKR2 a été étudiée : CCL5. Il est montré qu'en hypoxie, une diminution significative de CCL5 est observée dans le surnageant des cellules CT26 et B16-F10. De plus, lorsque les cellules CT26 ont été traitées avec un anticorps bloquant la partie N-terminale de ACKR2, le niveau de CCL5 augmentait à nouveau, ce qui suppose l'implication de ACKR2 dans le niveau de CCL5. En revanche, bien que le *scavenging* de CCL5 et d'autres chimiokines CC- pro-inflammatoires par ACKR2 soit connu [379, 380], l'ajout de CCL5 exogène marqué aurait permis de déterminer avec certitude que la liaison de CCL5 par ACKR2 était inhibée par notre anticorps bloquant. Par exemple, dans une étude, des chercheurs ont utilisés du CCL2 couplés avec un radio-isotope de l'iode (^{125}I) pour déterminer sa liaison et son internalisation par ACKR2. Après avoir incubé les cellules avec du ^{125}I-CCL2, les cellules ont été lavées et chauffées à 37°C pendant des intervalles de temps croissants pour permettre l'endocytose. À la fin des périodes d'incubation, les cellules ont été culottées, le surnageant a été recueilli et le culot cellulaire a été lavé à l'acide pour distinguer le radio-ligand intracellulaire du radio-ligand membranaire [379]. Dans une autre étude, des cellules surexprimant ACKR2 ont été incubées avec du CXCL10 couplé

à la molécule fluorescence Cy5 (CXCL10-Cy5). L'analyse par cytométrie en flux permet de quantifier la liaison du ligand grâce à l'intensité moyenne de fluorescence [304]. L'utilisation du CXCL10-Cy5 a également permis de déterminer le « *scavenging »* de CXCL10 par ACKR2 par cytomètre de flux ImageStream MKII, qui permet de combiner la cytométrie en flux avec l'imagerie [304].

Pour les cellules B16-F10, l'augmentation de ACKR2 était associée à une diminution de CCL5 en normoxie et en hypoxie, à la fois pour les cellules CTRL et les cellules HIFΔ. En contrepartie, pour les 4T1, nous n'avions pas observé de différence significative sur le niveau de CCL5 entre les cellules CTRL et HIFΔ, en normoxie et en hypoxie. L'absence de différence sur le niveau de CCL5 dans le surnageant des cellules 4T1 peut s'expliquer par le fait que ce modèle cellulaire secrète peu de CCL5 ; en effet, une étude portant sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire par celles-ci montre que ces cellules sécrètent principalement et à forte concentration du CCL2 [430]. ACKR2 étant également capable de lier et dépléter la chimiokine CCL2 [379], il serait pertinent de déterminer le niveau de CCL2 dans le surnageant de nos cellules 4T1 CTRL et HIFΔ en normoxie et en hypoxie.

En plus de la régulation de CCL5, la surexpression de ACKR2 dans les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ semble mener à une diminution d'un panel de chimiokines pro-inflammatoires impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale, telles que CCL2, CCL3, CCL4, CCL22, et CX3CL1. Ce résultat était attendu de par la nature du récepteur et de son rôle connu dans la liaison de chimiokines pro-inflammatoires. CXCL10 était également diminué dans le surnageant des cellules B16F10 HIFΔ-ACKR2 comparé aux clones HIFΔ-GFP, mais pas dans le surnageant des clones B16F10 CTRL-ACKR2 comparé aux clones B16-F10 CTRL-GFP. Cela pourrait s'expliquer par le fait que ACKR2 a moins d'affinité pour CXCL10 que pour les autres chimiokines [304]. Néanmoins, pour augmenter la robustesse de cette expérience, il serait nécessaire de la répéter pour obtenir trois réplicats biologiques et expérimentaux, et/ou de quantifier chaque chimiokine par ELISA sur trois expériences indépendantes pour conclure.

En revanche, la quantification de CCL5 dans les surnageants de ces cellules en normoxie et en hypoxie montre que la capacité de « *scavenging* » de chimiokines de

ACKR2 n'est pas impactée dans nos modèles. De plus, en hypoxie, nous n'observons aucune différence significative sur le niveau de CCL5 dans le surnageant des cellules B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2. En outre, nous observons une baisse significative de CCL5 concernant les clones B16-F10 CTRL-GFP et HIFΔ-GFP entre les conditions normoxiques et hypoxiques, ce qui n'est plus le cas pour les clones CTRL-ACKR2 et HIFΔ-ACKR2 entre normoxie et hypoxie. Cela suggère que la surexpression de ACKR2 a le même impact sur le niveau de CCL5 que l'induction de conditions hypoxiques, et renforce nos résultats précédents montrant une corrélation entre l'expression de ACKR2 augmentée en hypoxie et la baisse de la quantité de CCL5 dans le surnageant des cellules de mélanome.

3. L'expression de ACKR2 au niveau des tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ

L'implication de l'hypoxie au niveau de la régulation de ACKR2 a été confirmée *in vivo* sur des tumeurs de souris B16-F10 contrôles (CTRL) ou présentant une délétion de HIF-1α (HIFΔ). Les constats observés étaient similaires, avec une diminution significative de la protéine et de l'ARN messager de ACKR2 dans les tumeurs HIFΔ, comparé aux tumeurs CTRL. De plus, cette diminution était associée à une augmentation significative de CCL5 dans les tumeurs. Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus avec ceux de tumeurs issues de nos clones B16-F10 CTRL et HIFΔ surexprimant ACKR2. Nous pouvons supposer que pour les tumeurs de souris injectées avec des cellules B16-F10 HIFΔ surexprimant ACKR2, nous observerions un retour au phénotype observé pour les tumeurs B16-F10 CTRL, avec à nouveau une diminution de CCL5. Il serait également intéressant d'observer l'impact de la surexpression de ACKR2 sur le paysage immunitaire des tumeurs B16-F10. Dans notre modèle, nous observions une augmentation de l'infiltration immunitaire dans nos tumeurs B16-F10 HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL, confirmée par l'analyse Nanostring, et une réponse plus efficace à l'immunothérapie anti-PD-1 [259]. Nous pouvons imaginer qu'avec sa fonction de régulateur du réseau de

chimiokines pro-inflammatoires, et du rôle des chimiokines pro-inflammatoires dans l'attractivité des cellules immunitaires dans le TME, la surexpression de ACKR2 dans ces tumeurs participerait au rétablissement d'un TME immunosuppresseur et altérerait à nouveau la réponse au traitement par immunothérapie.

De plus, puisque ACKR2 est exprimé en majorité par les cellules endothéliales [431] et que l'hypoxie a un impact majeur sur l'angiogenèse tumorale [432], il serait également intéressant d'analyser l'expression de ACKR2 au niveau des cellules endothéliales de nos tumeurs B16-F10 CTRL et HIFΔ. Nous avions observé une augmentation du marquage de CD31 et une irrégularité du marquage de α-SMA dans les tumeurs HIFΔ comparé aux tumeurs CTRL [433]. Nous pouvons conjecturer que l'expression de ACKR2 soit importante au niveau des vaisseaux sanguins dans les tumeurs CTRL, qui sont certes moins nombreux, mais semblent être plus réguliers et de meilleure qualité, empêchant ainsi l'infiltration des cellules tumorales. De ce fait, dans les tumeurs HIFΔ, il y aurait certes plus de vaisseaux sanguins, mais de moins bonne qualité et peut-être moins fonctionnels, ce qui ne permettrait pas l'expression de ACKR2 mais permettrait ainsi l'infiltration immunitaire. Il serait intéressant de faire un co-marquage de CD31 et de ACKR2 par immunohistochimie sur ces coupes de tumeurs pour déterminer si les cellules endothéliales de ces vaisseaux expriment en effet ACKR2 dans les tumeurs CTRL et HIFΔ. Nous pourrions aussi réaliser un marquage immunohistochimique au pimonidazole sur ces tumeurs. Le pimonidazole est activé de manière réductrice spécifiquement dans les cellules hypoxiques et forme des adduits stables avec les groupes thiols des protéines, des peptides et des acides aminés. En outre, la quantité de pimonidazole détectée est directement proportionnelle au niveau d'hypoxie dans les tumeurs [434]. Cela nous permettrait ainsi d'établir un lien potentiel entre l'intensité de marquage ACKR2 et le niveau d'hypoxie au sein de nos tumeurs.

4. La régulation directe de ACKR2 par HIF-1α en hypoxie

Après avoir démontré l'implication de l'hypoxie dans la régulation de ACKR2 dans des modèles cellulaires et tumoraux, il restait à déterminer si cette régulation est directement dépendante de HIF-1α, ou si elle fait intervenir d'autres intermédiaires en amont. Pour répondre à cette question, les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ hypoxiques furent analysées par immunoprécipitation de chromatine-qPCR (ChIP-qPCR), avec un anticorps anti-HIF-1α. La ChIP est une technique qui permet de déterminer si une protéine donnée (ici HIF-1α), se lie à un fragment précis d'ADN (ici les motifs HRE du promoteur de *Ackr2*). L'expérience de ChIP-qPCR sur les cellules B16-F10 CTRL et HIFΔ en hypoxie a montré que HIF-1α est effectivement à même de se lier sur le promoteur de *Ackr2*, ce qui répond à l'hypothèse de ce travail de thèse. Il semblerait qu'il se lie de manière plus significative sur le deuxième motif HRE que sur le premier. Cette découverte est importante puisque c'est la première fois que HIF-1α est montré comme régulateur direct de récepteurs de chimiokines atypiques. La présence de motifs HRE dans les promoteurs de récepteurs de chimiokines conventionnels et la régulation de ceux-ci par l'hypoxie sont bien décrites dans le contexte tumoral [296, 297], ce qui n'est pas le cas pour les ACKRs, malgré quelques éléments suggérant une possible régulation de ACKR3 et ACKR4 par l'hypoxie [369-371]. Cet élément s'ajoute aux multiples rôles de HIF-1α dans la progression tumorale et pourrait expliquer en partie l'exclusion immunitaire retrouvée dans les tumeurs fortement hypoxiques chez les patients présentant une résistance aux traitements anti-cancéreux, notamment l'immunothérapie par blocage des points de contrôle immunitaires.

En revanche, pour montrer l'activité transcriptionnelle de HIF-1α sur ACKR2, il serait intéressant de réaliser un test luciférase. Le test de la luciférase est utilisé pour déterminer si une protéine peut activer ou réprimer l'expression d'un gène cible. Il aide à déterminer le lien fonctionnel entre la protéine et la quantité de produit génique qui est produite, contrairement à la ChIP, qui évalue uniquement la capacité d'une protéine à interagir avec une région de l'ADN. Ce test ne permet pas de déterminer si la protéine interagit directement avec l'ADN lui-même ; la protéine pourrait affecter indirectement la

transcription en activant ou en réprimant une protéine distincte ou un complexe protéique qui affecte la transcription. La luciférase est une enzyme utilisée pour la bioluminescence par divers organismes dans la nature, le plus connu étant la luciole. Il s'agit de produire une construction dans laquelle la région régulatrice d'un gène cible (ici, un motif HRE du promoteur de *Ackr2*) est fusionnée avec la séquence d'ADN codant pour la luciférase. Une autre construction d'ADN code la protéine supposée affecter la transcription (ici HIF-1α). Les cellules sont ensuite transfectées avec les deux constructions. Si la protéine HIF-1α est capable d'augmenter la transcription du gène cible *Ackr2*, les cellules exprimeront la luciférase. Si la protéine régule la transcription à la baisse, les cellules exprimeront moins de luciférase que la normale. L'expérience devrait être répétée trois fois de manière indépendante et avec différentes conditions expérimentales : (1) en normoxie où la présence de la protéine HIF-1α est moindre, (2) en hypoxie où la protéine HIF-1α est stabilisée et (3) avec une mutation sur la séquence régulatrice de l'expression de la luciférase (ici la séquence du promoteur de *Ackr2* contenant le motif HRE) de manière à ce que la protéine ne puisse plus se lier. Les cellules B16-F10 HIFΔ pourraient également être transfectées en parallèle pour servir de contrôle négatif additionnel.

En revanche, l'étude d'autres facteurs pouvant intervenir dans la régulation de ACKR2, notamment la facteur HIF-2α et le stress nutrionnel induisant la voie de l'autophagie, n'a pas montré de résultats concluants sur les cellules CT26. Néanmoins, il serait pertinent de répéter cette expérience sur nos autres lignées cellulaires, notamment les 4T1 et les B16-F10 CTRL et HIFΔ, pour déterminer si HIF-2α et l'autophagie n'interviennent également pas dans la régulation dans ces modèles, ou si cela est limité aux cellules CT26.

5. L'expression de ACKR2 chez les patients atteints de TNBC et les patients de cohortes TCGA

Pour évaluer l'aspect translationnel du projet, des échantillons ARN de tumeurs de TNBC provenant de patients ont été analysés par RT-qPCR pour déterminer la corrélation entre l'expression de *ACKR2* et l'expression de gènes retrouvés dans la signature hypoxique : *VEGFA* et *CA9.* Sur ces échantillons, nous pouvions en effet observer une corrélation positive et significative entre l'expression de *ACKR2* et de *CA9*, mais pas avec *VEGFA.* Cela est d'autant plus important que *CA9* et son expression sont corrélés de manière positive avec la taille des tumeurs, le grade, l'absence d'expression du récepteur des oestrogènes et la résistance à la chimiothérapie chez les patients atteints de TNBC [397].

Nous avons également déterminé la corrélation de l'expression de *ACKR2* avec d'autres gènes impliqués dans la signature hypoxique dans d'autres types de cancers de la base de données TCGA, grâce à l'outil *TIMER2.0*. Pour les patients atteints de mélanome cutané (SKCM), nous observions une corrélation positive significative entre *ACKR2* et *CA9*, *NDRG1* ainsi que *SLC2A1* dans les tumeurs primaires. Concernant les patients présentant un carcinome invasif du sein (BRCA), nous observions une corrélation positive significative entre *ACKR2* et *HIF1A*, *P4HA1*, *VEGFA* ainsi que *VHL.* Il est également pertinent de noter que parmi les gènes inclus dans la signature hypoxique, la corrélation entre *HIF1A* et *ACKR2* est retrouvée au niveau de 16 types de cancers sur les 33 analysés, et pour *VHL* et *ACKR2*, elle est retrouvée dans 21 des 33 types de cancers analysés. Ces résultats fortifient l'implication de l'hypoxie au niveau la régulation de ACKR2, *in vitro*, dans des modèles murins, et également dans des larges cohortes de patients présentant des types de cancers variés.

En outre, pour les patients atteints de cancers du sein invasifs (regroupant luminal A, luminal B, Her2-positif et basal), l'expression de *ACKR2* était associée à une baisse de l'infiltration de cellules immunitaires effectrices (lymphocytes T CD4+ Th1 et Th2, lymphocytes T CD8+ et cellules NK), et une augmentation de cellules immunitaires

immunosuppressives (Tregs). Le constat était similaire pour les patients atteints de mélanome cutané, où l'expression de *ACKR2* était également associée à une infiltration de cellules immunitaires effectrices diminuée (lymphocytes T CD4+ Th1 et Th2, et lymphocytes T CD8+), et une augmentation de cellules immunitaires immunosuppressives (Tregs et CAFs).

Ces résultats vont dans le sens de notre théorie sur l'impact de l'expression de ACKR2 sur l'infiltration immunitaire des tumeurs hypoxiques. Nous pensons que dans les tumeurs hypoxiques, ACKR2 est induit par HIF-1α, ce qui entraîne une diminution des chimiokines pro-inflammatoires présentes dans le TME, et donc une diminution de l'infiltration immunitaire. Il serait judicieux de comparer ces résultats avec une expérience *in vivo* comprenant quatre groupes : B16-F10 CTRL-GFP, CTRL-ACKR2, HIFΔ-GFP et HIFΔ-ACKR2. Nous savons déjà que la délétion de HIF-1α engendre une baisse de ACKR2, une hausse de CCL5 et une infiltration immunitaire plus élevée comparé aux tumeurs CTRL [259]. En théorie, nous devrions observer une diminution de CCL5 et de l'infiltration de cellules immunitaires dans les tumeurs CTRL-ACKR2 et HIFΔ-ACKR2 comparé aux tumeurs CTRL-GFP et HIFΔ-GFP.

6. La dualité des ACKRs dans la progression tumorale

Notre étude s'est portée sur la régulation de ACKR2 par l'hypoxie dans des modèles cellulaires et un modèle de tumeurs de mélanome murines, et semble montrer un mécanisme commun et universel aux différents types de cancers. Cependant, l'étude de la fonction des ACKRs dans les différents processus tumoraux a montré des divergences entre une régulation à vocation pro- et anti-tumorale en fonction du contexte tumoral, du type de cancer, et du type de cellules exprimant les récepteurs.

Concernant ACKR2, dans le syndrome de Kaposi, son expression était diminuée par la voie K-ras/B-raf/ERK, ce qui menait à une accumulation de TAMs [435]. De même pour le cancer de la thyroïde, où *ACKR2* a été identifié comme gène cible du micro-ARN miR-146a. En effet, chez les patients présentant un carcinome anaplasique de la thyroïde,

l'expression de ACKR2 était régulée négativement par le biais de l'activité du miR-146a, afin de soutenir le trafic des leucocytes dans le TME [436]. Pour le mélanome uvéal et le carcinome hépatocellulaire du foie, une analyse de la base de données TCGA a associé l'expression de *ACKR2* à une survie sans progression (*PFS – Progression Free Survival*) et une survie globale (*OS – Overall Survival*) favorables [437]. Ainsi, dans ces modèles, la régulation de ACKR2 semblait avoir plutôt un rôle protecteur et anti-tumoral.

Cependant, dans d'autres études, il a été montré que le ciblage génétique de *Ackr2* entraînait une augmentation de récepteurs de chimiokines inflammatoires. Cela était associé à une libération de neutrophiles ayant une activité anti-métastatique accrue chez des souris transplantées orthotopiquement avec un carcinome mammaire 4T1, et injectées par voie intraveineuse avec des cellules de mélanome B16-F10 [350]. Chez un autre modèle de souris, un carcinogène appelé 4-nitroquinoline-1-oxide a été injecté pour induire un carcinome épidermoïde, puis leurs langues ont été collectées pour analyser l'expression des ACKRs, de différentes chimiokines et de cytokines. Les résultats ont montré que seule l'expression de ACKR2, et non des autres ACKRs, était significativement augmentée dans les lésions cancéreuses des souris traitées. De plus, l'inhibition de ACKR2 dans ces souris induisait une augmentation de CCL2, IL-6 et IL-17, suggérant que ACKR2 régule l'inflammation dans le TME [438].

Enfin, ACKR2 a été décrit comme impliqué dans l'EMT et le processus métastatique *via* CXCL14 [439]. Dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer du sein, la voie CXCL14/ACKR2 était capable de stimuler l'EMT, l'invasion tumorale et le processus métastatique [348]. Toujours pour ce type de cancer, l'expression de ACKR2 est positivement corrélée avec l'infiltration de lymphocytes B, T CD4+, T CD8+, macrophages et neutrophiles [440]. Le même constat a été réalisé pour le cancer des poumons non à petites cellules, dans lequel l'expression de CXCL14 et de ACKR2 sont augmentées d'après les bases de données TCGA. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'en inhibant ACKR2, la migration des cellules tumorales induite par CXCL14 était également inhibée. De plus, les résultats ont établi que ACKR2 avait un rôle dans la régulation de la phospholipase Cβ3 par CXCL14, ainsi que la régulation de c-Src et en conséquence, de NFκB, menant ainsi à l'induction de la migration cellulaire ainsi que

l'EMT [349]. Enfin, une étude a identifié ACKR2 et CCR2 comme des cibles potentielles pour moduler le processus métastatique. Dans cet article, ACKR2 limite l'expression de CCR2 au niveau des cellules NK, ce qui empêche leur activité cytotoxique dans des tumeurs de mélanome B16-F10 [365].

Ces études montrent que la régulation de l'expression de ACKR2 dans divers types de cancers semble présenter une dualité pro- et anti-tumorale en fonction du contexte cancéreux (**Figure 45**). Néanmoins, il est évident que ACKR2 est un régulateur essentiel de l'inflammation et de la réponse immunitaire, et son implication au niveau divers processus tumoraux et divers types de cancers doit être approfondie, notamment l'axe CXCL14/ACKR2 qui pourrait être impliqué dans la formation de métastases dans d'autres types de cancers que celui du sein et du poumon.

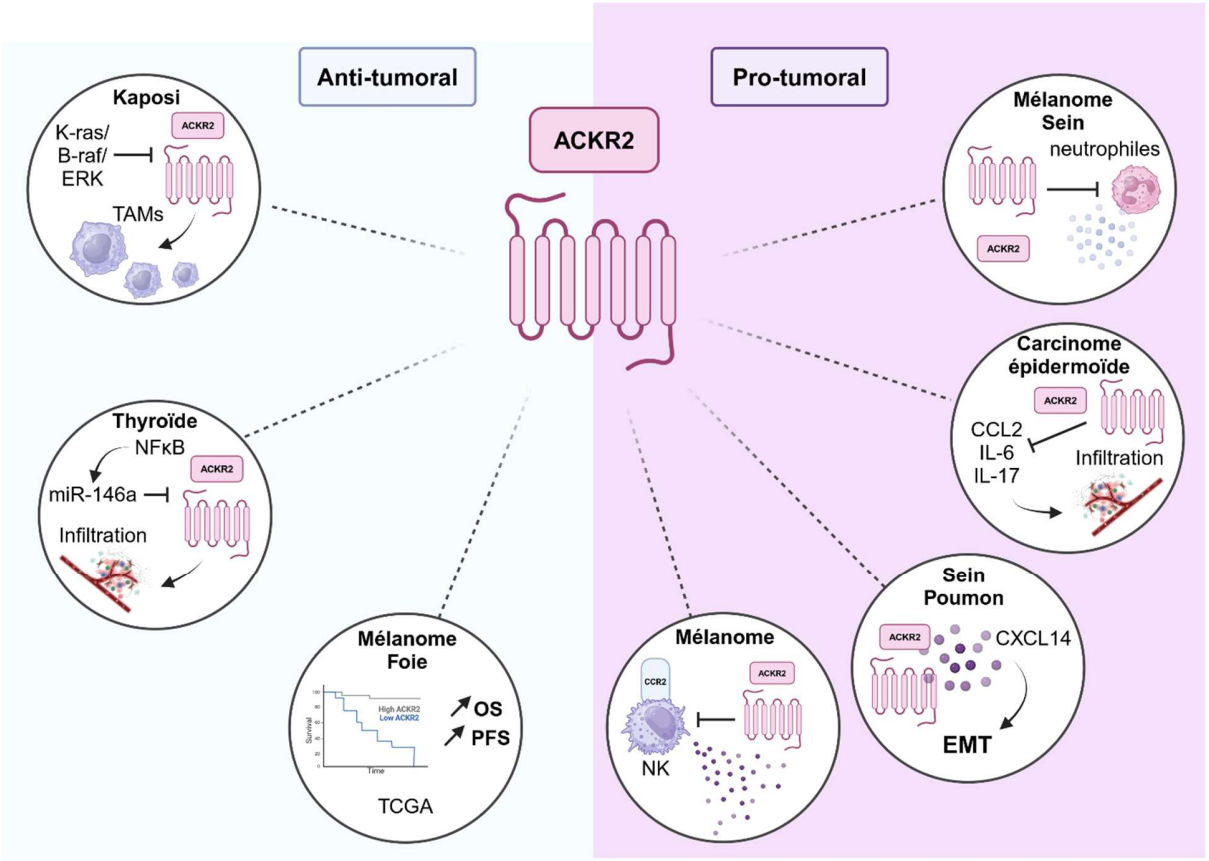


Figure 45 : Schéma décrivant la régulation à vocation anti- et pro-tumorale de ACKR2 dans différents types de cancers selon la littérature.

ACKR2 a été reporté comme étant régulé pour promouvoir une fonction anti-tumorale dans le syndrome de Kaposi, le cancer de la thyroïde, le mélanome et le cancer hépatocellulaire du foie. Il a également été reporté comme étant régulé de manière à promouvoir un rôle pro-tumoral dans le mélanome, le cancer du sein, le carcinome épidermoïde et le cancer du poumon. TAMs = Macrophages associés aux tumeurs ; OS = Overall Survival ; PFS = Progression Free Survival ; EMT = Transition Epithélio-Mésenchymateuse. Figure réalisée grâce à BioRender.

7. La compétition et la dimérisation des récepteurs de chimiokines

Un autre axe à étudier serait la possibilité de régulation entre les différents ACKRs et récepteurs de chimiokines classiques. En effet, ACKR1 et ACKR2 lient des chimiokines inflammatoires, tandis que ACKR3 et ACKR4 lient des chimiokines homéostatiques. De plus, ACKR4 possède la même fonction *scavenger* que ACKR2, et est considéré comme son homologue homéostatique [300] ; il se pourrait donc qu'il existe un système de balance entre les récepteurs, pour favoriser soit l'inflammation, soit l'homéostasie. Il a précédemment été montré que ACKR1 est capable de s'hétéro-oligomériser avec CCR5 pour moduler le flux de calcium intracellulaire et la chimiotaxie [441]. Cela suggère qu'il est tout à fait possible que les autres ACKRs se dimérisent entre eux ou avec d'autres récepteurs de chimiokines classiques, afin de moduler la réponse inflammatoire. Il existe également une compétition entre les ACKRs et les récepteurs de cytokines classiques, puisqu'ils peuvent lier les mêmes chimiokines. Cependant, la complexité de la régulation du réseau de chimiokines/cytokines par ces récepteurs n'est pas encore totalement élucidée. Récemment, de nouveaux ligands ont été découverts pour chaque ACKR : CXCL12 pour ACKR1, CXCL1, CXCL10 et CCL20 avec ACKR2, vCCL2/vMIP-II et PAMP-12 avec ACKR3, et CCL20 et CCL22 avec ACKR4. [413]. De plus, l'émergence de nouveaux récepteurs atypiques [310, 442, 443] montre qu'il reste encore à découvrir sur ces récepteurs, leurs ligands, leurs fonctions et leur relevance clinique.

8. La régulation de ACKR2 : implication de la voie K-ras/B-raf/ERK

Bien que nécessitant plus d'approfondissement, les résultats obtenus lors de ce travail de thèse permettent d'identifier l'implication de HIF-1α et d'exclure l'implication de HIF-2α et de l'autophagie dans la régulation de ACKR2. Dans la littérature, il a déjà été montré que ACKR2 est régulé à la baisse par l'oncogène K-ras chez des souris atteintes de cancer du poumon [424]. La régulation de ACKR2 par cette voie a également été démontrée pour le syndrome de Kaposi, ce qui permettait d'augmenter l'infiltration de macrophages et de ce fait, l'agressivité du cancer [335]. Toujours pour le syndrome de Kaposi, la diminution de l'expression de ACKR2 par la voie K-ras/B-raf/ERK induisait une accumulation de CCL2 dans le TME. L'accumulation de CCL2 induisait un recrutement des monocytes et leur différenciation vers un phénotype M2, qui a un rôle pro-tumoral. De plus, CCL2 induisait une augmentation de la production de VEGFA, promouvant ainsi l'angiogenèse tumorale [435]. Enfin, comme mentionné précédemment, ACKR2 a été identifié comme gène cible du micro-ARN miR-146a dans les cancers de la thyroïde, lui-même régulé par NFκB [436]. En dehors de NFκB et de la voie K-ras/B-raf/ERK, il n'y a à ce jour pas d'autres facteurs ou voies connues pour réguler ACKR2 dans le contexte tumoral. Cependant, étant donné l'implication de ACKR2 dans l'EMT pour les cancers du sein et du poumon [349, 439], l'étude de facteurs impliqués dans l'EMT, tels que ZEB1, ZEB2, SNAIL, TWIST en tant que régulateurs de ACKR2 pourrait être une piste prometteuse.

9. Les stratégies thérapeutiques possibles

Plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant l'hypoxie dans les cancers ont été développées : les inhibiteurs ciblant directement HIF-1α ou différents niveaux de la voie de signalisation de HIF-1α, et les pro-drogues activées en hypoxie.

Parmi les inhibiteurs ciblant directement HIF-1α ou différents niveaux de sa voie de signalisation, nous pouvons par exemple trouver PX-478, qui agit à plusieurs niveaux : il réduit le niveau d'ARN messager de HIF-1α, inhibe sa traduction, et cible sa dégradation par le protéasome. PX-478 inhibe la transcription des gènes cibles de HIF-1α, dont *VEGF* et *GLUT-1*, indépendamment d'autres facteurs tels que VHL [444]. PX-478 a été étudié dans plusieurs essais cliniques et a démontré son efficacité *in vitro* et *in vivo* [445, 446]. Nous pouvons également trouver YC-1, qui est capable d'inactiver HIF-1α au niveau du CTAD ; de ce fait, il empêche le recrutement de co-activateurs tels que p300 [447]. YC-1 est également capable d'agir sur différentes voies de signalisation régulées par HIF-1α : il diminue la prolifération des MDA-MB-468 en ciblant le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) [448], il inhibe la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans des cellules de cancer de la prostate PC-3 [449], il inhibe la prolifération et l'angiogenèse d'un modèle de TNBC en ciblant le récepteur du VEGF (VEGFR) [450] et il permet même de réduire la résistance à la radiothérapie de cellules de carcinome épidermoïde [451]. Un autre exemple de molécules permettant de cibler la fonction de HIF-1α est l'acriflavine, qui empêche l'hétérodimérisation entre HIF-1α et HIF-1β [452]. Par exemple, dans notre modèle, le traitement des tumeurs B16-F10 avec de l'acriflavine a amélioré la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 [259].

Les pro-drogues activées par l'hypoxie sont des composés inactifs qui, une fois dans un tissu hypoxique, vont s'activer et provoquer la mort des cellules hypoxiques. Parmi ces pro-drogues, nous retrouvons notamment TH-302, aussi appelé Evofosfamide. Les effets du TH-302 ont été étudiés en essais cliniques et dans de nombreux modèles cancéreux, par exemple la leucémie [453, 454], le carcinome nasopharyngé [455], le sarcome [456] et le cancer gastrique [457].

Ainsi, le ciblage de HIF-1α a montré des bénéfices anti-tumoraux dans les essais cliniques et *in vitro*. Comme mentionné précédemment, l'un d'entre eux concerne l'augmentation de l'infiltration immunitaire, qui permet d'améliorer la réponse à l'immunothérapie. Cependant, de nombreux inhibiteurs de HIF-1 n'ont pas présenté d'efficacité lors des essais cliniques [458]. Pour améliorer l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de HIF et réduire la résistance aux médicaments et la douleur liée au cancer,

le développement de thérapies combinées pourrait s'avérer nécessaire. Puisque ACKR2 est responsable de la régulation du réseau de chimiokines et ainsi du trafic des cellules immunitaires, nous pensons que les cellules cancéreuses utilisent ACKR2 pour participer à l'exclusion immunitaire au sein du TME et impacter la réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi, nous pouvons imaginer que la combinaison du ciblage de HIF-1α avec le ciblage de ACKR2 permettrait d'autant plus d'augmenter l'infiltration immunitaire intra-tumorale et donc favoriser encore plus la réponse immunitaire contre le cancer. Cela permettrait également d'améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux, notamment l'immunothérapie. Le ciblage seul de ACKR2 pourrait également être une stratégie thérapeutique valable pour les tumeurs auxquelles le ciblage de HIF-1 n'est pas efficace.

A ce jour, l'existence de stratégies thérapeutiques permettant de cibler ACKR2 qui ont été validées et testées en essai clinique n'est pas répertoriée. Cependant, certaines stratégies ont été testées *in vitro* pour moduler ACKR3 : CCX771, une petite molécule synthétisée qui présente une affinité pour ACKR3 [459], a permis d'inhiber la croissance tumorale, le processus métastatique ainsi que l'angiogenèse *in vivo* [370]. L'utilisation de dérivés peptidiques est également possible, comme démontré sur ACKR3 avec le peptide TC14012 [460], mais son potentiel sur la progression tumorale n'a pas été étudié. L'utilisation de modulateurs dérivés de ligands capables de se lier à la partie N-terminale du récepteur a aussi été étudiée et optimisée pour ACKR3, et pourrait présenter un fort potentiel thérapeutique [461]. Enfin, l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de fragments d'anticorps contre ACKR3 a attesté de résultats prometteurs en réduisant la croissance tumorale *in vivo* pour le cancer de la tête et du cou [462]. A ce jour, aucune stratégie thérapeutique n'a été reportée concernant ACKR1, ACKR2 et ACKR4 ; cependant, les études et résultats obtenus sur ACKR3 montrent qu'il existe une réelle opportunité thérapeutique qui mérite d'être approfondie.

CONCLUSION

L'intention de ce travail de thèse était de démontrer la régulation directe de ACKR2 par HIF-1α en hypoxie dans un contexte tumoral. Nous avons montré que les promoteurs murins et humains de *ACKR2* possèdent des motifs HRE, sur lesquels l'hétérodimère HIF-1α/HIF-1β peut se lier pour induire la transcription de gènes cibles. Nous avions ensuite évalué l'expression de ACKR2 par un panel varié de lignées cellulaires murines et humaines, en comparant des conditions normoxiques à des conditions hypoxiques. Nous avons montré que l'expression de ACKR2 est engendrée par des conditions hypoxiques. Cette observation était retrouvée dans des cellules cancéreuses murines et humaines de mélanome, de TNBC et de cancer colorectal.

Nous avons par la suite analysé l'expression de ACKR2 par des cellules de mélanome B16-F10 et des cellules de cancer du sein 4T1 qui présentent une délétion de HIF-1α. Dans ces modèles cellulaires, une baisse de l'expression de ACKR2 était observée au niveau des cellules délétées comparé aux cellules contrôles, montrant ainsi l'implication de HIF-1α dans la régulation de ACKR2 en hypoxie. De plus, dans les tumeurs B16-F10 présentant cette délétion de HIF-1α, l'expression de ACKR2 était également diminuée, ce qui confirme la validité de nos données dans un modèle murin *in vivo*.

Nous avions également confirmé le rôle direct de HIF-1α dans la régulation de ACKR2 en hypoxie dans les cellules B16-F10 grâce à la technique d'immunoprécipitation de chromatine. Cependant, un test luciférase reste nécessaire pour confirmer que la liaison de HIF-1α sur les motifs HRE du promoteur de *Ackr2* observée en immunoprécipitation de chromatine induit bien la transcription du gène. Nous avons cependant exclu la régulation de ACKR2 médiée par HIF-2α et l'autophagie concernant un autre modèle cellulaire, mais cela reste à confirmer et à approfondir pour d'autres lignées.

La diminution de ACKR2 était associée à une augmentation de CCL5 pour les cellules et les tumeurs B16-F10. La surexpression de ACKR2 dans les cellules B16-F10

suggère l'implication d'autres chimiokines, notamment CCL2, CCL3, CCL4, CCL22 et CX3CL1, mais cela reste à confirmer. Cela pourrait aussi dépendre du type de cancer, puisqu'il n'y avait pas de différence significative dans le niveau de CCL5 pour les cellules 4T1 ; il est possible que la chimiokine CCL2 soit plus sécrétée par ce type de cellules et serait celle « *scavengée* » par ACKR2 dans ce modèle.

Nous avons également observé une augmentation de l'infiltration immunitaire dans les tumeurs B16-F10 présentant une délétion de HIF-1α comparé aux tumeurs contrôles. De plus, l'analyse de données TCGA a montré une corrélation positive significative entre l'expression de *ACKR2* et l'infiltration de cellules immunitaires immunosuppressives, et une corrélation négative significative entre l'expression de *ACKR2* et l'infiltration de cellules immunitaires effectrices, chez les patients présentant un mélanome cutané ou un carcinome invasif du sein. En outre, chez ces patients, l'expression de *ACKR2* était également positivement corrélée à l'expression de gènes impliqués dans la signature hypoxique.

Ensemble, ces résultats attestent de la régulation de ACKR2 par l'hypoxie dans un contexte tumoral, et de l'implication directe de HIF-1α dans cette régulation. Basé sur nos données, de nombreuses questions restent en suspens et doivent faire l'objet d'investigations supplémentaires, telles que (i) la vérification de l'activation transcriptionnelle de *Ackr2* par HIF-1α dans notre modèle, (ii) l'impact direct de l'expression de ACKR2 et/ou de son ciblage sur le paysage chimiokinique, l'infiltration immunitaire et la réponse aux thérapies contre le cancer, (iii) l'implication d'autres facteurs au niveau de la régulation de ACKR2 dans le contexte tumoral, (iv) l'implication des autres ACKRs dans notre modèle et (v) la régulation des autres ACKRs par l'hypoxie. Néanmoins, nos données sont encourageantes pour la compréhension de l'exclusion immunitaire dans le TME médiée par l'hypoxie.

REFERENCES

1. Piñeiro Fernández, J., K.A. Luddy, C. Harmon and C. O'Farrelly, *Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function.* International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(17): p. 4131.
2. Lavie, D., A. Ben-Shmuel, N. Erez and R. Scherz-Shouval, *Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era.* Nat Cancer, 2022. **3**(7): p. 793-807.
3. Lujano Olazaba, O., J. Farrow and T. Monkkonen, *Fibroblast heterogeneity and functions: insights from single-cell sequencing in wound healing, breast cancer, ovarian cancer and melanoma.* Front Genet, 2024. **15**: p. 1304853.
4. Alexander, J. and E. Cukierman, *Stromal dynamic reciprocity in cancer: intricacies of fibroblastic-ECM interactions.* Curr Opin Cell Biol, 2016. **42**: p. 80-93.
5. Ozga, A.J., M.T. Chow and A.D. Luster, *Chemokines and the immune response to cancer.* Immunity, 2021. **54**(5): p. 859-874.
6. Khalaf, K., D. Hana, J.T. Chou, C. Singh, A. Mackiewicz and M. Kaczmarek, *Aspects of the Tumor Microenvironment Involved in Immune Resistance and Drug Resistance.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 656364.
7. de Visser, K.E. and J.A. Joyce, *The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth.* Cancer Cell, 2023. **41**(3): p. 374-403.
8. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.* Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1423-37.
9. Vander Heiden, M.G. and R.J. DeBerardinis, *Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology.* Cell, 2017. **168**(4): p. 657-669.
10. Husain, Z., Y. Huang, P. Seth and V.P. Sukhatme, *Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells.* The Journal of Immunology, 2013. **191**(3): p. 1486-1495.
11. Young, A., S.F. Ngiow, Y. Gao, A.M. Patch, D.S. Barkauskas, M. Messaoudene, G. Lin, J.D. Coudert, K.A. Stannard, L. Zitvogel, et al., *A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment.* Cancer Res, 2018. **78**(4): p. 1003-1016.
12. Li, J., L. Wang, X. Chen, L. Li, Y. Li, Y. Ping, L. Huang, D. Yue, Z. Zhang, F. Wang, et al., *CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-β-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer.* OncoImmunology, 2017. **6**(6): p. e1320011.
13. Gillies, R.J., I. Robey and R.A. Gatenby, *Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers.* J Nucl Med, 2008. **49 Suppl 2**: p. 24s-42s.
14. Motallebnezhad, M., F. Jadidi-Niaragh, E.S. Qamsari, S. Bagheri, T. Gharibi and M. Yousefi, *The immunobiology of myeloid-derived suppressor cells in cancer.* Tumour Biol, 2016. **37**(2): p. 1387-406.
15. Pötzl, J., D. Roser, L. Bankel, N. Hömberg, A. Geishauser, C.D. Brenner, M. Weigand, M. Röcken and R. Mocikat, *Reversal of tumor acidosis by systemic buffering reactivates NK cells to express IFN-γ and induces NK cell-dependent*

lymphoma control without other immunotherapies. Int J Cancer, 2017. **140**(9): p. 2125-2133.
16. Fischer, B., B. Müller, K.G. Fischer, N. Baur and W. Kreutz, *Acidic pH inhibits non-MHC-restricted killer cell functions.* Clin Immunol, 2000. **96**(3): p. 252-63.
17. Vimalraj, S., *A concise review of VEGF, PDGF, FGF, Notch, angiopoietin, and HGF signalling in tumor angiogenesis with a focus on alternative approaches and future directions.* Int J Biol Macromol, 2022. **221**: p. 1428-1438.
18. Shah, A.A., M.A. Kamal and S. Akhtar, *Tumor Angiogenesis and VEGFR-2: Mechanism, Pathways and Current Biological Therapeutic Interventions.* Curr Drug Metab, 2021. **22**(1): p. 50-59.
19. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases.* J Biochem, 2013. **153**(1): p. 13-9.
20. Jiang, X., J. Wang, X. Deng, F. Xiong, S. Zhang, Z. Gong, X. Li, K. Cao, H. Deng, Y. He, et al., *The role of microenvironment in tumor angiogenesis.* J Exp Clin Cancer Res, 2020. **39**(1): p. 204.
21. Gordon-Weeks, A.N., S.Y. Lim, A.E. Yuzhalin, K. Jones, B. Markelc, K.J. Kim, J.N. Buzzelli, E. Fokas, Y. Cao, S. Smart and R. Muschel, *Neutrophils promote hepatic metastasis growth through fibroblast growth factor 2-dependent angiogenesis in mice.* Hepatology, 2017. **65**(6): p. 1920-1935.
22. Chen, C.Y., S.M. Wu, Y.H. Lin, H.C. Chi, S.L. Lin, C.T. Yeh, W.Y. Chuang and K.H. Lin, *Induction of nuclear protein-1 by thyroid hormone enhances platelet-derived growth factor A mediated angiogenesis in liver cancer.* Theranostics, 2019. **9**(8): p. 2361-2379.
23. Chen, Z., F. Han, Y. Du, H. Shi and W. Zhou, *Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions.* Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 70.
24. Semenza, G.L., *Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1.* Semin Cancer Biol, 2009. **19**(1): p. 12-6.
25. Otrock, Z.K., H.A. Hatoum, A.H. Awada, R.S. Ishak and A.I. Shamseddine, *Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: structure, regulation and clinical perspectives.* Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **70**(2): p. 93-102.
26. Koh, M.Y. and G. Powis, *Passing the baton: the HIF switch.* Trends Biochem Sci, 2012. **37**(9): p. 364-72.
27. Li, X., Q. Zhang, M.I. Nasser, L. Xu, X. Zhang, P. Zhu, Q. He and M. Zhao, *Oxygen homeostasis and cardiovascular disease: A role for HIF?* Biomed Pharmacother, 2020. **128**: p. 110338.
28. Cox, B.D., D.G. McHail and K.J. Blacker, *Personal Hypoxia Symptoms Vary Widely Within Individuals.* Aerosp Med Hum Perform, 2024. **95**(1): p. 54-58.
29. Alagha, B., S. AhmadBeygi, S.A. Moosavi and S.M. Jalali, *Hypoxia symptoms during altitude training in professional Iranian fighter pilots.* Air Med J, 2012. **31**(1): p. 28-32.
30. Smith, A.M., *Hypoxia symptoms in military aircrew: long-term recall vs. acute experience in training.* Aviat Space Environ Med, 2008. **79**(1): p. 54-7.
31. Walsh, B.K. and C.D. Smallwood, *Pediatric Oxygen Therapy: A Review and Update.* Respir Care, 2017. **62**(6): p. 645-661.

32. Zhang, S.X., Y. Wang and D. Gozal, *Pathological consequences of intermittent hypoxia in the central nervous system.* Compr Physiol, 2012. **2**(3): p. 1767-77.
33. Morgan, B.J., *Vascular consequences of intermittent hypoxia.* Adv Exp Med Biol, 2007. **618**: p. 69-84.
34. Mandl, M. and R. Depping, *Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1β): is it a rare exception?* Mol Med, 2014. **20**(1): p. 215-20.
35. Sadeghi, F., G.A. Kardar, M.R. Bolouri, F. Nasri, M. Sadri and R. Falak, *Overexpression of bHLH domain of HIF-1 failed to inhibit the HIF-1 transcriptional activity in hypoxia.* Biol Res, 2020. **53**(1): p. 25.
36. Lee, H.J., Y.H. Jung, G.E. Choi, J.S. Kim, C.W. Chae and H.J. Han, *Role of HIF1α Regulatory Factors in Stem Cells.* Int J Stem Cells, 2019. **12**(1): p. 8-20.
37. Wiesener, M.S., J.S. Jürgensen, C. Rosenberger, C.K. Scholze, J.H. Hörstrup, C. Warnecke, S. Mandriota, I. Bechmann, U.A. Frei, C.W. Pugh, et al., *Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs.* Faseb j, 2003. **17**(2): p. 271-3.
38. Gordan, J.D., J.A. Bertout, C.J. Hu, J.A. Diehl and M.C. Simon, *HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity.* Cancer Cell, 2007. **11**(4): p. 335-47.
39. Loboda, A., A. Jozkowicz and J. Dulak, *HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical.* Mol Cells, 2010. **29**(5): p. 435-42.
40. Wang, V., D.A. Davis, M. Haque, L.E. Huang and R. Yarchoan, *Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells.* Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3299-306.
41. Hu, C.-J., L.-Y. Wang, L.A. Chodosh, B. Keith and M.C. Simon, *Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1α (HIF-1α) and HIF-2α in Hypoxic Gene Regulation.* Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(24): p. 9361-9374.
42. Downes, N.L., N. Laham-Karam, M.U. Kaikkonen and S. Ylä-Herttuala, *Differential but Complementary HIF1α and HIF2α Transcriptional Regulation.* Mol Ther, 2018. **26**(7): p. 1735-1745.
43. Duan, C., *Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes.* Am J Physiol Cell Physiol, 2016. **310**(4): p. C260-9.
44. Brahimi-Horn, C., N. Mazure and J. Pouysségur, *Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications.* Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 1-9.
45. Watts, E.R. and S.R. Walmsley, *Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity.* Trends in Molecular Medicine, 2019. **25**(1): p. 33-46.
46. Kuschel, A., P. Simon and S. Tug, *Functional regulation of HIF-1α under normoxia--is there more than post-translational regulation?* J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 514-24.
47. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.* Cell, 2012. **148**(3): p. 399-408.
48. McNeill, L.A., K.S. Hewitson, T.D. Claridge, J.F. Seibel, L.E. Horsfall and C.J. Schofield, *Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803.* Biochem J, 2002. **367**(Pt 3): p. 571-5.

49. Jeong, J.W., M.K. Bae, M.Y. Ahn, S.H. Kim, T.K. Sohn, M.H. Bae, M.A. Yoo, E.J. Song, K.J. Lee and K.W. Kim, *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation.* Cell, 2002. **111**(5): p. 709-20.
50. Huang, L.E., Z. Arany, D.M. Livingston and H.F. Bunn, *Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit.* J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 32253-9.
51. Kallio, P.J., K. Okamoto, S. O'Brien, P. Carrero, Y. Makino, H. Tanaka and L. Poellinger, *Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha.* Embo j, 1998. **17**(22): p. 6573-86.
52. Volkova, Y.L., C. Pickel, A.E. Jucht, R.H. Wenger and C.C. Scholz, *The Asparagine Hydroxylase FIH: A Unique Oxygen Sensor.* Antioxid Redox Signal, 2022. **37**(13-15): p. 913-935.
53. Koyasu, S., M. Kobayashi, Y. Goto, M. Hiraoka and H. Harada, *Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge.* Cancer Sci, 2018. **109**(3): p. 560-571.
54. Carbonaro, M., D. Escuin, A. O'Brate, M. Thadani-Mulero and P. Giannakakou, *Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1α protein trafficking and activity: implications for taxane therapy.* J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 11859-69.
55. Chen, S., C. Yin, T. Lao, D. Liang, D. He, C. Wang and N. Sang, *AMPK-HDAC5 pathway facilitates nuclear accumulation of HIF-1α and functional activation of HIF-1 by deacetylating Hsp70 in the cytosol.* Cell Cycle, 2015. **14**(15): p. 2520-36.
56. Mylonis, I., G. Chachami, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, A. Kalousi, E. Georgatsou, S. Bonanou and G. Simos, *Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha.* J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33095-106.
57. Kalousi, A., I. Mylonis, A.S. Politou, G. Chachami, E. Paraskeva and G. Simos, *Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1.* J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 17): p. 2976-86.
58. Lim, J.H., Y.M. Lee, Y.S. Chun, J. Chen, J.E. Kim and J.W. Park, *Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha.* Mol Cell, 2010. **38**(6): p. 864-78.
59. Chen, X., D. Iliopoulos, Q. Zhang, Q. Tang, M.B. Greenblatt, M. Hatziapostolou, E. Lim, W.L. Tam, M. Ni, Y. Chen, et al., *XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1α pathway.* Nature, 2014. **508**(7494): p. 103-107.
60. Zeng, L., A. Morinibu, M. Kobayashi, Y. Zhu, X. Wang, Y. Goto, C.J. Yeom, T. Zhao, K. Hirota, K. Shinomiya, et al., *Aberrant IDH3α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis.* Oncogene, 2015. **34**(36): p. 4758-66.
61. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics.* Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625-34.
62. Semenza, G.L., F. Agani, G. Booth, J. Forsythe, N. Iyer, B.H. Jiang, S. Leung, R. Roe, C. Wiener and A. Yu, *Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1.* Kidney Int, 1997. **51**(2): p. 553-5.
63. Wenger, R.H., D.P. Stiehl and G. Camenisch, *Integration of oxygen signaling at the consensus HRE.* Science's STKE, 2005. **2005**(306): p. re12-re12.

64. Kimura, H., A. Weisz, T. Ogura, Y. Hitomi, Y. Kurashima, K. Hashimoto, F. D'Acquisto, M. Makuuchi and H. Esumi, *Identification of Hypoxia-inducible Factor 1 Ancillary Sequence and Its Function in Vascular Endothelial Growth Factor Gene Induction by Hypoxia and Nitric Oxide*.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(3): p. 2292-2298.
65. Rosell-Garcia, T., S. Rivas-Muñoz, K. Kin, V. Romero-Albillo, S. Alcaraz, C. Fernandez-Tornero and F. Rodriguez-Pascual, *Multimerization of HIF enhances transcription of target genes containing the hypoxia ancillary sequence.* Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2023. **1866**(4): p. 194963.
66. Gothié, E. and J. Pouysségur, *HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie.* Med Sci (Paris), 2002. **18**(1): p. 70-78.
67. Carmeliet, P., *VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer.* Oncology, 2005. **69 Suppl 3**: p. 4-10.
68. Lines, K.E., M. Stevenson, R. Mihai, I.V. Grigorieva, O.A. Shariq, K.U. Gaynor, J. Jeyabalan, M. Javid and R.V. Thakker, *Hypoxia stimulates angiogenesis and a metabolic switch in human parathyroid adenoma cells.* Endocr Oncol, 2021. **1**(1): p. 23-32.
69. Al-Sharaky, D.R., M.A.E. Kandil, H.A.S. Aiad, E.M. El-Hosary, H.A. Alagizy, M.A. Elshenawy and H.S. El-Rebey, *ROC-1, P21 and CAIX as markers of tumor aggressiveness in bladder carcinoma in Egyptian patients.* Diagn Pathol, 2020. **15**(1): p. 33.
70. Kang, H.J., I.H. Kim, C.O. Sung, J.H. Shim and E. Yu, *Expression of carbonic anhydrase 9 is a novel prognostic marker in resectable hepatocellular carcinoma.* Virchows Arch, 2015. **466**(4): p. 403-13.
71. Tostain, J., G. Li, A. Gentil-Perret and M. Gigante, *Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment.* Eur J Cancer, 2010. **46**(18): p. 3141-8.
72. Singleton, D.C., A. Macann and W.R. Wilson, *Therapeutic targeting of the hypoxic tumour microenvironment.* Nat Rev Clin Oncol, 2021. **18**(12): p. 751-772.
73. Janji, B. and S. Chouaib, *The Promise of Targeting Hypoxia to Improve Cancer Immunotherapy: Mirage or Reality?* Frontiers in Immunology, 2022. **13**.
74. Zhong, H., A.M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D.A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W.B. Isaacs, G.L. Semenza and J.W. Simons, *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.* Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
75. Birner, P., M. Schindl, A. Obermair, C. Plank, G. Breitenecker and G. Oberhuber, *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer.* Cancer research, 2000. **60**(17): p. 4693-4696.
76. Birner, P., B. Gatterbauer, G. Oberhuber, M. Schindl, K. Rössler, A. Prodinger, H. Budka and J.A. Hainfellner, *Expression of hypoxia-inducible factor–1α in oligodendrogliomas: Its impact on prognosis and on neoangiogenesis.* Cancer, 2001. **92**(1): p. 165-171.
77. Birner, P., M. Schindl, A. Obermair, G. Breitenecker and G. Oberhuber, *Expression of hypoxia-inducible factor 1α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy.* Clinical Cancer Research, 2001. **7**(6): p. 1661-1668.

78. Bos, R., H. Zhong, C.F. Hanrahan, E.C. Mommers, G.L. Semenza, H.M. Pinedo, M.D. Abeloff, J.W. Simons, P.J. van Diest and E. van der Wall, *Levels of hypoxia-inducible factor-1α during breast carcinogenesis.* Journal of the national cancer institute, 2001. **93**(4): p. 309-314.
79. Fan, Y., H. Li, X. Ma, Y. Gao, L. Chen, X. Li, X. Bao, Q. Du, Y. Zhang and X. Zhang, *Prognostic significance of hypoxia-inducible factor expression in renal cell carcinoma: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis.* Medicine, 2015. **94**(38).
80. Wigerup, C., S. Påhlman and D. Bexell, *Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer.* Pharmacol Ther, 2016. **164**: p. 152-69.
81. Bristow, R.G. and R.P. Hill, *Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability.* Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(3).
82. Richard, D.J., E. Bolderson, L. Cubeddu, R.I. Wadsworth, K. Savage, G.G. Sharma, M.L. Nicolette, S. Tsvetanov, M.J. McIlwraith, R.K. Pandita, et al., *Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability.* Nature, 2008. **453**(7195): p. 677-81.
83. Economopoulou, M., H.F. Langer, A. Celeste, V.V. Orlova, E.Y. Choi, M. Ma, A. Vassilopoulos, E. Callen, C. Deng, C.H. Bassing, et al., *Histone H2AX is integral to hypoxia-driven neovascularization.* Nat Med, 2009. **15**(5): p. 553-8.
84. Olcina, M.M., I.P. Foskolou, S. Anbalagan, J.M. Senra, I.M. Pires, Y. Jiang, A.J. Ryan and E.M. Hammond, *Replication stress and chromatin context link ATM activation to a role in DNA replication.* Mol Cell, 2013. **52**(5): p. 758-66.
85. Hassan Venkatesh, G., P. Bravo, W. Shaaban Moustafa Elsayed, F. Amirtharaj, B. Wojtas, R. Abou Khouzam, H. Hussein Nawafleh, S. Mallya, K. Satyamoorthy, P. Dessen, et al., *Hypoxia increases mutational load of breast cancer cells through frameshift mutations.* Oncoimmunology, 2020. **9**(1): p. 1750750.
86. Wang, H., H. Jiang, M. Van De Gucht and M. De Ridder, *Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It?* Cancers (Basel), 2019. **11**(1).
87. Pires, I.M., Z. Bencokova, M. Milani, L.K. Folkes, J.L. Li, M.R. Stratford, A.L. Harris and E.M. Hammond, *Effects of acute versus chronic hypoxia on DNA damage responses and genomic instability.* Cancer Res, 2010. **70**(3): p. 925-35.
88. Ng, N., K. Purshouse, I.P. Foskolou, M.M. Olcina and E.M. Hammond, *Challenges to DNA replication in hypoxic conditions.* Febs j, 2018. **285**(9): p. 1563-1571.
89. Bell, E.L. and N.S. Chandel, *Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species.* Essays Biochem, 2007. **43**: p. 17-27.
90. Chandel, N.S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C.E. Mathieu, M.C. Simon and P.T. Schumacker, *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11715-20.
91. Salas-Armenteros, I., S.I. Barroso, A.G. Rondón, M. Pérez, E. Andújar, R. Luna and A. Aguilera, *Depletion of the MFAP1/SPP381 Splicing Factor Causes R-Loop-Independent Genome Instability.* Cell Rep, 2019. **28**(6): p. 1551-1563.e7.
92. Memon, D., K. Dawson, C.S. Smowton, W. Xing, C. Dive and C.J. Miller, *Hypoxia-driven splicing into noncoding isoforms regulates the DNA damage response.* NPJ Genom Med, 2016. **1**: p. 16020.

93. Han, J., J. Li, J.C. Ho, G.S. Chia, H. Kato, S. Jha, H. Yang, L. Poellinger and K.L. Lee, *Hypoxia is a Key Driver of Alternative Splicing in Human Breast Cancer Cells.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4108.
94. Chatterjee, N. and G.C. Walker, *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis.* Environ Mol Mutagen, 2017. **58**(5): p. 235-263.
95. Crosby, M.E., R. Kulshreshtha, M. Ivan and P.M. Glazer, *MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress.* Cancer research, 2009. **69**(3): p. 1221-1229.
96. Meng, A.X., F. Jalali, A. Cuddihy, N. Chan, R.S. Bindra, P.M. Glazer and R.G. Bristow, *Hypoxia down-regulates DNA double strand break repair gene expression in prostate cancer cells.* Radiother Oncol, 2005. **76**(2): p. 168-76.
97. Bhandari, V., C.H. Li, R.G. Bristow and P.C. Boutros, *Divergent mutational processes distinguish hypoxic and normoxic tumours.* Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 737.
98. Narod, S.A. and L. Salmena, *BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer.* Discov Med, 2011. **12**(66): p. 445-53.
99. Lu, Y., A. Chu, M.S. Turker and P.M. Glazer, *Hypoxia-induced epigenetic regulation and silencing of the BRCA1 promoter.* Molecular and cellular biology, 2011. **31**(16): p. 3339-3350.
100. Cowman, S., B. Pizer and V. Sée, *Downregulation of both mismatch repair and non-homologous end-joining pathways in hypoxic brain tumour cell lines.* PeerJ, 2021. **9**: p. e11275.
101. Sulkowski, P.L., S.E. Scanlon, S. Oeck and P.M. Glazer, *PTEN Regulates Nonhomologous End Joining By Epigenetic Induction of NHEJ1/XLF.* Mol Cancer Res, 2018. **16**(8): p. 1241-1254.
102. Kaplan, A.R. and P.M. Glazer, *Impact of hypoxia on DNA repair and genome integrity.* Mutagenesis, 2020. **35**(1): p. 61-68.
103. Koshiji, M., K.K. To, S. Hammer, K. Kumamoto, A.L. Harris, P. Modrich and L.E. Huang, *HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression.* Mol Cell, 2005. **17**(6): p. 793-803.
104. Lu, Y., N. Wajapeyee, M.S. Turker and P.M. Glazer, *Silencing of the DNA mismatch repair gene MLH1 induced by hypoxic stress in a pathway dependent on the histone demethylase LSD1.* Cell Rep, 2014. **8**(2): p. 501-13.
105. Mihaylova, V.T., R.S. Bindra, J. Yuan, D. Campisi, L. Narayanan, R. Jensen, F. Giordano, R.S. Johnson, S. Rockwell and P.M. Glazer, *Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(9): p. 3265-73.
106. Scanlon, S.E. and P.M. Glazer, *Multifaceted control of DNA repair pathways by the hypoxic tumor microenvironment.* DNA Repair (Amst), 2015. **32**: p. 180-189.
107. Koshiji, M., K.K.-W. To, S. Hammer, K. Kumamoto, A.L. Harris, P. Modrich and L.E. Huang, *HIF-1α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSα expression.* Molecular cell, 2005. **17**(6): p. 793-803.
108. Chan, N., M. Ali, G.P. McCallum, R. Kumareswaran, M. Koritzinsky, B.G. Wouters, P.G. Wells, S. Gallinger and R.G. Bristow, *Hypoxia provokes base excision repair changes and a repair-deficient, mutator phenotype in colorectal cancer cells.* Mol Cancer Res, 2014. **12**(10): p. 1407-15.

109. Jurado, S., I. Smyth, B. van Denderen, N. Tenis, A. Hammet, K. Hewitt, J.L. Ng, C.J. McNees, S.V. Kozlov, H. Oka, et al., *Dual functions of ASCIZ in the DNA base damage response and pulmonary organogenesis.* PLoS Genet, 2010. **6**(10): p. e1001170.
110. Leszczynska, K.B., E.L. Göttgens, D. Biasoli, M.M. Olcina, J. Ient, S. Anbalagan, S. Bernhardt, A.J. Giaccia and E.M. Hammond, *Mechanisms and consequences of ATMIN repression in hypoxic conditions: roles for p53 and HIF-1.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 21698.
111. Iii, D.M.W., *Base Excision Repair Pathway, The: Molecular Mechanisms And Role In Disease Development And Therapeutic Design*. 2016: World Scientific.
112. Babaei, G., S.G. Aziz and N.Z.Z. Jaghi, *EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis.* Biomed Pharmacother, 2021. **133**: p. 110909.
113. Keith, B. and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer.* Cell, 2007. **129**(3): p. 465-472.
114. Gustafsson, M.V., X. Zheng, T. Pereira, K. Gradin, S. Jin, J. Lundkvist, J.L. Ruas, L. Poellinger, U. Lendahl and M. Bondesson, *Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state.* Developmental cell, 2005. **9**(5): p. 617-628.
115. Yan, Y., F. Liu, L. Han, L. Zhao, J. Chen, O.I. Olopade, M. He and M. Wei, *HIF-2α promotes conversion to a stem cell phenotype and induces chemoresistance in breast cancer cells by activating Wnt and Notch pathways.* Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018. **37**: p. 1-14.
116. Zhang, Z., H. Han, Y. Rong, K. Zhu, Z. Zhu, Z. Tang, C. Xiong and J. Tao, *Hypoxia potentiates gemcitabine-induced stemness in pancreatic cancer cells through AKT/Notch1 signaling.* Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018. **37**: p. 1-13.
117. Mazumdar, J., W.T. O'brien, R.S. Johnson, J.C. LaManna, J.C. Chavez, P.S. Klein and M.C. Simon, *O2 regulates stem cells through Wnt/β-catenin signalling.* Nature cell biology, 2010. **12**(10): p. 1007-1013.
118. Santoyo-Ramos, P., M. Likhatcheva, E.A. García-Zepeda, M.C. Castañeda-Patlán and M. Robles-Flores, *Hypoxia-inducible factors modulate the stemness and malignancy of colon cancer cells by playing opposite roles in canonical Wnt signaling.* PloS one, 2014. **9**(11): p. e112580.
119. Giambra, V., C.E. Jenkins, S.H. Lam, C. Hoofd, M. Belmonte, X. Wang, S. Gusscott, D. Gracias and A.P. Weng, *Leukemia stem cells in T-ALL require active Hif1α and Wnt signaling.* Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2015. **125**(25): p. 3917-3927.
120. Bhuria, V., J. Xing, T. Scholta, K.C. Bui, M.L.T. Nguyen, N.P. Malek, P. Bozko and R.R. Plentz, *Hypoxia induced Sonic Hedgehog signaling regulates cancer stemness, epithelial-to-mesenchymal transition and invasion in cholangiocarcinoma.* Experimental cell research, 2019. **385**(2): p. 111671.
121. Wu, S.-L., Y.-J. Li, K. Liao, L. Shi, N. Zhang, S. Liu, Y.-Y. Hu, S.-L. Li and Y. Wang, *2-Methoxyestradiol inhibits the proliferation and migration and reduces the radioresistance of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 stem cells via NF-κB/HIF-1 signaling pathway inactivation and EMT reversal.* Oncology Reports, 2017. **37**(2): p. 793-802.
122. Wang, W.-J., H. Sui, C. Qi, Q. Li, J. Zhang, S.-F. Wu, M.-Z. Mei, Y.-Y. Lu, Y.-T. Wan and H. Chang, *Ursolic acid inhibits proliferation and reverses drug resistance*

of ovarian cancer stem cells by downregulating ABCG2 through suppressing the expression of hypoxia-inducible factor-1α in vitro. Oncology reports, 2016. **36**(1): p. 428-440.
123. Marhold, M., E. Tomasich, A. El-Gazzar, G. Heller, A. Spittler, R. Horvat, M. Krainer and P. Horak, *HIF1α regulates mTOR signaling and viability of prostate cancer stem cells.* Molecular Cancer Research, 2015. **13**(3): p. 556-564.
124. Almiron Bonnin, D., M. Havrda, M. Lee, H. Liu, Z. Zhang, L. Nguyen, L. Harrington, S. Hassanpour, C. Cheng and M. Israel, *Secretion-mediated STAT3 activation promotes self-renewal of glioma stem-like cells during hypoxia.* Oncogene, 2018. **37**(8): p. 1107-1118.
125. Rey, S., L. Schito, B.G. Wouters, S. Eliasof and R.S. Kerbel, *Targeting hypoxia-inducible factors for antiangiogenic cancer therapy.* Trends in cancer, 2017. **3**(7): p. 529-541.
126. Schito, L. and S. Rey, *Hypoxia: Turning vessels into vassals of cancer immunotolerance.* Cancer Lett, 2020. **487**: p. 74-84.
127. Kelly, B.D., S.F. Hackett, K. Hirota, Y. Oshima, Z. Cai, S. Berg-Dixon, A. Rowan, Z. Yan, P.A. Campochiaro and G.L. Semenza, *Cell type–specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1.* Circulation research, 2003. **93**(11): p. 1074-1081.
128. Peng, J., L. Zhang, L. Drysdale and G.-H. Fong, *The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2α plays an important role in vascular remodeling.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(15): p. 8386-8391.
129. Holmquist-Mengelbier, L., E. Fredlund, T. Löfstedt, R. Noguera, S. Navarro, H. Nilsson, A. Pietras, J. Vallon-Christersson, Å. Borg and K. Gradin, *Recruitment of HIF-1α and HIF-2α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2α promotes an aggressive phenotype.* Cancer cell, 2006. **10**(5): p. 413-423.
130. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.* Cell, 2011. **147**(2): p. 275-92.
131. Saitoh, M., *Transcriptional regulation of EMT transcription factors in cancer.* Semin Cancer Biol, 2023. **97**: p. 21-29.
132. de Santana, D.A., P.R. Braga, C.M. Camillo-Coutinho, V.S. Freitas, P.R. Cury, D.A. Ribeiro, I.B. de Araújo, F.C. de Aquino Xavier and J.N. Dos Santos, *E-CADERIN, N-CADERIN, SLUG, SNAIL, and TWIST contribute to epithelial-mesenchymal transition in salivary gland tumors.* J Oral Pathol Med, 2024. **53**(3): p. 193-200.
133. Imai, T., A. Horiuchi, C. Wang, K. Oka, S. Ohira, T. Nikaido and I. Konishi, *Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells.* The American journal of pathology, 2003. **163**(4): p. 1437-1447.
134. Yang, M.-H., M.-Z. Wu, S.-H. Chiou, P.-M. Chen, S.-Y. Chang, C.-J. Liu, S.-C. Teng and K.-J. Wu, *Direct regulation of TWIST by HIF-1α promotes metastasis.* Nature cell biology, 2008. **10**(3): p. 295-305.
135. Krishnamachary, B., D. Zagzag, H. Nagasawa, K. Rainey, H. Okuyama, J.H. Baek and G.L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor–null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B.* Cancer research, 2006. **66**(5): p. 2725-2731.

136. Munoz-Najar, U., K. Neurath, F. Vumbaca and K. Claffey, *Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation.* Oncogene, 2006. **25**(16): p. 2379-2392.
137. Corzo, C.A., T. Condamine, L. Lu, M.J. Cotter, J.-I. Youn, P. Cheng, H.-I. Cho, E. Celis, D.G. Quiceno and T. Padhya, *HIF-1α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment.* Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(11): p. 2439-2453.
138. Clambey, E.T., E.N. McNamee, J.A. Westrich, L.E. Glover, E.L. Campbell, P. Jedlicka, E.F. De Zoeten, J.C. Cambier, K.R. Stenmark and S.P. Colgan, *Hypoxia-inducible factor-1 alpha–dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(41): p. E2784-E2793.
139. Doedens, A.L., C. Stockmann, M.P. Rubinstein, D. Liao, N. Zhang, D.G. DeNardo, L.M. Coussens, M. Karin, A.W. Goldrath and R.S. Johnson, *Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1α suppresses T-cell function and promotes tumor progression.* Cancer research, 2010. **70**(19): p. 7465-7475.
140. Barsoum, I.B., C.A. Smallwood, D.R. Siemens and C.H. Graham, *A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells.* Cancer research, 2014. **74**(3): p. 665-674.
141. Palazón, A., J. Aragonés, A. Morales-Kastresana, M.O. de Landázuri and I. Melero, *Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer.* Clinical Cancer Research, 2012. **18**(5): p. 1207-1213.
142. Noman, M.Z., G. Desantis, B. Janji, M. Hasmim, S. Karray, P. Dessen, V. Bronte and S. Chouaib, *PD-L1 is a novel direct target of HIF-1α, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation.* Journal of Experimental Medicine, 2014. **211**(5): p. 781-790.
143. Noman, M.Z., M. Hasmim, A. Lequeux, M. Xiao, C. Duhem, S. Chouaib, G. Berchem and B. Janji, *Improving Cancer Immunotherapy by Targeting the Hypoxic Tumor Microenvironment: New Opportunities and Challenges.* Cells, 2019. **8**(9).
144. Deng, J., J. Li, A. Sarde, J.L. Lines, Y.C. Lee, D.C. Qian, D.A. Pechenick, R. Manivanh, I. Le Mercier, C.H. Lowrey, et al., *Hypoxia-Induced VISTA Promotes the Suppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment.* Cancer Immunol Res, 2019. **7**(7): p. 1079-1090.
145. Zhang, H., H. Lu, L. Xiang, J.W. Bullen, C. Zhang, D. Samanta, D.M. Gilkes, J. He and G.L. Semenza, *HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(45): p. E6215-23.
146. Soto-Pantoja, D.R., M. Terabe, A. Ghosh, L.A. Ridnour, W.G. DeGraff, D.A. Wink, J.A. Berzofsky and D.D. Roberts, *CD47 in the tumor microenvironment limits cooperation between antitumor T-cell immunity and radiotherapy.* Cancer Res, 2014. **74**(23): p. 6771-83.
147. Noman, M.Z., B. Janji, B. Kaminska, K. Van Moer, S. Pierson, P. Przanowski, S. Buart, G. Berchem, P. Romero, F. Mami-Chouaib and S. Chouaib, *Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression.* Cancer Res, 2011. **71**(18): p. 5976-86.

148. Noman, M.Z., S. Buart, P. Romero, S. Ketari, B. Janji, B. Mari, F. Mami-Chouaib and S. Chouaib, *Hypoxia-inducible miR-210 regulates the susceptibility of tumor cells to lysis by cytotoxic T cells.* Cancer Res, 2012. **72**(18): p. 4629-41.
149. Baginska, J., E. Viry, G. Berchem, A. Poli, M.Z. Noman, K. van Moer, S. Medves, J. Zimmer, A. Oudin, S.P. Niclou, et al., *Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(43): p. 17450-5.
150. Xiao, M., A. Benoit, M. Hasmim, C. Duhem, G. Vogin, G. Berchem, M.Z. Noman and B. Janji, *Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies.* Front Oncol, 2021. **11**: p. 626309.
151. Mouillot, G., C. Marcou, I. Zidi, C. Guillard, D. Sangrouber, E.D. Carosella and P. Moreau, *Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells.* Hum Immunol, 2007. **68**(4): p. 277-85.
152. Yaghi, L., I. Poras, R.T. Simoes, E.A. Donadi, J. Tost, A. Daunay, B.S. de Almeida, E.D. Carosella and P. Moreau, *Hypoxia inducible factor-1 mediates the expression of the immune checkpoint HLA-G in glioma cells through hypoxia response element located in exon 2.* Oncotarget, 2016. **7**(39): p. 63690-63707.
153. Garziera, M., L. Scarabel and G. Toffoli, *Hypoxic Modulation of HLA-G Expression through the Metabolic Sensor HIF-1 in Human Cancer Cells.* J Immunol Res, 2017. **2017**: p. 4587520.
154. Rohwer, N. and T. Cramer, *Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways.* Drug Resist Updat, 2011. **14**(3): p. 191-201.
155. Comerford, K.M., T.J. Wallace, J.r. Karhausen, N.A. Louis, M.C. Montalto and S.P. Colgan, *Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene.* Cancer research, 2002. **62**(12): p. 3387-3394.
156. Zhu, H., X.P. Chen, S.F. Luo, J. Guan, W.G. Zhang and B.X. Zhang, *Involvement of hypoxia-inducible factor-1-alpha in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells.* J Exp Clin Cancer Res, 2005. **24**(4): p. 565-74.
157. Comerford, K.M., T.J. Wallace, J. Karhausen, N.A. Louis, M.C. Montalto and S.P. Colgan, *Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene.* Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3387-94.
158. Li, J., M. Shi, Y. Cao, W. Yuan, T. Pang, B. Li, Z. Sun, L. Chen and R.C. Zhao, *Knockdown of hypoxia-inducible factor-1alpha in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(4): p. 1341-51.
159. Liu, L., X. Ning, L. Sun, H. Zhang, Y. Shi, C. Guo, S. Han, J. Liu, S. Sun, Z. Han, et al., *Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer.* Cancer Sci, 2008. **99**(1): p. 121-8.
160. Bruick, R.K., *Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(16): p. 9082-9087.
161. Kim, J.Y., H.J. Ahn, J.H. Ryu, K. Suk and J.H. Park, *BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha.* J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 113-24.

162. Sowter, H.M., P.J. Ratcliffe, P. Watson, A.H. Greenberg and A.L. Harris, *HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors.* Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6669-73.
163. Rohwer, N., C. Dame, A. Haugstetter, B. Wiedenmann, K. Detjen, C.A. Schmitt and T. Cramer, *Hypoxia-inducible factor 1alpha determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF-kappaB.* PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12038.
164. Bellot, G., R. Garcia-Medina, P. Gounon, J. Chiche, D. Roux, J. Pouysségur and N.M. Mazure, *Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(10): p. 2570-81.
165. Zając, A., A. Maciejczyk, J. Sumorek-Wiadro, K. Filipek, K. Deryło, E. Langner, J. Pawelec, M. Wasiak, M. Ścibiorski, W. Rzeski, et al., *The Role of Bcl-2 and Beclin-1 Complex in "Switching" between Apoptosis and Autophagy in Human Glioma Cells upon LY294002 and Sorafenib Treatment.* Cells, 2023. **12**(23): p. 2670.
166. Liu, X.W., Y. Su, H. Zhu, J. Cao, W.J. Ding, Y.C. Zhao, Q.J. He and B. Yang, *HIF-1α-dependent autophagy protects HeLa cells from fenretinide (4-HPR)-induced apoptosis in hypoxia.* Pharmacol Res, 2010. **62**(5): p. 416-25.
167. Brown, J.M. and W.R. Wilson, *Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment.* Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(6): p. 437-447.
168. Suwa, T., M. Kobayashi, Y. Shirai, J.M. Nam, Y. Tabuchi, N. Takeda, S. Akamatsu, O. Ogawa, T. Mizowaki, E.M. Hammond and H. Harada, *SPINK1 as a plasma marker for tumor hypoxia and a therapeutic target for radiosensitization.* JCI Insight, 2021. **6**(21).
169. Chen, F., Q. Long, D. Fu, D. Zhu, Y. Ji, L. Han, B. Zhang, Q. Xu, B. Liu, Y. Li, et al., *Targeting SPINK1 in the damaged tumour microenvironment alleviates therapeutic resistance.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4315.
170. Liu, L., K. Gu and D. Hua, *HDAC1 suppresses radiotherapy sensitivity in cervical cancer via regulating HIF-1α/VEGF signaling pathway.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2023. **69**(11): p. 132-140.
171. Qi, L., L.N. Xing, X. Wei and S.G. Song, *Effects of VEGF suppression by small hairpin RNA interference combined with radiotherapy on the growth of cervical cancer.* Genet Mol Res, 2014. **13**(3): p. 5094-106.
172. Zhou, Y., C. Wu, G. Lu, Z. Hu, Q. Chen and X. Du, *FGF/FGFR signaling pathway involved resistance in various cancer types.* J Cancer, 2020. **11**(8): p. 2000-2007.
173. Zhao, Y. and A.A. Adjei, *Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor.* Oncologist, 2015. **20**(6): p. 660-73.
174. Liu, Z.L., H.H. Chen, L.L. Zheng, L.P. Sun and L. Shi, *Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer.* Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 198.
175. Moreno Garcia, V., B. Basu, L.R. Molife and S.B. Kaye, *Combining antiangiogenics to overcome resistance: rationale and clinical experience.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(14): p. 3750-61.
176. Kopecka, J., I.C. Salaroglio, E. Perez-Ruiz, A.B. Sarmento-Ribeiro, S. Saponara, J. De Las Rivas and C. Riganti, *Hypoxia as a driver of resistance to immunotherapy.* Drug Resist Updat, 2021. **59**: p. 100787.

177. Ma, S., Y. Zhao, W.C. Lee, L.T. Ong, P.L. Lee, Z. Jiang, G. Oguz, Z. Niu, M. Liu, J.Y. Goh, et al., *Hypoxia induces HIF1α-dependent epigenetic vulnerability in triple negative breast cancer to confer immune effector dysfunction and resistance to anti-PD-1 immunotherapy.* Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 4118.
178. Robertson, M., *Innate immunity.* Curr Biol, 1998. **8**(17): p. R595-7.
179. Carty, M., C. Guy and A.G. Bowie, *Detection of Viral Infections by Innate Immunity.* Biochem Pharmacol, 2021. **183**: p. 114316.
180. Krensky, A.M., *The HLA system, antigen processing and presentation.* Kidney Int Suppl, 1997. **58**: p. S2-7.
181. Mercier, F.E., C. Ragu and D.T. Scadden, *The bone marrow at the crossroads of blood and immunity.* Nat Rev Immunol, 2011. **12**(1): p. 49-60.
182. Brown, G.C., *Cell death by phagocytosis.* Nat Rev Immunol, 2024. **24**(2): p. 91-102.
183. Muntjewerff, E.M., L.D. Meesters and G. van den Bogaart, *Antigen Cross-Presentation by Macrophages.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 1276.
184. Yunna, C., H. Mengru, W. Lei and C. Weidong, *Macrophage M1/M2 polarization.* Eur J Pharmacol, 2020. **877**: p. 173090.
185. Shapouri-Moghaddam, A., S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S.A. Esmaeili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J.T. Afshari and A. Sahebkar, *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease.* J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6425-6440.
186. Reizis, B., *Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function.* Immunity, 2019. **50**(1): p. 37-50.
187. Sokol, C.L. and A.D. Luster, *The chemokine system in innate immunity.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(5).
188. Théry, C. and S. Amigorena, *The cell biology of antigen presentation in dendritic cells.* Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 45-51.
189. Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A.J. Bonito and R.M. Steinman, *The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation.* J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1607-18.
190. Lu, P., Y.L. Wang and P.S. Linsley, *Regulation of self-tolerance by CD80/CD86 interactions.* Curr Opin Immunol, 1997. **9**(6): p. 858-62.
191. Karnell, J.L., S.A. Rieder, R. Ettinger and R. Kolbeck, *Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond.* Adv Drug Deliv Rev, 2019. **141**: p. 92-103.
192. Liew, P.X. and P. Kubes, *The Neutrophil's Role During Health and Disease.* Physiol Rev, 2019. **99**(2): p. 1223-1248.
193. Schwartz, C., J.U. Eberle and D. Voehringer, *Basophils in inflammation.* Eur J Pharmacol, 2016. **778**: p. 90-5.
194. Wechsler, M.E., A. Munitz, S.J. Ackerman, M.G. Drake, D.J. Jackson, A.J. Wardlaw, S.K. Dougan, S. Berdnikovs, F. Schleich, A. Matucci, et al., *Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review.* Mayo Clin Proc, 2021. **96**(10): p. 2694-2707.
195. Bryceson, Y.T., C. Fauriat, J.M. Nunes, S.M. Wood, N.K. Björkström, E.O. Long and H.G. Ljunggren, *Functional analysis of human NK cells by flow cytometry.* Methods Mol Biol, 2010. **612**: p. 335-52.

196. Dębska-Zielkowska, J., G. Moszkowska, M. Zieliński, H. Zielińska, A. Dukat-Mazurek, P. Trzonkowski and K. Stefańska, *KIR Receptors as Key Regulators of NK Cells Activity in Health and Disease.* Cells, 2021. **10**(7).
197. Prager, I. and C. Watzl, *Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity.* J Leukoc Biol, 2019. **105**(6): p. 1319-1329.
198. de Saint Basile, G., G. Ménasché and A. Fischer, *Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(8): p. 568-79.
199. Lopez, J.A., O. Susanto, M.R. Jenkins, N. Lukoyanova, V.R. Sutton, R.H. Law, A. Johnston, C.H. Bird, P.I. Bird, J.C. Whisstock, et al., *Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack.* Blood, 2013. **121**(14): p. 2659-68.
200. Li, F. and S. Liu, *Focusing on NK cells and ADCC: A promising immunotherapy approach in targeted therapy for HER2-positive breast cancer.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 1083462.
201. Dong, Y., X. Pi, F. Bartels-Burgahn, D. Saltukoglu, Z. Liang, J. Yang, F.W. Alt, M. Reth and H. Wu, *Structural principles of B cell antigen receptor assembly.* Nature, 2022. **612**(7938): p. 156-161.
202. Parker, D.C., *T cell-dependent B cell activation.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 331-60.
203. Vos, Q., A. Lees, Z.Q. Wu, C.M. Snapper and J.J. Mond, *B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms.* Immunol Rev, 2000. **176**: p. 154-70.
204. Luckheeram, R.V., R. Zhou, A.D. Verma and B. Xia, *CD4⁺T cells: differentiation and functions.* Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.
205. Hwang, J.R., Y. Byeon, D. Kim and S.G. Park, *Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development.* Exp Mol Med, 2020. **52**(5): p. 750-761.
206. Sckisel, G.D., M.N. Bouchlaka, A.M. Monjazeb, M. Crittenden, B.D. Curti, D.E. Wilkins, K.A. Alderson, C.M. Sungur, E. Ames, A. Mirsoian, et al., *Out-of-Sequence Signal 3 Paralyzes Primary CD4(+) T-Cell-Dependent Immunity.* Immunity, 2015. **43**(2): p. 240-50.
207. Ruterbusch, M., K.B. Pruner, L. Shehata and M. Pepper, *In Vivo CD4(+) T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm.* Annu Rev Immunol, 2020. **38**: p. 705-725.
208. Yasuda, K., Y. Takeuchi and K. Hirota, *The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases.* Semin Immunopathol, 2019. **41**(3): p. 283-297.
209. Vignali, D.A., L.W. Collison and C.J. Workman, *How regulatory T cells work.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
210. Buggert, M., D.A. Price, L.K. Mackay and M.R. Betts, *Human circulating and tissue-resident memory CD8(+) T cells.* Nat Immunol, 2023. **24**(7): p. 1076-1086.
211. Yi, J.S., M.A. Cox and A.J. Zajac, *T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion.* Immunology, 2010. **129**(4): p. 474-81.
212. Dunn, G.P., L.J. Old and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
213. Lescaille, G., J. Rochefort, R. Macedo, A. Le Moignic, C. Baillou, V. Mateo, C. Bertolus and F. M. Lemoine, *Immunité et cancers des voies aéro-digestives*

supérieures 1re partie : Réponses immunitaires et échappement tumoral. Med Buccale Chir Buccale, 2014. **20**(3): p. 155-160.
214. Benoit, A., G. Vogin, C. Duhem, G. Berchem and B. Janji, *Lighting Up the Fire in the Microenvironment of Cold Tumors: A Major Challenge to Improve Cancer Immunotherapy.* Cells, 2023. **12**(13).
215. Xie, N., G. Shen, W. Gao, Z. Huang, C. Huang and L. Fu, *Neoantigens: promising targets for cancer therapy.* Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 9.
216. Netea, M.G., J. Quintin and J.W. van der Meer, *Trained immunity: a memory for innate host defense.* Cell Host Microbe, 2011. **9**(5): p. 355-61.
217. Ohara, R.A. and K.M. Murphy, *The evolving biology of cross-presentation.* Semin Immunol, 2023. **66**: p. 101711.
218. Dhatchinamoorthy, K., J.D. Colbert and K.L. Rock, *Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 636568.
219. Ju, X., G. Clark and D.N. Hart, *Review of human DC subtypes.* Methods Mol Biol, 2010. **595**: p. 3-20.
220. Lei, X., I. Khatri, T. de Wit, I. de Rink, M. Nieuwland, R. Kerkhoven, H. van Eenennaam, C. Sun, A.D. Garg, J. Borst and Y. Xiao, *CD4(+) helper T cells endow cDC1 with cancer-impeding functions in the human tumor micro-environment.* Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 217.
221. von Euw, E.M., M.M. Barrio, D. Furman, M. Bianchini, E.M. Levy, C. Yee, Y. Li, R. Wainstok and J. Mordoh, *Monocyte-derived dendritic cells loaded with a mixture of apoptotic/necrotic melanoma cells efficiently cross-present gp100 and MART-1 antigens to specific CD8(+) T lymphocytes.* J Transl Med, 2007. **5**: p. 19.
222. Borst, J., J. Busselaar, D.M.T. Bosma and F. Ossendorp, *Mechanism of action of PD-1 receptor/ligand targeted cancer immunotherapy.* Eur J Immunol, 2021. **51**(8): p. 1911-1920.
223. Melaiu, O., M. Chierici, V. Lucarini, G. Jurman, L.A. Conti, R. De Vito, R. Boldrini, L. Cifaldi, A. Castellano, C. Furlanello, et al., *Cellular and gene signatures of tumor-infiltrating dendritic cells and natural-killer cells predict prognosis of neuroblastoma.* Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 5992.
224. van Cruijsen, H., A.A. van der Veldt, L. Vroling, D. Oosterhoff, H.J. Broxterman, R.J. Scheper, G. Giaccone, J.B. Haanen, A.J. van den Eertwegh, E. Boven, et al., *Sunitinib-induced myeloid lineage redistribution in renal cell cancer patients: CD1c+ dendritic cell frequency predicts progression-free survival.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(18): p. 5884-92.
225. Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
226. Jongbloed, S.L., A.J. Kassianos, K.J. McDonald, G.J. Clark, X. Ju, C.E. Angel, C.J. Chen, P.R. Dunbar, R.B. Wadley, V. Jeet, et al., *Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens.* J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1247-60.
227. Fan, J., H. Cai, Q. Li, Z. Du and W. Tan, *The effects of ROS-mediating oxygen tension on human CD34(+)CD38(-) cells induced into mature dendritic cells.* J Biotechnol, 2012. **158**(3): p. 104-11.

228. Hirsch, L., R. Flippot, B. Escudier and L. Albiges, *Immunomodulatory Roles of VEGF Pathway Inhibitors in Renal Cell Carcinoma.* Drugs, 2020. **80**(12): p. 1169-1181.
229. Gabrilovich, D.I., H.L. Chen, K.R. Girgis, H.T. Cunningham, G.M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh and D.P. Carbone, *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.* Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
230. Winning, S. and J. Fandrey, *Dendritic Cells under Hypoxia: How Oxygen Shortage Affects the Linkage between Innate and Adaptive Immunity.* J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 5134329.
231. Ge, W. and W. Wu, *[Influencing Factors and Significance of Tumor-associated Macrophage Polarization in Tumor Microenvironment].* Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2023. **26**(3): p. 228-237.
232. Dallavalasa, S., N.M. Beeraka, C.G. Basavaraju, S.V. Tulimilli, S.P. Sadhu, K. Rajesh, G. Aliev and S.V. Madhunapantula, *The Role of Tumor Associated Macrophages (TAMs) in Cancer Progression, Chemoresistance, Angiogenesis and Metastasis - Current Status.* Curr Med Chem, 2021. **28**(39): p. 8203-8236.
233. Liu, T., C. Han, S. Wang, P. Fang, Z. Ma, L. Xu and R. Yin, *Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy.* J Hematol Oncol, 2019. **12**(1): p. 86.
234. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda and T. Takahashi, *Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance.* Immunol Rev, 2001. **182**: p. 18-32.
235. Alissafi, T., A. Hatzioannou, A.I. Legaki, A. Varveri and P. Verginis, *Balancing cancer immunotherapy and immune-related adverse events: The emerging role of regulatory T cells.* J Autoimmun, 2019. **104**: p. 102310.
236. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
237. Yin, Z., C. Li, J. Wang and L. Xue, *Myeloid-derived suppressor cells: Roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy.* Int J Cancer, 2019. **144**(5): p. 933-946.
238. Peng, W., J.Q. Chen, C. Liu, S. Malu, C. Creasy, M.T. Tetzlaff, C. Xu, J.A. McKenzie, C. Zhang, X. Liang, et al., *Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy.* Cancer Discov, 2016. **6**(2): p. 202-16.
239. Spranger, S., R. Bao and T.F. Gajewski, *Melanoma-intrinsic β-catenin signalling prevents anti-tumour immunity.* Nature, 2015. **523**(7559): p. 231-5.
240. Berchem, G., M.Z. Noman, M. Bosseler, J. Paggetti, S. Baconnais, E. Le Cam, A. Nanbakhsh, E. Moussay, F. Mami-Chouaib, B. Janji and S. Chouaib, *Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF-β and miR23a transfer.* Oncoimmunology, 2016. **5**(4): p. e1062968.
241. Lequeux, A., M.Z. Noman, M. Xiao, D. Sauvage, K. Van Moer, E. Viry, I. Bocci, M. Hasmim, M. Bosseler, G. Berchem and B. Janji, *Impact of hypoxic tumor microenvironment and tumor cell plasticity on the expression of immune checkpoints.* Cancer Lett, 2019. **458**: p. 13-20.

242. Noman, M.Z., G. Desantis, B. Janji, M. Hasmim, S. Karray, P. Dessen, V. Bronte and S. Chouaib, *PD-L1 is a novel direct target of HIF-1α, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation.* J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 781-90.
243. Noman, M.Z., M. Hasmim, Y. Messai, S. Terry, C. Kieda, B. Janji and S. Chouaib, *Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia.* Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **309**(9): p. C569-79.
244. Li, Y., S.P. Patel, J. Roszik and Y. Qin, *Hypoxia-Driven Immunosuppressive Metabolites in the Tumor Microenvironment: New Approaches for Combinational Immunotherapy.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 1591.
245. Vito, A., N. El-Sayes and K. Mossman, *Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment.* Cells, 2020. **9**(4).
246. Janji, B. and S. Chouaib, *The Promise of Targeting Hypoxia to Improve Cancer Immunotherapy: Mirage or Reality?* Front Immunol, 2022. **13**: p. 880810.
247. Tauriello, D.V.F., S. Palomo-Ponce, D. Stork, A. Berenguer-Llergo, J. Badia-Ramentol, M. Iglesias, M. Sevillano, S. Ibiza, A. Cañellas, X. Hernando-Momblona, et al., *TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis.* Nature, 2018. **554**(7693): p. 538-543.
248. Mariathasan, S., S.J. Turley, D. Nickles, A. Castiglioni, K. Yuen, Y. Wang, E.E. Kadel, III, H. Koeppen, J.L. Astarita, R. Cubas, et al., *TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells.* Nature, 2018. **554**(7693): p. 544-548.
249. Vinokurova, D. and L. Apetoh, *The Emerging Role of IL-9 in the Anticancer Effects of Anti-PD-1 Therapy.* Biomolecules, 2023. **13**(4).
250. Garcia-Diaz, A., D.S. Shin, B.H. Moreno, J. Saco, H. Escuin-Ordinas, G.A. Rodriguez, J.M. Zaretsky, L. Sun, W. Hugo, X. Wang, et al., *Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression.* Cell Rep, 2017. **19**(6): p. 1189-1201.
251. Hashimoto, M., K. Araki, M.A. Cardenas, P. Li, R.R. Jadhav, H.T. Kissick, W.H. Hudson, D.J. McGuire, R.C. Obeng, A. Wieland, et al., *PD-1 combination therapy with IL-2 modifies CD8+ T cell exhaustion program.* Nature, 2022. **610**(7930): p. 173-181.
252. Kaptein, P., C. Jacoberger-Foissac, P. Dimitriadis, P. Voabil, M. de Bruijn, S. Brokamp, I. Reijers, J. Versluis, G. Nallan, H. Triscott, et al., *Addition of interleukin-2 overcomes resistance to neoadjuvant CTLA4 and PD1 blockade in ex vivo patient tumors.* Science Translational Medicine, 2022. **14**(642): p. eabj9779.
253. Horton, B.L. and S. Spranger, *Something old, something new: The marriage of PD-1 and IL-2.* Immunity, 2023. **56**(1): p. 8-10.
254. Feng, Y., S. Yan, S.K. Lam, F.C.F. Ko, C. Chen, M. Khan and J.C.-M. Ho, *IL-9 stimulates an anti-tumor immune response and facilitates immune checkpoint blockade in the CMT167 mouse model.* Lung Cancer, 2022. **174**: p. 14-26.
255. Franciszkiewicz, K., A. Boissonnas, M. Boutet, C. Combadière and F. Mami-Chouaib, *Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response.* Cancer Res, 2012. **72**(24): p. 6325-32.
256. Gorbachev, A.V. and R.L. Fairchild, *Regulation of chemokine expression in the tumor microenvironment.* Crit Rev Immunol, 2014. **34**(2): p. 103-20.

257. Hojo, S., K. Koizumi, K. Tsuneyama, Y. Arita, Z. Cui, K. Shinohara, T. Minami, I. Hashimoto, T. Nakayama, H. Sakurai, et al., *High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer.* Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4725-31.
258. Harlin, H., Y. Meng, A.C. Peterson, Y. Zha, M. Tretiakova, C. Slingluff, M. McKee and T.F. Gajewski, *Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment.* Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3077-85.
259. Lequeux, A., M.Z. Noman, M. Xiao, K. Van Moer, M. Hasmim, A. Benoit, M. Bosseler, E. Viry, T. Arakelian, G. Berchem, et al., *Targeting HIF-1 alpha transcriptional activity drives cytotoxic immune effector cells into melanoma and improves combination immunotherapy.* Oncogene, 2021. **40**(28): p. 4725-4735.
260. Combadière, B., C. Combadière and P. Deterre, *[Chemokines: a sophisticated cell-guidance network].* Med Sci (Paris), 2007. **23**(2): p. 173-9.
261. Graham, G.J., *D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes.* Eur J Immunol, 2009. **39**(2): p. 342-51.
262. Raman, D., T. Sobolik-Delmaire and A. Richmond, *Chemokines in health and disease.* Exp Cell Res, 2011. **317**(5): p. 575-89.
263. Horuk, R., *Chemokine receptors.* Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(4): p. 313-35.
264. Hughes, C.E. and R.J.B. Nibbs, *A guide to chemokines and their receptors.* Febs j, 2018. **285**(16): p. 2944-2971.
265. Stone, M.J., J.A. Hayward, C. Huang, E.H. Z and J. Sanchez, *Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(2).
266. Maheshwari, A. and R.B. Killeen, *Duffy Blood Group System*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

267. Griffith, J.W., C.L. Sokol and A.D. Luster, *Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity.* Annual Review of Immunology, 2014. **32**(1): p. 659-702.
268. Oo, Y.H., S. Shetty and D.H. Adams, *The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver.* Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 31-44.
269. Togashi, Y., K. Shitara and H. Nishikawa, *Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy.* Nature Reviews Clinical Oncology, 2019. **16**(6): p. 356-371.
270. Maruyama, T., K. Kono, S. Izawa, Y. Mizukami, Y. Kawaguchi, K. Mimura, M. Watanabe and H. Fujii, *CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma.* Dis Esophagus, 2010. **23**(5): p. 422-9.
271. Faget, J., C. Biota, T. Bachelot, M. Gobert, I. Treilleux, N. Goutagny, I. Durand, S. Léon-Goddard, J.Y. Blay, C. Caux and C. Ménétrier-Caux, *Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells.* Cancer Res, 2011. **71**(19): p. 6143-52.
272. Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai and H. Fujii, *CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to*

accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. Int J Cancer, 2008. **122**(10): p. 2286-93.
273. Zhang, L., X. Lu, Y. Xu, X. La, J. Tian, A. Li, H. Li, C. Wu, Y. Xi, G. Song, et al., *Tumor-associated macrophages confer colorectal cancer 5-fluorouracil resistance by promoting MRP1 membrane translocation via an intercellular CXCL17/CXCL22-CCR4-ATF6-GRP78 axis.* Cell Death Dis, 2023. **14**(9): p. 582.
274. Chiang, Y., L.F. Lu, C.L. Tsai, Y.C. Tsai, C.C. Wang, F.J. Hsueh, C.Y. Huang, C.H. Chen, Y.S. Pu and J.C. Cheng, *C-C chemokine receptor 4 (CCR4)-positive regulatory T cells interact with tumor-associated macrophages to facilitate metastatic potential after radiation.* Eur J Cancer, 2023. **198**: p. 113521.
275. Fujikawa, K., T. Saito, K. Kurose, T. Kojima, T. Funakoshi, E. Sato, K. Kakimi, S. Iida, Y. Doki, M. Oka, et al., *Integrated analysis of phase 1a and 1b randomized controlled trials; Treg-targeted cancer immunotherapy with the humanized anti-CCR4 antibody, KW-0761, for advanced solid tumors.* PLoS One, 2023. **18**(9): p. e0291772.
276. Khurana, S., M.G. Heckman, F.E. Craig, J.J. Cochuyt, P. Greipp, Z.A. Rahman, L.Z. Sproat, M. Litzow, J.M. Foran and L.J. Jiang, *Evaluation of Novel Targets, Including CC-Chemokine Receptor 4, in Adult T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma.* Arch Pathol Lab Med, 2023.
277. Hui, Z., J. Zhang, Y. Zheng, L. Yang, W. Yu, Y. An, F. Wei and X. Ren, *Single-Cell Sequencing Reveals the Transcriptome and TCR Characteristics of pTregs and in vitro Expanded iTregs.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 619932.
278. Sallusto, F., D. Lenig, C.R. Mackay and A. Lanzavecchia, *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes.* J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 875-83.
279. Su, X., J. Ye, E.C. Hsueh, Y. Zhang, D.F. Hoft and G. Peng, *Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells.* J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1630-41.
280. Zeren, N., Z. Afzal, S. Morgan, G. Marshall, M. Uppiliappan, J. Merritt and S.J. Coniglio, *The Chemokine Receptor CCR1 Mediates Microglia Stimulated Glioma Invasion.* Int J Mol Sci, 2023. **24**(6).
281. Watzling, M., L. Klaus, T. Weidemeier, H. Horder, R. Ebert, T. Blunk and P. Bauer-Kreisel, *Three-Dimensional Breast Cancer Model to Investigate CCL5/CCR1 Expression Mediated by Direct Contact between Breast Cancer Cells and Adipose-Derived Stromal Cells or Adipocytes.* Cancers (Basel), 2023. **15**(13).
282. Dai, Z., Y. Wang, N. Sun and C. Zhang, *Characterizing ligand-receptor interactions and unveiling the pro-tumorigenic role of CCL16-CCR1 axis in the microenvironment of hepatocellular carcinoma.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1299953.
283. Tapmeier, T.T., J.H. Howell, L. Zhao, B.W. Papiez, J.A. Schnabel, R.J. Muschel and A. Gal, *Evolving polarisation of infiltrating and alveolar macrophages in the lung during metastatic progression of melanoma suggests CCR1 as a therapeutic target.* Oncogene, 2022. **41**(46): p. 5032-5045.
284. Le, K., J. Sun, J. Ghaemmaghami, M.R. Smith, W.K.E. Ip, T. Phillips and M. Gupta, *Blockade of CCR1 induces a phenotypic shift in macrophages and triggers a favorable antilymphoma activity.* Blood Adv, 2023. **7**(15): p. 3952-3967.

285. Battaglin, F., Y. Baca, J. Millstein, Y. Yang, J. Xiu, H. Arai, J. Wang, F.S. Ou, F. Innocenti, S.M. Mumenthaler, et al., *CCR5 and CCL5 gene expression in colorectal cancer: comprehensive profiling and clinical value.* J Immunother Cancer, 2024. **12**(1).
286. Guan, B., H. Li, J. Yao, J. Guo, F. Yu, G. Li, B. Wan, J. Ma, D. Huang, L. Sun and Y. Chen, *CCL3-CCR5 axis promotes cell migration and invasion of colon adenocarcinoma via Akt signaling pathway.* Environ Toxicol, 2023. **38**(1): p. 172-184.
287. Zhou, H., J. Yao, Z. Zhong, H. Wei, Y. He, W. Li and K. Hu, *Lactate-Induced CCL8 in Tumor-Associated Macrophages Accelerates the Progression of Colorectal Cancer through the CCL8/CCR5/mTORC1 Axis.* Cancers (Basel), 2023. **15**(24).
288. Chen, L., G. Xu, X. Song, L. Zhang, C. Chen, G. Xiang, S. Wang, Z. Zhang, F. Wu, X. Yang, et al., *A novel antagonist of the CCL5/CCR5 axis suppresses the tumor growth and metastasis of triple-negative breast cancer by CCR5-YAP1 regulation.* Cancer Lett, 2024: p. 216635.
289. González-Arriagada, W.A., R.D. Coletta, C. Lozano-Burgos, C. García, J. Maripillán, F. Alcayaga-Miranda, B. Godínez-Pacheco, S. Oyarce-Pezoa, R. Martínez-Flores and I.E. García, *CR5/CCL5 axis is linked to a poor outcome, and inhibition reduces metastasis in oral squamous cell carcinoma.* J Cancer Res Clin Oncol, 2023. **149**(19): p. 17335-17346.
290. Shao, D., H. Zhou, H. Yu and X. Zhu, *CX3CR1 is a potential biomarker of immune microenvironment and prognosis in epithelial ovarian cancer.* Medicine (Baltimore), 2024. **103**(3): p. e36891.
291. Gaudin, F., S. Nasreddine, A.C. Donnadieu, D. Emilie, C. Combadière, S. Prévot, V. Machelon and K. Balabanian, *Identification of the chemokine CX3CL1 as a new regulator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian cancer.* PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21546.
292. Ben-Mordechai, T., Y.R. Lawrence, Z. Symon, A. Shimoni-Sebag and U. Amit, *CX3CR1-Expressing Immune Cells Infiltrate the Tumor Microenvironment and Promote Radiation Resistance in a Mouse Model of Lung Cancer.* Cancers (Basel), 2023. **15**(22).
293. Wei, L.M., S. Cao, W.D. Yu, Y.L. Liu and J.T. Wang, *Overexpression of CX3CR1 is associated with cellular metastasis, proliferation and survival in gastric cancer.* Oncol Rep, 2015. **33**(2): p. 615-24.
294. Wang, H., J. Cai, S. Du, Z. Guo, B. Xin, J. Wang, W. Wei and X. Shen, *Fractalkine/CX3CR1 induces apoptosis resistance and proliferation through the activation of the AKT/NF-κB cascade in pancreatic cancer cells.* Cell Biochem Funct, 2017. **35**(6): p. 315-326.
295. Sweis, R.F., S. Spranger, R. Bao, G.P. Paner, W.M. Stadler, G. Steinberg and T.F. Gajewski, *Molecular Drivers of the Non-T-cell-Inflamed Tumor Microenvironment in Urothelial Bladder Cancer.* Cancer Immunol Res, 2016. **4**(7): p. 563-8.
296. Korbecki, J., K. Kojder, K. Barczak, D. Simińska, I. Gutowska, D. Chlubek and I. Baranowska-Bosiacka, *Hypoxia Alters the Expression of CC Chemokines and CC Chemokine Receptors in a Tumor-A Literature Review.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(16).
297. Korbecki, J., K. Kojder, P. Kapczuk, P. Kupnicka, B. Gawrońska-Szklarz, I. Gutowska, D. Chlubek and I. Baranowska-Bosiacka, *The Effect of Hypoxia on the*

Expression of CXC Chemokines and CXC Chemokine Receptors-A Review of Literature. Int J Mol Sci, 2021. **22**(2).
298. Kleist, A.B., S. Jenjak, A. Sente, L.J. Laskowski, M. Szpakowska, M.M. Calkins, E.I. Anderson, L.M. McNally, R. Heukers, V. Bobkov, et al., *Conformational selection guides β-arrestin recruitment at a biased G protein-coupled receptor.* Science, 2022. **377**(6602): p. 222-228.
299. Samus, M. and A. Rot, *Atypical chemokine receptors in cancer.* Cytokine, 2024. **176**: p. 156504.
300. Sjöberg, E., M. Meyrath, A. Chevigné, A. Östman, M. Augsten and M. Szpakowska, *The diverse and complex roles of atypical chemokine receptors in cancer: From molecular biology to clinical relevance and therapy.* Adv Cancer Res, 2020. **145**: p. 99-138.
301. Jinna, N., P. Rida, T. Su, Z. Gong, S. Yao, M. LaBarge, R. Natarajan, T. Jovanovic-Talisman, C. Ambrosone and V. Seewaldt, *The DARC Side of Inflamm-Aging: Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC/ACKR1) as a Potential Biomarker of Aging, Immunosenescence, and Breast Oncogenesis among High-Risk Subpopulations.* Cells, 2022. **11**(23).
302. Gowhari Shabgah, A., F. Jadidi-Niaragh, H. Mohammadi, F. Ebrahimzadeh, M. Oveisee, A. Jahanara and J. Gholizadeh Navashenaq, *The Role of Atypical Chemokine Receptor D6 (ACKR2) in Physiological and Pathological Conditions; Friend, Foe, or Both?* Front Immunol, 2022. **13**: p. 861931.
303. Graham, G.J., *D6/ACKR2.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 280.
304. Chevigné, A., B. Janji, M. Meyrath, N. Reynders, G. D'Uonnolo, T. Uchański, M. Xiao, G. Berchem, M. Ollert, Y.J. Kwon, et al., *CXCL10 Is an Agonist of the CC Family Chemokine Scavenger Receptor ACKR2/D6.* Cancers (Basel), 2021. **13**(5).
305. Chatterjee, M., *Atypical Roles of the Chemokine Receptor ACKR3/CXCR7 in Platelet Pathophysiology.* Cells, 2022. **11**(2).
306. Adlere, I., B. Caspar, M. Arimont, S. Dekkers, K. Visser, J. Stuijt, C. de Graaf, M. Stocks, B. Kellam, S. Briddon, et al., *Modulators of CXCR4 and CXCR7/ACKR3 Function.* Mol Pharmacol, 2019. **96**(6): p. 737-752.
307. Torphy, R.J., E.J. Yee, R.D. Schulick and Y. Zhu, *Atypical chemokine receptors: emerging therapeutic targets in cancer.* Trends Pharmacol Sci, 2022. **43**(12): p. 1085-1097.
308. Le Mercier, A., R. Bonnavion, W. Yu, M.W. Alnouri, S. Ramas, Y. Zhang, Y. Jäger, K.A. Roquid, H.W. Jeong, K.K. Sivaraj, et al., *GPR182 is an endothelium-specific atypical chemokine receptor that maintains hematopoietic stem cell homeostasis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(17).
309. Lu, S., W. Jang, A. Inoue and N.A. Lambert, *Constitutive G protein coupling profiles of understudied orphan GPCRs.* PLoS One, 2021. **16**(4): p. e0247743.
310. Torphy, R.J., Y. Sun, R. Lin, A. Caffrey-Carr, Y. Fujiwara, F. Ho, E.N. Miller, M.D. McCarter, T.R. Lyons, R.D. Schulick, et al., *GPR182 limits antitumor immunity via chemokine scavenging in mouse melanoma models.* Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 97.
311. Chen, R., M.A. Ahmed and N.R. Forsyth, *Dimethyloxalylglycine (DMOG), a Hypoxia Mimetic Agent, Does Not Replicate a Rat Pheochromocytoma (PC12) Cell Biological Response to Reduced Oxygen Culture.* Biomolecules, 2022. **12**(4).

312. De Henau, O., G.N. Degroot, V. Imbault, V. Robert, C. De Poorter, S. McHeik, C. Galés, M. Parmentier and J.Y. Springael, *Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2.* PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164179.
313. Stojek, M., *The role of chemerin in human disease.* Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017. **71**(0): p. 110-117.
314. Perumalsamy, S., N.A. Aqilah Mohd Zin, R.T. Widodo, W.A. Wan Ahmad, S. Vethakkan and H.Z. Huri, *Chemokine Like Receptor-1 (CMKLR-1) Receptor: A Potential Therapeutic Target in Management of Chemerin Induced Type 2 Diabetes Mellitus and Cancer.* Curr Pharm Des, 2017. **23**(25): p. 3689-3698.
315. Wang, C., W.K. Wu, X. Liu, K.F. To, G.G. Chen, J. Yu and E.K. Ng, *Increased serum chemerin level promotes cellular invasiveness in gastric cancer: a clinical and experimental study.* Peptides, 2014. **51**: p. 131-8.
316. Gao, C., J. Shi, J. Zhang, Y. Li and Y. Zhang, *Chemerin promotes proliferation and migration of ovarian cancer cells by upregulating expression of PD-L1.* J Zhejiang Univ Sci B, 2022. **23**(2): p. 164-170.
317. Li, J.J., H.K. Yin, D.X. Guan, J.S. Zhao, Y.X. Feng, Y.Z. Deng, X. Wang, N. Li, X.F. Wang, S.Q. Cheng, et al., *Chemerin suppresses hepatocellular carcinoma metastasis through CMKLR1-PTEN-Akt axis.* Br J Cancer, 2018. **118**(10): p. 1337-1348.
318. Kim, H., J.H. Lee, S.K. Lee, N.Y. Song, S.H. Son, K.R. Kim and W.Y. Chung, *Chemerin Treatment Inhibits the Growth and Bone Invasion of Breast Cancer Cells.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
319. Mazzotti, C., V. Gagliostro, D. Bosisio, A. Del Prete, L. Tiberio, M. Thelen and S. Sozzani, *The Atypical Receptor CCRL2 (C-C Chemokine Receptor-Like 2) Does Not Act As a Decoy Receptor in Endothelial Cells.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1233.
320. Degroot, G.N., V. Lepage, M. Parmentier and J.Y. Springael, *The Atypical Chemerin Receptor GPR1 Displays Different Modes of Interaction with β-Arrestins in Humans and Mice with Important Consequences on Subcellular Localization and Trafficking.* Cells, 2022. **11**(6).
321. Lin, Z., W. Li, H. Zhang, W. Wu, Y. Peng, Y. Zeng, Y. Wan, J. Wang and N. Ouyang, *CCL18/PITPNM3 enhances migration, invasion, and EMT through the NF-κB signaling pathway in hepatocellular carcinoma.* Tumour Biol, 2016. **37**(3): p. 3461-8.
322. Chen, J., Y. Yao, C. Gong, F. Yu, S. Su, J. Chen, B. Liu, H. Deng, F. Wang, L. Lin, et al., *CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3.* Cancer Cell, 2011. **19**(4): p. 541-55.
323. Su, S., J. Liao, J. Liu, D. Huang, C. He, F. Chen, L. Yang, W. Wu, J. Chen, L. Lin, et al., *Blocking the recruitment of naive CD4(+) T cells reverses immunosuppression in breast cancer.* Cell Res, 2017. **27**(4): p. 461-482.
324. Li, X.X., J.D. Lee, C. Kemper and T.M. Woodruff, *The Complement Receptor C5aR2: A Powerful Modulator of Innate and Adaptive Immunity.* J Immunol, 2019. **202**(12): p. 3339-3348.
325. Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang and J.D. Lambris, *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis.* Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 785-97.

326. Scola, A.M., K.O. Johswich, B.P. Morgan, A. Klos and P.N. Monk, *The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor.* Mol Immunol, 2009. **46**(6): p. 1149-62.
327. Huang, C., O. Qiu, C. Mao, Z. Hu and S. Qu, *An integrated analysis of C5AR2 related to malignant properties and immune infiltration of gliomas.* Cancer Innov, 2022. **1**(3): p. 240-251.
328. Zhu, Y., X. Wang, Y. Xu, L. Chen, P. Ding, J. Chen and W. Hu, *An Integrated Analysis of C5AR2 Related to Malignant Properties and Immune Infiltration of Breast Cancer.* Front Oncol, 2021. **11**: p. 736725.
329. Zeng, X.-H., Z.-L. Ou, K.-D. Yu, L.-Y. Feng, W.-J. Yin, J. Li, Z.-Z. Shen and Z.-M. Shao, *Coexpression of atypical chemokine binders (ACBs) in breast cancer predicts better outcomes.* Breast Cancer Research and Treatment, 2011. **125**(3): p. 715-727.
330. Maeda, S., S. Kuboki, H. Nojima, H. Shimizu, H. Yoshitomi, K. Furukawa, M. Miyazaki and M. Ohtsuka, *Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expressing in cancer cells inhibits tumor progression by suppressing CXCR2 signaling in human pancreatic ductal adenocarcinoma.* Cytokine, 2017. **95**: p. 12-21.
331. Bianco, A.M., M. Uno, S.M. Oba-Shinjo, C.A. Clara, T.F. de Almeida Galatro, S. Rosemberg, M.J. Teixeira and S.K. Nagahashi Marie, *CXCR7 and CXCR4 Expressions in Infiltrative Astrocytomas and Their Interactions with HIF1α Expression and IDH1 Mutation.* Pathol Oncol Res, 2015. **21**(2): p. 229-40.
332. Birner, P., A. Tchorbanov, S. Natchev, J. Tuettenberg and M. Guentchev, *The chemokine receptor CXCR7 influences prognosis in human glioma in an IDH1-dependent manner.* J Clin Pathol, 2015. **68**(10): p. 830-4.
333. Shen, H., R. Schuster, K.F. Stringer, S.E. Waltz and A.B. Lentsch, *The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth.* Faseb j, 2006. **20**(1): p. 59-64.
334. Lin, J., F. Liang, L. Zheng, J. Zeng and J. Lin, *High expression of ACKR1 predicts a good prognosis and suppresses sarcoma cell progression via regulating the tumor immune microenvironment.* J Appl Genet, 2024. **65**(1): p. 121-136.
335. Savino, B., N. Caronni, A. Anselmo, F. Pasqualini, E.M. Borroni, G. Basso, G. Celesti, L. Laghi, A. Tourlaki, V. Boneschi, et al., *ERK-dependent downregulation of the atypical chemokine receptor D6 drives tumor aggressiveness in Kaposi sarcoma.* Cancer Immunol Res, 2014. **2**(7): p. 679-89.
336. Wu, F.Y., Z.L. Ou, L.Y. Feng, J.M. Luo, L.P. Wang, Z.Z. Shen and Z.M. Shao, *Chemokine decoy receptor d6 plays a negative role in human breast cancer.* Mol Cancer Res, 2008. **6**(8): p. 1276-88.
337. Wu, F.Y., J. Fan, L. Tang, Y.M. Zhao and C.C. Zhou, *Atypical chemokine receptor D6 inhibits human non-small cell lung cancer growth by sequestration of chemokines.* Oncol Lett, 2013. **6**(1): p. 91-95.
338. Xu, S., J. Tang, C. Wang, J. Liu, Y. Fu and Y. Luo, *CXCR7 promotes melanoma tumorigenesis via Src kinase signaling.* Cell Death Dis, 2019. **10**(3): p. 191.
339. Li, S., K.W. Fong, G. Gritsina, A. Zhang, J.C. Zhao, J. Kim, A. Sharp, W. Yuan, C. Aversa, X.J. Yang, et al., *Activation of MAPK Signaling by CXCR7 Leads to Enzalutamide Resistance in Prostate Cancer.* Cancer Res, 2019. **79**(10): p. 2580-2592.

340. Hoy, J.J., G. Kallifatidis, D.K. Smith and B.L. Lokeshwar, *Inhibition of androgen receptor promotes CXC-chemokine receptor 7-mediated prostate cancer cell survival.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3058.
341. Sun, X., G. Cheng, M. Hao, J. Zheng, X. Zhou, J. Zhang, R.S. Taichman, K.J. Pienta and J. Wang, *CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression.* Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(4): p. 709-22.
342. Wu, Y.C., S.J. Tang, G.H. Sun and K.H. Sun, *CXCR7 mediates TGFβ1-promoted EMT and tumor-initiating features in lung cancer.* Oncogene, 2016. **35**(16): p. 2123-32.
343. Burns, J.M., B.C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M.E. Penfold, M.J. Sunshine, D.R. Littman, C.J. Kuo, et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development.* J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
344. Ieranò, C., S. Santagata, M. Napolitano, F. Guardia, A. Grimaldi, E. Antignani, G. Botti, C. Consales, A. Riccio, M. Nanayakkara, et al., *CXCR4 and CXCR7 transduce through mTOR in human renal cancer cells.* Cell Death Dis, 2014. **5**(7): p. e1310.
345. Feng, L.Y., Z.L. Ou, F.Y. Wu, Z.Z. Shen and Z.M. Shao, *Involvement of a novel chemokine decoy receptor CCX-CKR in breast cancer growth, metastasis and patient survival.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 2962-70.
346. Shi, J.Y., L.X. Yang, Z.C. Wang, L.Y. Wang, J. Zhou, X.Y. Wang, G.M. Shi, Z.B. Ding, A.W. Ke, Z. Dai, et al., *CC chemokine receptor-like 1 functions as a tumour suppressor by impairing CCR7-related chemotaxis in hepatocellular carcinoma.* J Pathol, 2015. **235**(4): p. 546-58.
347. Bandyopadhyay, S., R. Zhan, A. Chaudhuri, M. Watabe, S.K. Pai, S. Hirota, S. Hosobe, T. Tsukada, K. Miura, Y. Takano, et al., *Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression.* Nat Med, 2006. **12**(8): p. 933-8.
348. Sjöberg, E., M. Meyrath, L. Milde, M. Herrera, J. Lövrot, D. Hägerstrand, O. Frings, M. Bartish, C. Rolny, E. Sonnhammer, et al., *A Novel ACKR2-Dependent Role of Fibroblast-Derived CXCL14 in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis of Breast Cancer.* Clin Cancer Res, 2019. **25**(12): p. 3702-3717.
349. Chang, T.M., Y.C. Chiang, C.W. Lee, C.M. Lin, M.L. Fang, M.C. Chi, J.F. Liu and Y.R. Kou, *CXCL14 promotes metastasis of non-small cell lung cancer through ACKR2-depended signaling pathway.* Int J Biol Sci, 2023. **19**(5): p. 1455-1470.
350. Massara, M., O. Bonavita, B. Savino, N. Caronni, V. Mollica Poeta, M. Sironi, E. Setten, C. Recordati, L. Crisafulli, F. Ficara, et al., *ACKR2 in hematopoietic precursors as a checkpoint of neutrophil release and anti-metastatic activity.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 676.
351. Miao, Z., K.E. Luker, B.C. Summers, R. Berahovich, M.S. Bhojani, A. Rehemtulla, C.G. Kleer, J.J. Essner, A. Nasevicius, G.D. Luker, et al., *CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15735-40.
352. Xue, T.C., R.X. Chen, Z.G. Ren, J.H. Zou, Z.Y. Tang and S.L. Ye, *Transmembrane receptor CXCR7 increases the risk of extrahepatic metastasis of relatively well-differentiated hepatocellular carcinoma through upregulation of osteopontin.* Oncol Rep, 2013. **30**(1): p. 105-10.

353. Puddinu, V., S. Casella, E. Radice, S. Thelen, S. Dirnhofer, F. Bertoni and M. Thelen *ACKR3 expression on diffuse large B cell lymphoma is required for tumor spreading and tissue infiltration*. Oncotarget, 2017. **8**, 85068-85084 DOI: 10.18632/oncotarget.18844.
354. Benhadjeba, S., L. Edjekouane, K. Sauvé, E. Carmona and A. Tremblay, *Feedback control of the CXCR7/CXCL11 chemokine axis by estrogen receptor α in ovarian cancer.* Mol Oncol, 2018. **12**(10): p. 1689-1705.
355. Grymula, K., M. Tarnowski, M. Wysoczynski, J. Drukala, F.G. Barr, J. Ratajczak, M. Kucia and M.Z. Ratajczak, *Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas.* Int J Cancer, 2010. **127**(11): p. 2554-68.
356. Hernandez, L., M.A. Magalhaes, S.J. Coniglio, J.S. Condeelis and J.E. Segall, *Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis.* Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. R128.
357. Zhu, Y., W. Tang, Y. Liu, G. Wang, Z. Liang and L. Cui, *CCX-CKR expression in colorectal cancer and patient survival.* Int J Biol Markers, 2014. **29**(1): p. e40-8.
358. Harata-Lee, Y., M.E. Turvey, J.A. Brazzatti, C.E. Gregor, M.P. Brown, M.J. Smyth, I. Comerford and S.R. McColl, *The atypical chemokine receptor CCX-CKR regulates metastasis of mammary carcinoma via an effect on EMT.* Immunol Cell Biol, 2014. **92**(10): p. 815-24.
359. Wang, J., Z.L. Ou, Y.F. Hou, J.M. Luo, Z.Z. Shen, J. Ding and Z.M. Shao, *Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential.* Oncogene, 2006. **25**(54): p. 7201-11.
360. Addison, C.L., J.A. Belperio, M.D. Burdick and R.M. Strieter, *Overexpression of the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) by NSCLC tumor cells results in increased tumor necrosis.* BMC Cancer, 2004. **4**: p. 28.
361. Horton, L.W., Y. Yu, S. Zaja-Milatovic, R.M. Strieter and A. Richmond, *Opposing roles of murine duffy antigen receptor for chemokine and murine CXC chemokine receptor-2 receptors in murine melanoma tumor growth.* Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9791-9.
362. Dai, X., Y. Tan, S. Cai, X. Xiong, L. Wang, Q. Ye, X. Yan, K. Ma and L. Cai, *The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells.* J Cell Mol Med, 2011. **15**(6): p. 1299-309.
363. Maishi, N., N. Ohga, Y. Hida, K. Akiyama, K. Kitayama, T. Osawa, Y. Onodera, N. Shinohara, K. Nonomura, M. Shindoh and K. Hida, *CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma.* Pathol Int, 2012. **62**(5): p. 309-17.
364. Rot, A., C. McKimmie, C.L. Burt, K.J. Pallas, T. Jamieson, M. Pruenster, R. Horuk, R.J.B. Nibbs and G.J. Graham, *Cell-autonomous regulation of neutrophil migration by the D6 chemokine decoy receptor.* J Immunol, 2013. **190**(12): p. 6450-6456.
365. Hansell, C.A.H., A.R. Fraser, A.J. Hayes, M. Pingen, C.L. Burt, K.M. Lee, L. Medina-Ruiz, D. Brownlie, M.K.L. Macleod, P. Burgoyne, et al., *The Atypical Chemokine Receptor Ackr2 Constrains NK Cell Migratory Activity and Promotes Metastasis.* J Immunol, 2018. **201**(8): p. 2510-2519.
366. Friess, M.C., I. Kritikos, P. Schineis, J.D. Medina-Sanchez, A.O. Gkountidi, A. Vallone, E.C. Sigmund, C. Schwitter, M. Vranova, C. Matti, et al., *Mechanosensitive ACKR4 scavenges CCR7 chemokines to facilitate T cell de-*

adhesion and passive transport by flow in inflamed afferent lymphatics. Cell Rep, 2022. **38**(5): p. 110334.
367. Bastow, C.R., M.D. Bunting, E.E. Kara, D.R. McKenzie, A. Caon, S. Devi, L. Tolley, S.N. Mueller, I.H. Frazer, N. Harvey, et al., *Scavenging of soluble and immobilized CCL21 by ACKR4 regulates peripheral dendritic cell emigration.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(17).
368. Whyte, C.E., M. Osman, E.E. Kara, C. Abbott, J. Foeng, D.R. McKenzie, K.A. Fenix, Y. Harata-Lee, K.L. Foyle, S.T. Boyle, et al., *ACKR4 restrains antitumor immunity by regulating CCL21.* J Exp Med, 2020. **217**(6).
369. Liu, H., W. Xue, G. Ge, X. Luo, Y. Li, H. Xiang, X. Ding, P. Tian and X. Tian, *Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1α in MSCs.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **401**(4): p. 509-15.
370. Yamada, K., N. Maishi, K. Akiyama, M. Towfik Alam, N. Ohga, T. Kawamoto, M. Shindoh, N. Takahashi, T. Kamiyama, Y. Hida, et al., *CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property.* Int J Cancer, 2015. **137**(12): p. 2825-36.
371. Jiang, C.Y., L.W. Wu, Y.W. Liu, B. Feng, L.C. Ye, X. Huang, Y.Y. He, Y. Shen, Y.F. Zhu, X.L. Zhou, et al., *Identification of ACKR4 as an immune checkpoint in pulmonary arterial hypertension.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1153573.
372. Bailey, T.L. and W.S. Noble, *Searching for statistically significant regulatory modules.* Bioinformatics, 2003. **19**(suppl_2): p. ii16-ii25.
373. Sandelin, A., W. Alkema, P. Engström, W.W. Wasserman and B. Lenhard, *JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D91-4.
374. Nagaraj, N.S., N. Vigneswaran and W. Zacharias, *Hypoxia-mediated apoptosis in oral carcinoma cells occurs via two independent pathways.* Molecular Cancer, 2004. **3**(1): p. 38.
375. Hompland, T., C.S. Fjeldbo and H. Lyng, *Tumor Hypoxia as a Barrier in Cancer Therapy: Why Levels Matter.* Cancers (Basel), 2021. **13**(3).
376. Bencokova, Z., M.R. Kaufmann, I.M. Pires, P.S. Lecane, A.J. Giaccia and E.M. Hammond, *ATM activation and signaling under hypoxic conditions.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(2): p. 526-37.
377. Liu, Q., V.A.C. Palmgren, E.H.J. Danen and S.E. Le Dévédec, *Acute vs. chronic vs. intermittent hypoxia in breast Cancer: a review on its application in in vitro research.* Molecular Biology Reports, 2022. **49**(11): p. 10961-10973.
378. Murthy, A., S.A. Gerber, C.J. Koch and E.M. Lord, *Intratumoral Hypoxia Reduces IFN-γ-Mediated Immunity and MHC Class I Induction in a Preclinical Tumor Model.* Immunohorizons, 2019. **3**(4): p. 149-160.
379. Fra, A.M., M. Locati, K. Otero, M. Sironi, P. Signorelli, M.L. Massardi, M. Gobbi, A. Vecchi, S. Sozzani and A. Mantovani, *Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6.* J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2279-82.
380. Locati, M., Y.M. Torre, E. Galliera, R. Bonecchi, H. Bodduluri, G. Vago, A. Vecchi and A. Mantovani, *Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines.* Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(6): p. 679-86.

381. Malekan, M., M.A. Ebrahimzadeh and F. Sheida, *The role of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and its signaling in melanoma.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021. **141**: p. 111873.
382. D'Aguanno, S., F. Mallone, M. Marenco, D. Del Bufalo and A. Moramarco, *Hypoxia-dependent drivers of melanoma progression.* Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2021. **40**(1): p. 159.
383. O'Connell, M.P., K. Marchbank, M.R. Webster, A.A. Valiga, A. Kaur, A. Vultur, L. Li, M. Herlyn, J. Villanueva, Q. Liu, et al., *Hypoxia induces phenotypic plasticity and therapy resistance in melanoma via the tyrosine kinase receptors ROR1 and ROR2.* Cancer Discov, 2013. **3**(12): p. 1378-93.
384. Dratkiewicz, E., A. Simiczyjew, J. Mazurkiewicz, M. Ziętek, R. Matkowski and D. Nowak, *Hypoxia and Extracellular Acidification as Drivers of Melanoma Progression and Drug Resistance.* Cells, 2021. **10**(4).
385. Qi, L., J. Chen, Y. Yang and W. Hu, *Hypoxia Correlates With Poor Survival and M2 Macrophage Infiltration in Colorectal Cancer.* Frontiers in Oncology, 2020. **10**.
386. Tang, Y., X. Weng, C. Liu, X. Li and C. Chen, *Hypoxia Enhances Activity and Malignant Behaviors of Colorectal Cancer Cells through the STAT3/MicroRNA-19a/PTEN/PI3K/AKT Axis.* Anal Cell Pathol (Amst), 2021. **2021**: p. 4132488.
387. Mi, Y., L. Mu, K. Huang, Y. Hu, C. Yan, H. Zhao, C. Ma, X. Li, D. Tao and J. Qin, *Hypoxic colorectal cancer cells promote metastasis of normoxic cancer cells depending on IL-8/p65 signaling pathway.* Cell Death & Disease, 2020. **11**(7): p. 610.
388. Xu, K., Y. Zhan, Z. Yuan, Y. Qiu, H. Wang, G. Fan, J. Wang, W. Li, Y. Cao, X. Shen, et al., *Hypoxia Induces Drug Resistance in Colorectal Cancer through the HIF-1α/miR-338-5p/IL-6 Feedback Loop.* Mol Ther, 2019. **27**(10): p. 1810-1824.
389. Liu, L., J. Bai, L. Hu and D. Jiang, *Hypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1α in triple-negative breast cancer: A review.* Medicine (Baltimore), 2023. **102**(43): p. e35493.
390. Ferrari, P., C. Scatena, M. Ghilli, I. Bargagna, G. Lorenzini and A. Nicolini, *Molecular Mechanisms, Biomarkers and Emerging Therapies for Chemotherapy Resistant TNBC.* Int J Mol Sci, 2022. **23**(3).
391. Koukourakis, M.I., S.M. Bentzen, A. Giatromanolaki, G.D. Wilson, F.M. Daley, M.I. Saunders, S. Dische, E. Sivridis and A.L. Harris, *Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial.* J Clin Oncol, 2006. **24**(5): p. 727-35.
392. Jing, X., F. Yang, C. Shao, K. Wei, M. Xie, H. Shen and Y. Shu, *Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment.* Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 157.
393. Hill, R.M., M. Fok, G. Grundy, J.L. Parsons and S. Rocha, *The role of autophagy in hypoxia-induced radioresistance.* Radiother Oncol, 2023. **189**: p. 109951.
394. El-Guindy, D.M., F.M. Ibrahim, D.A. Ali, H.E. El-Horany, N.M. Sabry, R.A. Elkholy, W. Mansour and D.S. Helal, *Hypoxia-induced autophagy in triple negative breast cancer: association with prognostic variables, patients' survival and response to neoadjuvant chemotherapy.* Virchows Arch, 2023. **482**(5): p. 823-837.

395. Shang, L., S. Chen, F. Du, S. Li, L. Zhao and X. Wang, *Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 4788-93.
396. Bjørkøy, G., T. Lamark, S. Pankiv, A. Øvervatn, A. Brech and T. Johansen, *Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1.* Methods Enzymol, 2009. **452**: p. 181-97.
397. Tan, E.Y., M. Yan, L. Campo, C. Han, E. Takano, H. Turley, I. Candiloro, F. Pezzella, K.C. Gatter, E.K.A. Millar, et al., *The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy.* British Journal of Cancer, 2009. **100**(2): p. 405-411.
398. Li, T., J. Fu, Z. Zeng, D. Cohen, J. Li, Q. Chen, B. Li and X.S. Liu, *TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells.* Nucleic Acids Res, 2020. **48**(W1): p. W509-w514.
399. Abou Khouzam, R., S.P. Rao, G.H. Venkatesh, N.A. Zeinelabdin, S. Buart, M. Meylan, M. Nimmakayalu, S. Terry and S. Chouaib, *An Eight-Gene Hypoxia Signature Predicts Survival in Pancreatic Cancer and Is Associated With an Immunosuppressed Tumor Microenvironment.* Frontiers in Immunology, 2021. **12**.
400. Kaluz, S., M. Kaluzová, S.Y. Liao, M. Lerman and E.J. Stanbridge, *Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show?* Biochim Biophys Acta, 2009. **1795**(2): p. 162-72.
401. Ponnaluri, V.K., D.T. Vavilala, S. Prakash and M. Mukherji, *Hypoxia mediated expression of stem cell markers in VHL-associated hemangioblastomas.* Biochem Biophys Res Commun, 2013. **438**(1): p. 71-7.
402. Infantino, V., A. Santarsiero, P. Convertini, S. Todisco and V. Iacobazzi, *Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
403. Wherry, E.J., S.-J. Ha, S.M. Kaech, W.N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J.N. Blattman, D.L. Barber and R. Ahmed, *Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection.* Immunity, 2007. **27**(4): p. 670-684.
404. Kim, J.W., I. Tchernyshyov, G.L. Semenza and C.V. Dang, *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia.* Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 177-85.
405. Li, X., Y. Li, S. Bai, J. Zhang, Z. Liu and J. Yang, *NR2F1-AS1/miR-140/HK2 Axis Regulates Hypoxia-Induced Glycolysis and Migration in Hepatocellular Carcinoma.* Cancer Manag Res, 2021. **13**: p. 427-437.
406. Cao, L., M. Wang, Y. Dong, B. Xu, J. Chen, Y. Ding, S. Qiu, L. Li, E. Karamfilova Zaharieva, X. Zhou and Y. Xu, *Circular RNA circRNF20 promotes breast cancer tumorigenesis and Warburg effect through miR-487a/HIF-1α/HK2.* Cell Death Dis, 2020. **11**(2): p. 145.
407. Baumann, S., J. Hess, S.T. Eichhorst, A. Krueger, P. Angel, P.H. Krammer and S. Kirchhoff, *An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells.* Oncogene, 2003. **22**(9): p. 1333-9.
408. Qi, X., N.M. Pohl, M. Loesch, S. Hou, R. Li, J.Z. Qin, A. Cuenda and G. Chen, *p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-*

proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31398-408.
409. Wang, X., C.H. McGowan, M. Zhao, L. He, J.S. Downey, C. Fearns, Y. Wang, S. Huang and J. Han, *Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4543-52.
410. Angiolillo, A.L., C. Sgadari, D.D. Taub, F. Liao, J.M. Farber, S. Maheshwari, H.K. Kleinman, G.H. Reaman and G. Tosato, *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo.* J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 155-62.
411. Romagnani, P., F. Annunziato, E. Lazzeri, L. Cosmi, C. Beltrame, L. Lasagni, G. Galli, M. Francalanci, R. Manetti, F. Marra, et al., *Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCRgammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus.* Blood, 2001. **97**(3): p. 601-7.
412. Sidahmed, A.M., A.J. León, S.E. Bosinger, D. Banner, A. Danesh, M.J. Cameron and D.J. Kelvin, *CXCL10 contributes to p38-mediated apoptosis in primary T lymphocytes in vitro.* Cytokine, 2012. **59**(2): p. 433-41.
413. Szpakowska, M., G. D'Uonnolo, R. Luís, A. Alonso Bartolomé, M. Thelen, D.F. Legler and A. Chevigné, *New pairings and deorphanization among the atypical chemokine receptor family - physiological and clinical relevance.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1133394.
414. Ganchi, P.A., S.C. Sun, W.C. Greene and D.W. Ballard, *I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding.* Mol Biol Cell, 1992. **3**(12): p. 1339-52.
415. Meurette, O. and P. Mehlen, *Notch Signaling in the Tumor Microenvironment.* Cancer Cell, 2018. **34**(4): p. 536-548.
416. Ferreira, A. and J.C. Aster, *Notch signaling in cancer: Complexity and challenges on the path to clinical translation.* Semin Cancer Biol, 2022. **85**: p. 95-106.
417. Dotto, G.P., *Notch tumor suppressor function.* Oncogene, 2008. **27**(38): p. 5115-23.
418. Jiang, H., H. Wei, H. Wang, Z. Wang, J. Li, Y. Ou, X. Xiao, W. Wang, A. Chang, W. Sun, et al., *Zeb1-induced metabolic reprogramming of glycolysis is essential for macrophage polarization in breast cancer.* Cell Death Dis, 2022. **13**(3): p. 206.
419. Krebs, A.M., J. Mitschke, M. Lasierra Losada, O. Schmalhofer, M. Boerries, H. Busch, M. Boettcher, D. Mougiakakos, W. Reichardt, P. Bronsert, et al., *The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer.* Nat Cell Biol, 2017. **19**(5): p. 518-529.
420. Yoshimoto, S., F. Tanaka, H. Morita, A. Hiraki and S. Hashimoto, *Hypoxia-induced HIF-1α and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma via TGF-β-dependent EMT.* Cancer Med, 2019. **8**(18): p. 7822-7832.
421. Gao, Y., Y. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, X. Liu, P. Geng, B. Huang, Y. Zhang and J. Lu, *The dual function of PRMT1 in modulating epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence in breast cancer cells through regulation of ZEB1.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 19874.
422. Riedl, A., M. Schlederer, K. Pudelko, M. Stadler, S. Walter, D. Unterleuthner, C. Unger, N. Kramer, M. Hengstschläger, L. Kenner, et al., *Comparison of cancer cells*

in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. J Cell Sci, 2017. **130**(1): p. 203-218.
423. Melnikova, V., S. Bolshakov, C. Walker and H. Ananthaswamy, *Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines.* Oncogene, 2004. **23**: p. 2347-56.
424. Lee, S., J. Kang, M. Cho, E. Seo, H. Choi, E. Kim, J. Kim, H. Kim, G.Y. Kang, K.P. Kim, et al., *Profiling of transcripts and proteins modulated by K-ras oncogene in the lung tissues of K-ras transgenic mice by omics approaches.* Int J Oncol, 2009. **34**(1): p. 161-72.
425. Czerwinski, M., J. Kern, M. Grodecka, M. Paprocka, A. Krop-Watorek and K. Wasniowska, *Mutational analysis of the N-glycosylation sites of Duffy antigen/receptor for chemokines.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **356**(3): p. 816-821.
426. Groux-Degroote, S., F. Foulquier, S. Cavdarli and P. Delannoy, *Les mécanismes de régulation de la glycosylation.* Med Sci (Paris), 2021. **37**(6-7): p. 609-617.
427. Chandler, K.B., D.R. Leon, J. Kuang, R.D. Meyer, N. Rahimi and C.E. Costello, *N-Glycosylation regulates ligand-dependent activation and signaling of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2).* J Biol Chem, 2019. **294**(35): p. 13117-13130.
428. Lin, Y. and D.M. Lubman, *The role of N-glycosylation in cancer.* Acta Pharmaceutica Sinica B, 2024. **14**(3): p. 1098-1110.
429. Zhang, D., L. Yang, X. Liu, J. Gao, T. Liu, Q. Yan and X. Yang, *Hypoxia modulates stem cell properties and induces EMT through N-glycosylation of EpCAM in breast cancer cells.* J Cell Physiol, 2020. **235**(4): p. 3626-3633.
430. Rego, S.L., R.S. Helms and D. Dréau, *Breast tumor cell TACE-shed MCSF promotes pro-angiogenic macrophages through NF-κB signaling.* Angiogenesis, 2014. **17**(3): p. 573-85.
431. McKimmie, C.S., M.D. Singh, K. Hewit, O. Lopez-Franco, M. Le Brocq, S. Rose-John, K.M. Lee, A.H. Baker, R. Wheat, D.J. Blackbourn, et al., *An analysis of the function and expression of D6 on lymphatic endothelial cells.* Blood, 2013. **121**(18): p. 3768-77.
432. de Heer, E.C., M. Jalving and A.L. Harris, *HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer.* J Clin Invest, 2020. **130**(10): p. 5074-5087.
433. Lequeux, A., *Impact of Targeting the Binding Domain of HIF-1α to HIF-1β on the Immune Landscape of Melanoma*

Impact du ciblage du domaine de liaison de HIF-1α avec HIF-1β sur le paysage immunitaire du mélanome. 2020, Université Paris-Saclay.
434. Aguilera, K.Y. and R.A. Brekken, *Hypoxia Studies with Pimonidazole in vivo.* Bio Protoc, 2014. **4**(19).
435. Bonecchi, R., B. Savino, N. Caronni, G. Celesti, A. Mantovani and M. Locati, *Atypical chemokine receptor 2: a brake against Kaposi's sarcoma aggressiveness.* Oncoimmunology, 2014. **3**(12): p. e955337.
436. Pacifico, F., A. Lepore, S. Mellone, L. Sanguigno, G. Federico, A. Greco, A. Brunetti and A. Leonardi, *The chemokine scavenging receptor D6/ACKR2 is a target of miR-146a in thyroid cancer.* Genes Cancer, 2017. **8**(5-6): p. 577-588.

437. Dong, H., S. Zhou, X. Chen, X. Deng and A. Fang, *Pan-cancer analysis of the prognostic significance of ACKR2 expression and the related genetic/epigenetic dysregulations.* Expert Rev Clin Immunol, 2024. **20**(2): p. 225-236.
438. da Silva, J.M., T.P.M. Dos Santos, A.M. Saraiva, A.L. Fernandes de Oliveira, G.P. Garlet, A.C. Batista, R.A. de Mesquita, R.C. Russo and T.A. da Silva, *Role of atypical chemokine receptor ACKR2 in experimental oral squamous cell carcinogenesis.* Cytokine, 2019. **118**: p. 160-167.
439. Zhang, Q., N. Zhou, W. Wang and S. Zhou, *A Novel Autocrine CXCL14/ACKR2 Axis: The Achilles' Heel of Cancer Metastasis?* Clin Cancer Res, 2019. **25**(12): p. 3476-3478.
440. Yang, L., S. Zhang and P. Pu, *Comprehensive analysis of ACKR family members in breast cancer using prognostic values.* Oncol Lett, 2023. **26**(4): p. 425.
441. Chakera, A., R.M. Seeber, A.E. John, K.A. Eidne and D.R. Greaves, *The duffy antigen/receptor for chemokines exists in an oligomeric form in living cells and functionally antagonizes CCR5 signaling through hetero-oligomerization.* Mol Pharmacol, 2008. **73**(5): p. 1362-70.
442. Melgrati, S., O.J. Gerken, M. Artinger, E. Radice, M. Szpakowska, A. Chevigné, G. D'Uonnolo, P. Antonello, S. Thelen, P. Pelczar, et al., *GPR182 is a broadly scavenging atypical chemokine receptor influencing T-independent immunity.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1242531.
443. Bonnavion, R., S. Liu, H. Kawase, K.A. Roquid and S. Offermanns, *Large chemokine binding spectrum of human and mouse atypical chemokine receptor GPR182 (ACKR5).* Front Pharmacol, 2023. **14**: p. 1297596.
444. Lee, K. and H.M. Kim, *A novel approach to cancer therapy using PX-478 as a HIF-1α inhibitor.* Arch Pharm Res, 2011. **34**(10): p. 1583-5.
445. Zhu, Y., Y. Zang, F. Zhao, Z. Li, J. Zhang, L. Fang, M. Li, L. Xing, Z. Xu and J. Yu, *Inhibition of HIF-1α by PX-478 suppresses tumor growth of esophageal squamous cell cancer in vitro and in vivo.* Am J Cancer Res, 2017. **7**(5): p. 1198-1212.
446. Jacoby, J.J., B. Erez, M.V. Korshunova, R.R. Williams, K. Furutani, O. Takahashi, L. Kirkpatrick, S.M. Lippman, G. Powis, M.S. O'Reilly and R.S. Herbst, *Treatment with HIF-1alpha antagonist PX-478 inhibits progression and spread of orthotopic human small cell lung cancer and lung adenocarcinoma in mice.* J Thorac Oncol, 2010. **5**(7): p. 940-9.
447. Li, S.H., D.H. Shin, Y.S. Chun, M.K. Lee, M.S. Kim and J.W. Park, *A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1{alpha}.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(12): p. 3729-38.
448. Cheng, Y., W. Li, Y. Liu, H.C. Cheng, J. Ma and L. Qiu, *YC-1 exerts inhibitory effects on MDA-MB-468 breast cancer cells by targeting EGFR in vitro and in vivo under normoxic condition.* Chin J Cancer, 2012. **31**(5): p. 248-56.
449. Sun, H.L., Y.N. Liu, Y.T. Huang, S.L. Pan, D.Y. Huang, J.H. Guh, F.Y. Lee, S.C. Kuo and C.M. Teng, *YC-1 inhibits HIF-1 expression in prostate cancer cells: contribution of Akt/NF-kappaB signaling to HIF-1alpha accumulation during hypoxia.* Oncogene, 2007. **26**(27): p. 3941-51.
450. Li, Y., M.Z. Zhang, S.J. Zhang, X. Sun, C. Zhou, J. Li, J. Liu, J. Feng, S.Y. Lu, L. Pei-Jun and J.C. Wang, *HIF-1α inhibitor YC-1 suppresses triple-negative breast cancer growth and angiogenesis by targeting PlGF/VEGFR1-induced macrophage polarization.* Biomed Pharmacother, 2023. **161**: p. 114423.

451. Moon, S.Y., H.W. Chang, J.L. Roh, G.C. Kim, S.H. Choi, S.W. Lee, K.J. Cho, S.Y. Nam and S.Y. Kim, *Using YC-1 to overcome the radioresistance of hypoxic cancer cells.* Oral Oncol, 2009. **45**(10): p. 915-9.
452. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy.* Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(4): p. 207-14.
453. Badar, T., D.R. Handisides, J.M. Benito, M.A. Richie, G. Borthakur, E. Jabbour, K. Harutyunyan, S. Konoplev, S. Faderl, S. Kroll, et al., *Phase I study of evofosfamide, an investigational hypoxia-activated prodrug, in patients with advanced leukemia.* Am J Hematol, 2016. **91**(8): p. 800-5.
454. Portwood, S., D. Lal, Y.C. Hsu, R. Vargas, M.K. Johnson, M. Wetzler, C.P. Hart and E.S. Wang, *Activity of the hypoxia-activated prodrug, TH-302, in preclinical human acute myeloid leukemia models.* Clin Cancer Res, 2013. **19**(23): p. 6506-19.
455. Huang, Y., Y. Tian, Y. Zhao, C. Xue, J. Zhan, L. Liu, X. He and L. Zhang, *Efficacy of the hypoxia-activated prodrug evofosfamide (TH-302) in nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo.* Cancer Commun (Lond), 2018. **38**(1): p. 15.
456. Yoon, C., H.J. Lee, D.J. Park, Y.J. Lee, W.D. Tap, T.S. Eisinger-Mathason, C.P. Hart, E. Choy, M.C. Simon and S.S. Yoon, *Hypoxia-activated chemotherapeutic TH-302 enhances the effects of VEGF-A inhibition and radiation on sarcomas.* Br J Cancer, 2015. **113**(1): p. 46-56.
457. Wang, Z., M. Zhu, R. Dong, D. Cao, Y. Li, Z. Chen, J. Cai and X. Zuo, *TH-302-loaded nanodrug reshapes the hypoxic tumour microenvironment and enhances PD-1 blockade efficacy in gastric cancer.* J Nanobiotechnology, 2023. **21**(1): p. 440.
458. Tharmalingham, H. and P. Hoskin, *Clinical trials targeting hypoxia.* Br J Radiol, 2019. **92**(1093): p. 20170966.
459. Zabel, B.A., Y. Wang, S. Lewén, R.D. Berahovich, M.E. Penfold, P. Zhang, J. Powers, B.C. Summers, Z. Miao, B. Zhao, et al., *Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands.* J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3204-11.
460. Gravel, S., C. Malouf, P.E. Boulais, Y.A. Berchiche, S. Oishi, N. Fujii, R. Leduc, D. Sinnett and N. Heveker, *The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains.* J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 37939-43.
461. Chevigné, A., V. Fievez, J.C. Schmit and S. Deroo, *Engineering and screening the N-terminus of chemokines for drug discovery.* Biochem Pharmacol, 2011. **82**(10): p. 1438-56.
462. Maussang, D., A. Mujić-Delić, F.J. Descamps, C. Stortelers, P. Vanlandschoot, M. Stigter-van Walsum, H.F. Vischer, M. van Roy, M. Vosjan, M. Gonzalez-Pajuelo, et al., *Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo.* J Biol Chem, 2013. **288**(41): p. 29562-72.

ANNEXE I

Xiao M†, **Benoit A**†, Hasmim M, Duhem C, Vogin G, Berchem G, Noman MZ, Janji B. **Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies**. *Front Oncol*. **2021** Feb 25;11:626309.

Contribution à l'article

Dans la revue intitulée « **Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies** » publiée en 2021 dans Frontiers in Oncology, j'ai rédigé la section « **IMPACT OF TARGETING AUTOPHAGOSOME-LYSOSOME FUSION ON THE RESPONSE TO VARIOUS ANTICANCER THERAPIES** » et j'ai participé à la révision du manuscrit entier.

frontiers in Oncology

REVIEW
published: 25 February 2021
doi: 10.3389/fonc.2021.626309

Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies

Malina Xiao[1†], *Alice Benoit*[1†], *Meriem Hasmim*[1], *Caroline Duhem*[2], *Guillaume Vogin*[3,4], *Guy Berchem*[1,2], *Muhammad Zaeem Noman*[1†] *and Bassam Janji*[1*†]

[1] Tumor Immunotherapy and Microenvironment (TIME) Group, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health (LIH), Luxembourg City, Luxembourg, [2] Department of Hemato-oncology, Centre Hospitalier du Luxembourg, Luxembourg City, Luxembourg, [3] Université de Lorraine - UMR 7365, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Vandoeuvre-lès-Nancy, France, [4] Centre François Baclesse, Esch-sur-Alzette, Luxembourg

Autophagy is a highly regulated multi-step process that occurs at the basal level in almost all cells. Although the deregulation of the autophagy process has been described in several pathologies, the role of autophagy in cancer as a cytoprotective mechanism is currently well established and supported by experimental and clinical evidence. Our understanding of the molecular mechanism of the autophagy process has largely contributed to defining how we can harness this process to improve the benefit of cancer therapies. While the role of autophagy in tumor resistance to chemotherapy is extensively documented, emerging data point toward autophagy as a mechanism of cancer resistance to radiotherapy, targeted therapy, and immunotherapy. Therefore, manipulating autophagy has emerged as a promising strategy to overcome tumor resistance to various anti-cancer therapies, and autophagy modulators are currently evaluated in combination therapies in several clinical trials. In this review, we will summarize our current knowledge of the impact of genetically and pharmacologically modulating autophagy genes and proteins, involved in the different steps of the autophagy process, on the therapeutic benefit of various cancer therapies. We will also briefly discuss the challenges and limitations to developing potent and selective autophagy inhibitors that could be used in ongoing clinical trials.

Keywords: autophagy, cancer resistance, chemotherapy, radiotherapy, targeted therapy, immunotherapy

OPEN ACCESS

Edited by:
Waleska Kerllen Martins, Universidade Anhanguera de São Paulo, Brazil

Reviewed by:
Keith R. Laderoute, SRI International, United States
Yi Ding, Geisinger Health System, United States

***Correspondence:**
Bassam Janji
bassam.janji@lih.lu

[†]*These authors have contributed equally to this work*

Specialty section:
This article was submitted to Molecular and Cellular Oncology, a section of the journal Frontiers in Oncology

Received: *05 November 2020*
Accepted: *15 January 2021*
Published: *25 February 2021*

Citation:
Xiao M, Benoit A, Hasmim M, Duhem C, Vogin G, Berchem G, Noman MZ and Janji B (2021) Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies. Front. Oncol. 11:626309. doi: 10.3389/fonc.2021.626309

INTRODUCTION

Macroautophagy (referred to as autophagy) was first described in 1966 as a cellular process that occurs at the basal level in all cells (1). Autophagy relies on the formation of double-membraned vesicles known as autophagosomes, leading to the degradation of their cargo, such as damaged proteins or organelles (2). The autophagy process involves more than thirteen autophagy-related (ATG) proteins and requires the following major steps: (i) Initiation, (ii) Nucleation, (iii) Maturation, and (iv) Fusion with lysosome for cargo degradation (**Figure 1**). Originally described as a bulk degradation process, autophagy is now described as a highly selective degradation mechanism for the recycling of cellular components. Autophagy can be activated as an adaptive cellular response to external stimuli such as hypoxia, starvation, and different cancer therapies and therefore considered as a cytoprotective mechanism (1, 3–5).

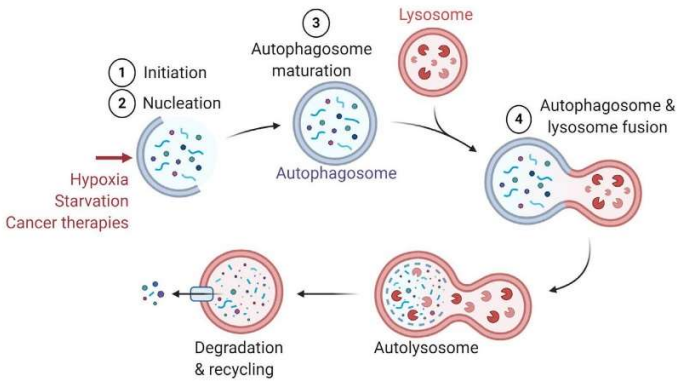


FIGURE 1 | General presentation of the major steps of autophagy. Several stimuli have been identified to induce autophagy such as hypoxia, starvation, and cancer therapies. The major steps of autophagy are: 1) Initiation, 2) Nucleation, 3) Maturation, and 4) Fusion with lysosome for the degradation and recycling of autophagosome constituents.

Autophagy is activated under nutrient deprivation or starvation condition, which resulted in a decrease of mTOR activity and an increase of Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) activation. Activated ULK1 is subsequently dissociated from the 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), resulting in autophagy activation (6, 7). In addition to starvation, autophagy can also be activated in the tumor microenvironment by hypoxia through the hypoxia-inducible factor 1-α (HIF-α). The accumulation of HIF-1α in hypoxic cells activates the expression of BNIP/BNIP3L, which subsequently dissociates the complex between Bcl-2 and Beclin-1 (BECN1) to activate autophagy (8).

Autophagy was primarily considered as a tumor suppressive mechanism. Such a role was supported by studies showing that targeting BECN1, ATG5, and ATG7 promotes tumor initiation (9–11). In particular, evidences have demonstrated that Everolimus, an mTOR inhibitor and analogue of rapamycin, significantly increases mice survival in acute lymphoblastic leukemia in combination with Vincristine (12, 13). Conversely, many groups highlight the tumor supportive role of autophagy by showing its role in promoting tumor cell survival and growth in multiple tumor types (14, 15). The consensus appears to be that autophagy plays double-edged sword in suppressing tumor initiation and in promoting the survival of established tumors (16). Indeed, experimental evidence points at autophagy as a mechanism involved in cancer cell resistance to various therapies, such as chemotherapy, radiotherapy, targeted therapy, photodynamic therapy-induced apoptosis, and immunotherapy (17–21). Despite the complex interplay between the tumor suppressive and supportive role of autophagy in cancer (14), the vast majority of the clinical trials have focus on inhibiting autophagy with chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ) either alone or in combination with anticancer therapies (22). Therefore, autophagy inhibition has been suggested as a strategy to improve cancer therapies and has been considered in multiple clinical trials. Autophagy inhibitors have been classified according to their action on the major steps of autophagy and numerous preclinical studies have evaluated the therapeutic benefit of inhibiting autophagy.

In this review, we will summarize the impact of inhibiting the different steps of autophagy, either pharmacologically or genetically by silencing or knocking down autophagy-associated genes (**Figure 2**), and describe how autophagy can be leveraged to improve the therapeutic benefit of current cancer therapies and elicit a synergistic effect with antineoplastic agents.

IMPACT OF INHIBITING THE INITIATION AND NUCLEATION STEPS ON CANCER THERAPIES

The first step of the autophagy process, so-called the initiation step, involves the ULK protein complex including ATG13, ATG101/ULK1/2, and FIP200 (2, 23). The initiation step of autophagy facilitates the recruitment of the class III PI3K or VPS34 complex containing BECN1, VPS34, regulatory subunit 4 (VPS15/P150), activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 (AMBRA), UV radiation resistance-associated gene protein (UVRAG), BIF1, and ATG14L (2, 23) to the newly formed "phagophore". The recruitment of the class III PI3K constitutes the nucleation step. In this section, we will summarize the different drugs and/or strategies used to target the initiation and nucleation steps and briefly discuss data available on their efficacy in pre-clinical tumor mouse models.

Inhibition of ULK1

Several long noncoding RNAs (lncRNAs) have been reported to induce tumor chemoresistance to 5-fluorouracil (5-FU) such as

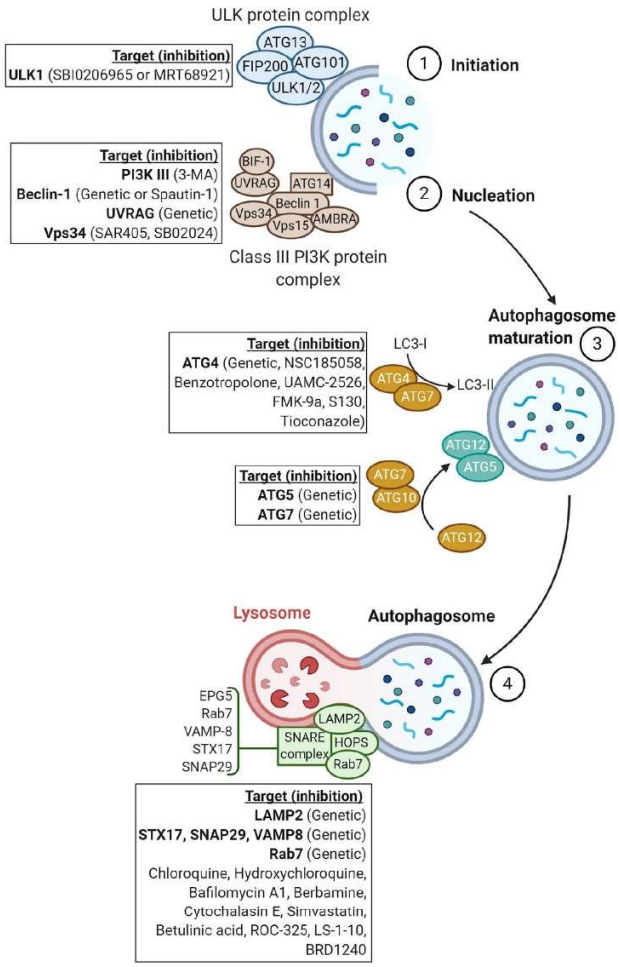


FIGURE 2 | Schematic representation of proteins involved in the major steps of autophagy. Genetic or pharmacological approaches targeting proteins involved in each step of autophagy are reported in squares.

lncRNA H19 and lncRNA small nucleolar RNA host gene 6 (SNHG6) in colorectal cancer (24, 25). SNHG6 promotes resistance of mice bearing RKO colon tumors to 5-FU. Furthermore, investigations showed that SNHG6 induced ULK1-dependent autophagy *via* sponging miR-26a-5p (25).

SBI0206965 is a highly selective inhibitor of ULK1 kinase (26) and it has been reported to sensitize NSCLC cells and acute myeloid leukemia (AML) cells to cisplatin- and daunorubicin-based chemotherapy, respectively, by decreasing cancer cell viability (27, 28). In pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells, combining extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitors with inhibitors of ULK1 complex (SBI0206965 or MRT68921) or with spautin-1, a specific inhibitor of two ubiquitin-specific peptidases USP10 and USP13 that control BECN1 degradation (29), decreased cell proliferation relative to ERK inhibitors alone (30). Recently, Chen et al. demonstrated that simultaneous inhibition of ULK1 (MRT68921) with NUAK1 (also known as ARK1) induces apoptosis in various cancer types (31).

Inhibition of Class III PI3K

Pre-treatment with class III PI3K inhibitors, such as 3-Methyladenine (3-MA), showed a significant improvement of the sensitivity of MDA-MB-231 and HBL-100 breast cancer cells to ionizing radiation (IR) despite an apparent low level of basal autophagy in HBL-100 cells (32). The therapeutic benefit of combining IR and 3-MA was observed in a xenograft esophageal squamous cell carcinoma mice model *in vivo* with a significant decrease in tumor volume relative to single treatment (33). Moreover, it has been demonstrated that 3-MA in combination with docetaxel, a semi-synthetic analog of paclitaxel, overcame docetaxel-induced autophagy and improved the sensitivity of lung adenocarcinoma (LAD) cells to docetaxel. Docetaxel-induced autophagy was mediated by High-mobility group box 1 (HMGB1) translocation, which participates in the BECN1 PI3K-III core complex formation *via* MEK/ERK1/2 pathway. Indeed, knockdown of *HMGB1* reverted the sensitivity of LAD cells to docetaxel (34).

Sorafenib is a well-known anti-angiogenic agent and remains the standard treatment in advanced unresectable hepatocellular carcinoma (HCC) (35). Over the past decade, several studies have focused on the underlying mechanisms induced by Sorafenib and exploring new combination therapies. In various types of cancers, Sorafenib has been described as inducing autophagy (36). Yuan et al. showed that 3-MA treatment in combination with Sorafenib significantly improved growth inhibition in HepG2, Hep3B, and PLC/PRF/5 treated cells (37). In triple-negative breast cancer (TNBC) cells, dual inhibition of autophagy and the Insulin-like growth factor (IGF) signaling pathway using 3-MA and NVP-AEW541, respectively, enhanced the NVP-AEW541-induced cell growth inhibition and apoptosis (38). In addition, preclinical studies have focused on exploring the benefit of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors such as gefitinib in EGFR-positive cancers (39). In TNBC cells, an increasing concentration of gefitinib combined with 3-MA significantly decreased cell viability *in vitro*. Interestingly, in TNBC xenograft mice models, a gefitinib and 3-MA combination resulted in a significant decrease in tumor volume and tumor weight compared to the gefitinib treated group. Further investigations revealed that autophagy inhibition by 3-MA enhanced gefitinib-induced GO/G1 cell cycle arrest, DNA damage, and cell death *via* the mitochondrial apoptosis pathway (40).

Selective VPS34 kinase inhibitors have acquired great interest as potential potent drugs to inhibit early autophagy. The VPS34 kinase inhibitor SAR405 in combination with everolimus, a well-known mTOR inhibitor approved for the treatment of various tumors (41), induced efficient autophagy inhibition and reduced renal tumor cell proliferation *in vitro* (42). In addition, the VPS34 kinase inhibitor SB02024 in combination with sunitinib, a tyrosine kinase inhibitor, significantly decreases cell viability and multicellular spheroid (MCS) growth in both MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Notably, inhibition of MCS growth was not observed with a chloroquine (CQ) and sunitinib combination (43). We have recently shown that pharmacological targeting of VPS34 kinase activity by SB02024 (Sprint Bioscience) or SAR405 (Sanofi) significantly decreased tumor growth and improved mice survival in melanoma B16-F10 and colorectal CT26 tumor mouse models (44). We provided evidence that deep changes in the immune landscape occurred in B16-F10 and CT26 mice models treated with VPS34 inhibitors (SB02024 and SAR405), characterized by increased infiltration of immune effectors such as NK, dendritic cells (DCs), M1 macrophages, and CD8+ T cells in the tumor microenvironment. Because there was no difference in the growth of tumors engrafted in NOD scid gamma (NSG) mice upon treatment with VPS34 inhibitors, these data clearly indicated that the tumor inhibitory effect of VPS34 inhibitors involves the host immune system. Moreover, we demonstrated that pro-inflammatory chemokines such as CCL5 and CXCL10 are responsible for NK and CD8+ T cell recruitment in B16-F10 tumors and CT26 tumors treated with VPS34 inhibitors relative to control. Interestingly, SB02024 or SAR405 improved the therapeutic benefit of anti-PD-1/PD-L1 by significantly reducing tumor growth and tumor weight and improving mice survival in B16-F10 and CT26 tumors (44).

Inhibition of Beclin-1

It has been reported that genetic inhibition of *BECN1* or *UVRAG* potentiated IR-induced DNA double-strand breaks (DSBs) and cell death in colorectal cancer cells (45). Furthermore, gene silencing of *BECN-1* enhanced the efficiency of fasudil (a RhoA/ROCK inhibitor) to induce apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells (46). Similarly, *in vitro* suppression of *BECN1* reduces paclitaxel-mediated cell viability, colony formation, and induced apoptotic death in BT-474 and MDA-MB-231 breast cancer cells in dose- and time-dependent manners (47). Similar effects were observed in non-small cancer lung cancer (NSCLC) cells, endometrial carcinoma, nasopharyngeal carcinoma cells, and ovarian and renal cancers (48–53). Interestingly, the therapeutic benefit of paclitaxel was increased in a *Becn1*-targeted BT-474 xenograft mice model based on cleaved caspase-3 positive cells and inhibition of tumor growth (47).

In human chronic myeloid leukemia (CML) cells, co-treatment with spautin-1 and imatinib, a BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, potentiated imatinib-induced CML cell apoptosis in both the K562 cell line and primary cells (54). In line with this latter study, it has also been reported that imatinib in combination with microRNA-30a, identified as potent inhibitor of *BECN1* and *ATG5*, significantly increased the imatinib-mediated cytotoxicity in CML cells (55).

Tamoxifen is one of the most efficient endocrine treatments in estrogen receptor (ER) positive breast cancers, which account for 70% of the breast cancer subtypes. However, the therapeutic benefit of Tamoxifen is negatively impacted by the development of drug resistance (56). Gu et al. discovered that tamoxifen resistance was associated with an increased BECN1 and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in breast cancer cells. *BECN1* silencing enhanced the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen by reducing tumor cell proliferation, migration, and invasion capabilities. These data highlight a novel

role of BECN1 in HER2 regulation that contributes to tamoxifen resistance (57).

Using several ovarian cancer cells, Zhang et al. showed that cancer cell resistance to cisplatin relied on autophagy-dependent induction of nuclear accumbens-1 (NAC1). Indeed, targeting *NAC1* or autophagy, *via* 3-MA or *BECN1* silencing, enhanced ovarian cancer cell sensitivity to cisplatin (58). Similar results were reported in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands, glioma, and urothelial carcinoma (59–61).

Bevacizumab, a monoclonal anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody, is widely used to treat metastatic colorectal cancer, lung cancer and renal cell carcinoma (62–64). Knowing that bevacizumab induces autophagy, it has been reported that genetic inhibition of *BECN1* improves the anticancer effects of this drug in colorectal cancer cells (65). Likewise, improved clinical response to trastuzumab was observed in HER2+ breast cancer displaying loss of *BECN1* gene (38, 66). The role of autophagy, including BECN1, in tumor resistance to targeted therapy is comprehensively reviewed by Mele et al. (67).

We have previously reported that genetic targeting of *Becn1* in melanoma cells prevents the degradation of Natural killer (NK)-derived Granzyme B and enhances melanoma susceptibility to NK-mediated killing (68). Furthermore, we showed that the infiltration of NK cells into *Becn1* defective melanoma is increased, which results in significant inhibition of tumor growth (69). Importantly, the impact of inhibiting autophagy on the infiltration of cytotoxic immune cells into the tumors and the decrease in tumor growth is also reported by other studies (70–73).

TARGETING AUTOPHAGOSOME MATURATION GENES ATG4B, ATG5, AND ATG7 POTENTIATES ANTICANCER THERAPIES

The third major step of autophagy involves two key complexes that promote the expansion of the phagophore membrane and result in the formation of a double-membraned vesicle named autophagosome. The first complex involves cooperation between ATG4B and ATG7, allowing for the conjugation of LC3I with phosphatidylethanolamine (PE) to form LC3II. LC3II is subsequently incorporated into the newly formed autophagosome (74). The second complex includes ATG7 and the E2-like enzyme ATG10, which are involved in ATG5-ATG12 conjugation (2). In this section, we will describe the therapeutic benefit of inhibiting autophagy genes involved in the maturation of autophagosomes.

Inhibition of ATG4B

The serine/threonine protein kinase MST4, also known as mammalian STE20-like protein kinase 4 (MST4) (75), was reported to facilitate p-ERK pathway and promote epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis in gastric cancer (76). MST4 is associated with prostate cancer, hepatocellular carcinoma, and breast cancer progression (77, 78). It has been reported that MST4 directly phosphorylates ATG4B at S383 position (79). Furthermore, ATG4B inhibition, by NSC185058 (80), improves the anti-tumor effect of radiotherapy in intracranial glioblastoma (GBM) patient derived xenograft (PDX) mice models (79). These data suggest a potential interconnection between MST4, autophagy and malignancy in GBM; however, the value of direct targeting MST4 as a strategy to modulate autophagy remains to be defined.

Recently, benzotropolone derivatives were synthetized and tested for ATG4B inhibition. UAMC-2526 was selected as the best candidate according to its efficiency to reduce basal autophagy and its high stability in the plasma. A combination of UAMC-2526 with oxaliplatin-based chemotherapy reduced colorectal cell proliferation and promoted tumor growth inhibition in HT29 colorectal tumor-bearing mice (81).

FMK-9a is another ATG4B inhibitor, reported to attenuate the pro-LC3 cleavage process and the LC3-PE delipidation. FMK-9a could also induce autophagy independent of its inhibition on ATG4B activity (82). Recently, S130 has been identified to bind and inhibit ATG4B, hence attenuating the delipidation of LC3-II and suppressing the recycling of LC3-I in colorectal cancer cells. Therefore, S130 has been described as a novel small-molecule to improve cancer therapy (83).

Moreover, an FDA-approved drug screening identified tioconazole as a new ATG4 inhibitor. Tioconazole treatment enhanced doxorubicin efficiency by decreasing cell viability in H4, HCT116, and MDA-MB-231 cells. Interestingly, the combination of tioconazole and doxorubicin showed an enhanced antitumor effect in HCT116 xenografted mice relative to each drug alone (84). In this context, it has been reported that the HER2 status was positively correlated with the expression of ATG4B protein. Interestingly, ATG4B silencing was associated with reduced viability of trastuzumab treated HER2+ cells compared to trastuzumab treatment alone (85).

Inhibition of ATG5 and ATG7

In A549 human lung cancer, overcoming the cytoprotective effect of autophagy induced by cisplatin, *via ATG5* silencing, improves cancer cell apoptosis, as compared to cisplatin treatment alone (86). Dual combination of Epirubicin, a structural analog of doxorubicin, with *ATG5*- or *ATG7*-silencing, significantly reduced cell viability in anthracycline-sensitive and resistant TNBC cells (87). O'Donovan et al. showed that combining both siRNA *BECN1* and *ATG7* decreased cell survival in 5-FU-treated esophageal cancer cells while targeting *BECN1* or *ATG7* alone had no impact (88). Therefore, it appears that targeting different steps of autophagy may be a more appropriate strategy to improve chemotherapy efficacy. In TBNC cells, Wu et al. demonstrated that dual inhibition of *ATG7*, genetically, and IGF-1R pharmacologically, promotes apoptosis and cell growth inhibition (38). In PDAC cells, genetic inhibition of *ATG5* or *ATG7* significantly improved the effect of ERK inhibitors on inhibiting cell proliferation relative to ERK inhibitors alone (30). Dual combination of *ATG5* siRNA and docetaxel, a well-known second-line approved treatment in NSCLC, decreased cell proliferation together with increasing cytotoxicity and apoptosis in LAD cells (34). In renal cell

carcinoma cells, *ATG5* silencing or 3-MA treatment in combination with Sorafenib enhanced the sensitivity of RCC cells to Sorafenib (89).

IMPACT OF INHIBITING AUTOPHAGOSOME-LYSOSOME FUSION ON THE RESPONSE TO VARIOUS ANTICANCER THERAPIES

The final step of autophagy consists of fusion between autophagosomes and lysosomes for the degradation, and recycling of damaged proteins and organelles. Thus, the outer membrane of autophagosomes merges with the lysosomal membrane, and then the inner membrane is degraded (90). The principal factors involved in autophagosome-lysosome fusion are the homotypic fusion and protein sorting (HOPS) complex, RAB7, and the N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) (91). Other proteins, such as the lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), are also required for proper fusion (92). This part will focus on the impact of targeting these factors and the fusion step on the therapeutic benefit of radiotherapy, chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy.

Targeting the Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptors (SNAREs) to Enhance Response to Conventional Treatments

Syntaxin 17 (STX17), SNAP29, and vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) are N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) involved in the autophagosome-lysosome fusion. During this process, STX17 is recruited to the outer membrane of autophagosomes through HOPS complex and interacts with VAMP8, located on lysosomes. This interaction is enhanced by SNAP29, which forms a SNARE complex with STX17 and VAMP8 (93). Knockdown of *STX17* causes a blockade of the fusion between autophagosomes and lysosomes and results in the accumulation of autophagosomes (93). Therefore, targeting SNARE proteins is considered a strategy for preventing the late step of autophagy. Moreover, SNAP29-STX17-VAMP8 complex formation can be enhanced by the down-regulation of *O*-GlcNAc transferase (OGT). This was correlated with the resistance of ovarian cancer to cisplatin treatment (94), and highlights that targeting SNAP29-STX17-VAMP8 complex by overexpression of OGT could improve the sensitivity to cisplatin treatment. Overexpression of *VAMP8* has also been associated with resistance to temozolomide in human glioma cells, and knockdown of *STX17* in glioma cells overexpressing *VAMP8* led to increased chemosensitivity (95).

In addition, Berbamine, a natural product isolated from traditional Chinese medicine, inhibits autophagosome-lysosome fusion by preventing the interaction between VAMP8 and SNAP29. Berbamine was proposed as a new potential inhibitor of autophagy that could enhance the effects of chemotherapy treatment (96). Moreover, Berbamine has been investigated as a potential anticancer drug in several studies and seems to act on multiple pathways such as MEK/ERK (97) and WNT/β-catenin pathways (98).

Targeting Lysosomal-Associated Membrane Protein 2 (LAMP2) as a Potential Target to Inhibit Autophagosome-Lysosome Fusion and Improve the Response to Anti-Cancer Therapies

LAMP2 is a glycosylated protein ubiquitously expressed, and mostly located on lysosome membranes. LAMP2 is required for the proper fusion between autophagosomes and lysosomes (92). In neuroendocrine prostate cancer, knockdown of *LAMP2* by siRNA induced an autophagy blockade and decreased both cancer cell proliferation and neuroendocrine markers. These results indicate that LAMP2 plays a dual role in cell survival, by inducing autophagy and in the differentiation of androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells into neuroendocrine prostate cancer cells (99). In addition, a recent *in silico* approach showed that the expression of *LAMP2* was decreased in prostate cancer tissues as compared to normal prostate tissues (100), indicating that the expression level of *LAMP2* could act as a regulatory element in cancer progression. Another study compared the expression level of *LAMP2* in salivary adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma and/or a normal salivary gland (101). The results showed an increased expression of *LAMP2* in salivary adenoid cystic carcinoma, which was associated with cancer progression. Although the expression level of *LAMP2* seems to be different in various cancer types, several data suggest that *LAMP2* is a potential target for cancer therapy in combination with conventional treatments. This statement was supported by data showing that the silencing of *LAMP2* by siRNAs led to a radiosensitization of prostate cancer cell lines (102). In addition, a reduced expression of *LAMP2* has been associated with a decreased resistance to both cisplatin in human ovarian carcinoma cells (103) and azacitidine in acute myeloid leukemia (104). Nevertheless, the sensitization to radiotherapy and chemotherapy by *LAMP2* targeting should be investigated in other types of cancer cells.

Overexpression of *RAB7* as a Potential Strategy to Improve Sensitivity to Anti-Cancer Treatments

RAB7 is a small GTPase localized to late endosomes and lysosomes and has multiple functions in autophagy. In mammalian, RAB7 is not directly involved in the autophagosome-lysosome fusion but rather in autolysosome maturation under nutrient-rich conditions (105). The significance of RAB7 as a target for autophagy modulation is not well defined so far.

The role of RAB7 in cancer progression has recently been described as a protein involved in promoting the proliferation,

invasion, and migration of gastric cancer cells (106). RAB7 has also been associated with chemoresistance to cisplatin. Indeed, *RAB7* was downregulated in cisplatin-resistant cervical cancer cell lines as compared to chemosensitive ones (107). Additionally, *RAB7* overexpression induced chemosensitization of cisplatin-resistant cells, while depletion of *RAB7* by siRNA induced resistance to cisplatin in chemosensitive cells (108). Furthermore, RUBICON (Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing), a negative regulator of autophagy, inhibits autophagosome-lysosome fusion and interacts with RAB7-GTP *via* a RUBICON homology (RH) domain (109).

Impact of Using Drugs Inhibiting the Last Step of Autophagy Process on Various Cancer Therapies

CQ and its derivate, hydroxychloroquine (HCQ), are the only drugs having shown their ability to block the last step of autophagy and being approved by the Food and Drug Administration (FDA) for clinical use. Indeed, CQ blocks the autophagic flux by altering autophagosome fusion with lysosomes, presumably by interfering with SNAP29 recruitment (110). In addition, CQ cytotoxicity induced autophagy-associated cell death associated with nuclei abnormalities, lipofuscinogenesis, and senescence (111). As reported in clinicaltrials.gov, CQ is currently being investigated as a potent anticancer drug in small cell lung cancer, breast cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, melanoma, and other types of cancers.

Because CQ and HCQ are the only autophagy inhibitors available and approved for clinical use, multiple studies evaluated the potential effects of CQ *in vitro*, in combination with anticancer treatments. In fact, CQ was responsible for radiosensitizing bladder cancer cells and bladder cancer xenografts in mice (112). CQ also had a synergetic effect with radiotherapy on glioma initiating cells by inducing apoptosis and inhibiting autophagy induced by ionizing radiation (113). The same synergistic effects were observed on glioblastoma cell lines (114). CQ administered after radiation is also capable of increasing the death of breast cancer cells and tumor regression *in vivo* (115). The use of CQ as a potent enhancer of radiotherapy is currently being evaluated in clinical trials involving small cell lung cancer (NCT01575782) and glioblastoma (NCT04397679), and in patients with brain metastases from solid tumors (NCT01894633). It should be highlighted that CQ sensitized various breast cancer cell lines to cisplatin and LY294002, reported to induce autophagy in these cells. However, CQ sensitization in these cells occurred independent of autophagy inhibition. Therefore, the autophagy independent sensitizing effects of CQ should be considered in clinical trials where CQ or its derivatives are used in the treatment of cancer (116, 117). In HCT-116 and HT-29 colorectal cancer cell lines, it has been reported that CQ sensitized these cell lines to radiation and 5-FU treatment and resulted in a significant decrease in clonogenic survival of HT-29 cell line without any impact on cell cycle progression or cell death (118). However, in GBM, CQ was found to induce P53-independent cell deaths that do not require caspase-mediated apoptosis. The CQ derivatives, Quinacrine and Mefloquine, are more potent and displayed superior blood-brain barrier penetration compared to CQ (119).

Maycotte et al. evaluated the effects of combining CQ with chemotherapeutic drugs such as the DNA damaging agent cisplatin, the mTOR inhibitor Rapamycin, and the PtdIns3K inhibitor LY294002 in two mouse breast cancer cell lines (117). While the combination of CQ and cisplatin had no significant effect on the viability of both cell lines, CQ combined with PtdIns3K and mTOR inhibition sensitized both cell lines. However, the CQ-mediated sensitization seems to be independent of autophagy, since this sensitization was not observed following *Atg12* and *Becn1* knockdown (117). A similar result was observed in KRAS-driven cancer cell lines where the antiproliferative effects of CQ were similar between *ATG7*-deficient tumor cell lines with undetectable autophagic flux and *ATG7*-efficient tumor cell lines (120). In addition, CQ sensitizes bladder cancer cells to cisplatin treatment by inhibiting cisplatin-induced autophagy (121). Similar results were observed in nasopharyngeal carcinoma cells (122) and hypopharyngeal squamous cell carcinoma xenografted mice (123). This suggests that CQ effects, in combination with chemotherapy, depend on the type of cancer and therefore require further investigation.

Several studies have been conducted on CQ in combination with targeted therapies. Erlotinib and Rapamycin are two tyrosine kinase inhibitors targeting the EGFR and the mammalian target of Rapamycin, respectively. These anticancer drugs are particularly used for NSCLC treatment where EGFR and PI3K/AKT/mTOR pathways are often dysregulated. It has been shown that the combination of Erlotinib and Rapamycin with Monensin, a polyether antibiotic inhibiting autophagosome-lysosome fusion, improved Erlotinib and Rapamycin induced tumor growth inhibition and apoptosis in NSCLC (124). Similar results were observed in prostate cancer cells by Monensin, although the involvement of autophagy inhibition was not clearly suggested in this study (125). Furthermore, the combination of the tyrosine kinase inhibitor, sunitinib, with CQ or *LAMP2* knockdown also showed promising results in a metastatic pancreatic neuroendocrine tumor mice model (126). The combination of the monoclonal antibody trastuzumab with CQ in HER2+ breast cancer (127) also led to promising results. Indeed, CQ sensitized both trastuzumab-resistant breast cancer cells and trastuzumab-resistant xenografts, resulting in increased cell death *in vitro* and decreased tumor growth *in vivo*.

In addition to its effects in combination with radiotherapy, chemotherapy, and targeted therapy, CQ seems to be responsible for various effects on the immune system. CQ resets tumor-associated M2 macrophages to the tumor-inhibiting M1 phenotype in B16 melanoma and H22 hepatocarcinoma mouse tumor models, and ameliorates the immunosuppressive tumor immune microenvironment through a lysosomal calcium-TFEB pathway (91). Another recent article showed that CQ in combination with 5-FU increased the driving of DC

maturation by HCT-116 colon cancer cells, and in this way stimulates T cell responses induced by tumor cell lysates (128). Considering the impact of CQ on the immune system, CQ was tested in combination with dual CTLA4 and PD-1 immune checkpoint blockade in orthotopic tumors established from pancreatic ductal adenocarcinoma cells. This study revealed an increased CD8+ T cell infiltration within the tumors and a tumor sensitization to anti-PD-1 and anti-CTLA4 therapy when combined with CQ (129). These data support further investigations on the potential effect of combining CQ with other immunotherapy such as new immune checkpoint inhibitors, T-cell transfer therapy, or monoclonal antibodies, on the immunosuppressive tumor microenvironment.

Besides CQ, Bafilomycin A1 (BafA1) is another drug acting at the last step of autophagy. BafA1 is an antibiotic targeting the vacuolar H+-ATPase enzyme, thus inducing acidification of lysosomal pH, therefore inhibiting lysosomal degradation capacity. BafA1 has also shown promising effects in combination with chemotherapy, since BafA1 increased cisplatin cytotoxicity in tongue squamous cell carcinoma cells and bladder cancer cells (121, 130). BafA1 also increased chemosensitivity to 5-FU in gastric cancer cells (131). Other drugs have been described to target autophagosome-lysosome fusion, such as LS-1-10, Cytochalasin E and Simvastatin. LS-1-10 is a novel acridine derivative sharing structure with CQ and HCQ. LS-1-10 has a dual function, it is able to both induce DNA damage and block autophagosome-lysosome fusion. In addition, LS-1-10 is significantly more potent in reducing cell viability than CQ (>50%) in colon cancer cells (132).

Cytochalasin E is a fungal toxin found in *Aspergillus clavatus*, which binds to actin filaments. Cytochalasin E can inhibit autophagosome-lysosome fusion in the same way as CQ. In addition, cytochalasin enhances the effect of bortezomib in human lung cancer cells (133). Simvastatin is a powerful inhibitor of hydroxymethylglutaryl CoA reductase, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis. Interestingly, Simvastatin can induce cell death in astrocytoma, neuroblastoma, glioblastoma, breast cancer, and lung adenocarcinoma (134). Moreover, this drug appears to inhibit the fusion between autophagosomes and lysosomes and increase the effects of Temozolomide in glioblastoma cell lines (135). Finally, the combination of Simvastatin with Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, inhibits autophagy by preventing RAB7 prenylation and decreases tumor growth in mice bearing triple-negative breast tumors (136).

CONCLUSION

Despite the dual role of autophagy in suppressing tumor initiation and in promoting the survival of established tumors (16), the studies reported in this review highlight the pivotal role of autophagy as a cytoprotective and therapy resistance mechanism in cancer. Therefore, strategies used to modulate autophagy for enhancing the therapeutic benefit of current anticancer therapies are an area of intense investigation. Based on data reported in this review, we strongly believe that inhibiting autophagy represents a new paradigm for overcoming therapy resistance and enhancing drug sensitivity in multiple tumor cell types. Because autophagy inhibition is currently used in many clinical trials along with different therapeutic strategies, it is reasonable to consider that several cancer treatments themselves induce autophagy in tumor cells.

Among the various autophagy inhibitors, CQ or its derivative HCQ are the major drugs used in clinical trials, with mitigated success. While CQ provides promising results in combination with conventional anticancer therapies, in some studies CQ sensitization appears to be independent of autophagy inhibition. Therefore, more selective and potent autophagy inhibitors must be designed to definitively endorse the therapeutic benefit of targeting autophagy in cancer patients. While CQ and HCQ inhibits the last step of autophagy (110), other druggable autophagy proteins have recently been proposed, which include the early autophagy protein BECN1 (45) and its interacting protein VPS34 (or PI3K class III) (41, 42, 44). Thus, more potent and selective autophagy specific inhibitors are currently in pre-clinical development; these include drugs targeting earlier steps in the autophagy process, such as ULK1, VPS34, and ATG4B (27, 28) (79). Other factors interacting with the autophagy process could also be considered as potential targets to inhibit autophagy and overcome therapy resistance, such as AMPK and HIF-1α, which are reported as key inducers of autophagy through negative regulation of the mTOR pathways and inducing hypoxic conditions, respectively (6, 7, 137). Other drugs are able to target the late step of autophagy by interacting with lysosomes. ROC-325 has been described as a potent autophagy inhibitor exhibiting superior *in vitro* and *in vivo* anticancer effects compared to CQ. In Renal cell carcinoma RCC, ROC-325 induced an accumulation of autophagosomes *in vitro* and inhibited RCC growth and survival in an ATG5/7-dependent manner *in vivo* by disrupting autophagic degradation (138). In acute myeloid leukemia, ROC-325 improved the anti-leukemic activity of azacitidine through inhibiting autophagy (139). BRD1240 is a small-molecule suppressing the V-ATPase function and therefore inhibiting the lysosomal acidification property. It has been reported that, similar to BafA1, BRD1240 inhibited autolysosome formation and subsequently triggering a significant accumulation of autophagosomes (140). Similar to ROC-325 and LS-1-10, Betulinic acid (BA) disrupt the degradative lysosomal function (74, 141–143), leading to the accumulation of mitochondria inside dysfunctional autolysosomes. Such a lysosome-mitochondrial stress axis is responsible for the induction of lipofuscinogenesis and ageing (143).

It should be highlighted that even if a selective and potent autophagy inhibitor is identified, the challenging task is to demonstrate that the therapeutic benefit that could be observed is indeed related to inhibition of the autophagy process, as almost all autophagy-related genes have non-autophagic functions. Another challenge is to maintain a balance between the benefits gained by autophagy inhibition and the deleterious effects of this inhibition in cancer patients. Indeed, the process of autophagy seems to both activates and inhibits cellular senescence (144), and chronic inhibition of autophagy appears to increase permanently the risk of cancer (145). Finally, considering the controversial role of autophagy regarding its cytoprotective or cytotoxic function, it is more likely obvious that the clinical outcome of combination treatment between an inhibitor of autophagy with chemotherapy,

radiotherapy, targeted therapy, or immunotherapy would lead to contradictory or equivocal results (146). Therefore, the last challenge to overcome would be to determine whether patients would benefit from autophagy inhibition prior to conventional therapies, with for example the use of novel biomarkers of cytoprotective autophagy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MX, AB, MH, CD, GV, GB, MN, and BJ have contributed in writing and editing the manuscript. BJ has generated figures. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by Luxembourg Institute of Health and grants from the Luxembourg National Research Fund (PRIDE15/10675146/CANBIO and C18/BM/12670304/COMBATIC); FNRS Televie (grants 7.4606.18 and 7.4579.20); Fondation Cancer, Luxembourg (FC/2018/06); Kriibskrank Kanner Foundation, Luxembourg (2019); RCMS foundation, and Action LIONS Vaincre le Cancer Luxembourg. The authors also declare that this study received funding from Janssen Cilag Pharma and Roche Pharma. These funders were not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication.

REFERENCES

1. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* (1966) 28:435–92. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251
2. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* (2017) 17(9):528–42. doi: 10.1038/nrc.2017.53
3. Noman MZ, Janji B, Kaminska B, Van Moer K, Pierson S, Przanowski P, et al. Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res* (2011) 71(18):5976–86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1094
4. Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* (2013) 4:e838. doi: 10.1038/cddis.2013.350
5. Palorini F, Cozzarini C, Gianolini S, Botti A, Carillo V, Iotti C, et al. First application of a pixel-wise analysis on bladder dose-surface maps in prostate cancer radiotherapy. *Radiother Oncol* (2016) 119(1):123–8. doi: 10.1016/j.radonc.2016.02.025
6. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* (2010) 584(7):1287–95. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.017
7. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* (2011) 13(2):132–41. doi: 10.1038/ncb2152
8. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* (2009) 29(10):2570–81. doi: 10.1128/MCB.00166-09
9. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* (2003) 112(12):1809–20. doi: 10.1172/JCI20039
10. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(25):15077–82. doi: 10.1073/pnas.2436255100
11. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* (2011) 25(8):795–800. doi: 10.1101/gad.2016211
12. Crazzolara R, Cisterne A, Thien M, Hewson J, Baraz R, Bradstock KF, et al. Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (2009) 113(14):3297–306. doi: 10.1182/blood-2008-02-137752
13. Singh SS, Vats S, Chia AY, Tan TZ, Deng S, Ong MS, et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* (2018) 37(9):1142–58. doi: 10.1038/s41388-017-0046-6
14. Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* (2011) 25(19):1999–2010. doi: 10.1101/gad.17558811
15. Guo JY, Xia B, White E. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell* (2013) 155(6):1216–9. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.019
16. Janji B, Viry E, Moussay E, Paggetti J, Arakelian T, Mgrditchian T, et al. The multifaceted role of autophagy in tumor evasion from immune surveillance. *Oncotarget* (2016) 7(14):17591–607. doi: 10.18632/oncotarget.7540
17. Ito H, Daido S, Kanzawa T, Kondo S, Kondo Y. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *Int J Oncol* (2005) 26(5):1401–10. doi: 10.3892/ijo.26.5.1401
18. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* (2007) 117(2):326–36. doi: 10.1172/JCI28833
19. Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, et al. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia* (2007) 21 (5):936–42. doi: 10.1038/sj.leu.2404606
20. Wei MF, Chen MW, Chen KC, Lou PJ, Lin SY, Hung SC, et al. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* (2014) 10(7):1179–92. doi: 10.4161/auto.28679
21. Janji B, Berchem G, Chouaib S. Targeting Autophagy in the Tumor Microenvironment: New Challenges and Opportunities for Regulating Tumor Immunity. *Front Immunol* (2018) 9:887. doi: 10.3389/fimmu.2018.00887
22. Towers CG, Thorburn A. Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine* (2016) 14:15–23. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.034
23. Xiao M, Noman MZ, Menard L, Chevigne A, Szpakowska M, Bosseler M, et al. Driving Cytotoxic Natural Killer Cells into Melanoma: If CCL5 Plays the Music, Autophagy Calls the Shots. *Crit Rev Oncog* (2018) 23(5-6):321–32. doi: 10.1615/CritRevOncog.2018027526
24. Wang M, Han D, Yuan Z, Hu H, Zhao Z, Yang R, et al. Long non-coding RNA H19 confers 5-Fu resistance in colorectal cancer by promoting SIRT1-mediated autophagy. *Cell Death Dis* (2018) 9(12):1149. doi: 10.1038/s41419-018-1187-4
25. Wang X, Lan Z, He J, Lai Q, Yao X, Li Q, et al. LncRNA SNHG6 promotes chemoresistance through ULK1-induced autophagy by sponging miR-26a-5p in colorectal cancer cells. *Cancer Cell Int* (2019) 19:234. doi: 10.1186/s12935-019-0951-6
26. Egan DF, Chun MG, Vamos M, Zou H, Rong J, Miller CJ, et al. Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol Cell* (2015) 59(2):285–97. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.031
27. Tang F, Hu P, Yang Z, Xue C, Gong J, Sun S, et al. SBI0206965, a novel inhibitor of Ulk1, suppresses non-small cell lung cancer cell growth by modulating both autophagy and apoptosis pathways. *Oncol Rep* (2017) 37 (6):3449–58. doi: 10.3892/or.2017.5635
28. Qiu L, Zhou G, Cao S. Targeted inhibition of ULK1 enhances daunorubicin sensitivity in acute myeloid leukemia. *Life Sci* (2020) 243:117234. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117234
29. Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* (2011) 147(1):223–34. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.037
30. Bryant KL, Stalnecker CA, Zeitouni D, Klomp JE, Peng S, Tikunov AP, et al. Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nat Med* (2019) 25(4):628–40. doi: 10.1038/s41591-019-0368-8

31. Chen Y, Xie X, Wang C, Hu Y, Zhang H, Zhang L, et al. Dual targeting of NUAK1 and ULK1 using the multitargeted inhibitor MRT68921 exerts potent antitumor activities. *Cell Death Dis* (2020) 11(8):712. doi: 10.1038/s41419-020-02885-0
32. Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G, Rodemann HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol* (2011) 99(3):287–92. doi: 10.1016/j.radonc.2011.06.002
33. Chen Y, Li X, Guo L, Wu X, He C, Zhang S, et al. Combining radiation with autophagy inhibition enhances suppression of tumor growth and angiogenesis in esophageal cancer. *Mol Med Rep* (2015) 12(2):1645–52. doi: 10.3892/mmr.2015.3623
34. Pan B, Chen D, Huang J, Wang R, Feng B, Song H, et al. HMGB1-mediated autophagy promotes docetaxel resistance in human lung adenocarcinoma. *Mol Cancer* (2014) 13:165. doi: 10.1186/1476-4598-13-165
35. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* (2008) 359(4):378–90. doi: 10.1056/NEJMoa0708857
36. Prieto-Dominguez N, Ordonez R, Fernandez A, Garcia-Palomo A, Muntane J, Gonzalez-Gallego J, et al. Modulation of Autophagy by Sorafenib: Effects on Treatment Response. *Front Pharmacol* (2016) 7:151. doi: 10.3389/fphar.2016.00151
37. Yuan H, Li AJ, Ma SL, Cui LJ, Wu B, Yin L, et al. Inhibition of autophagy signi fi cantly enhances combination therapy with sorafenib and HDAC inhibitors for human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* (2014) 20 (17):4953–62. doi: 10.3748/wjg.v20.i17.4953
38. Wu W, Ma J, Shao N, Shi Y, Liu R, Li W, et al. Co-Targeting IGF-1R and Autophagy Enhances the Effects of Cell Growth Suppression and Apoptosis Induced by the IGF-1R Inhibitor NVP-AEW541 in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *PloS One* (2017) 12(1):e0169229. doi: 10.1371/journal.pone.0169229
39. Xu H, Yu Y, Marciniak D, Rishi AK, Sarkar FH, Kucuk O, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-related protein inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* (2005) 4 (3):435–42. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-04-0280
40. Liu Z, He K, Ma Q, Yu Q, Liu C, Ndege I, et al. Autophagy inhibitor facilitates gefitinib sensitivity in vitro and in vivo by activating mitochondrial apoptosis in triple negative breast cancer. *PloS One* (2017) 12(5):e0177694. doi: 10.1371/journal.pone.0177694
41. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discovery* (2011) 10 (11):868–80. doi: 10.1038/nrd3531
42. Kim TS. Hope as a mode of coping in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Nurs* (1989) 21(6):342–7. doi: 10.1097/01376517-198912000-00003
43. Dyczynski M, Yu Y, Otrocka M, Parpal S, Braga T, Henley AB, et al. Targeting autophagy by small molecule inhibitors of vacuolar protein sorting 34 (Vps34) improves the sensitivity of breast cancer cells to Sunitinib. *Cancer Lett* (2018) 435:32–43. doi: 10.1016/j.canlet.2018.07.028
44. Noman MZ, Parpal S, Van Moer K, Xiao M, Yu Y, Viklund J, et al. Inhibition of Vps34 reprograms cold into hot inflamed tumors and improves anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *Sci Adv* (2020) 6(18):eaax7881. doi: 10.1126/sciadv.aax7881
45. Park JM, Tougeron D, Huang S, Okamoto K, Sinicrope FA. Beclin 1 and UVRAG confer protection from radiation-induced DNA damage and maintain centrosome stability in colorectal cancer cells. *PloS One* (2014) 9 (6):e100819. doi: 10.1371/journal.pone.0100819
46. Xie FJ, Zheng QQ, Qin J, Zhang LL, Han N, Mao WM. Autophagy Inhibition Stimulates Apoptosis in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Treated with Fasudil. *J Cancer* (2018) 9(6):1050–6. doi: 10.7150/jca.23388
47. Wu CL, Liu JF, Liu Y, Wang YX, Fu KF, Yu XJ, et al. Beclin1 inhibition enhances paclitaxelmediated cytotoxicity in breast cancer in vitro and in vivo. *Int J Mol Med* (2019) 43(4):1866–78. doi: 10.3892/ijmm.2019.4089
48. Xi G, Hu X, Wu B, Jiang H, Young CY, Pang Y, et al. Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett* (2011) 307(2):141–8. doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.026
49. Zhang Q, Si S, Schoen S, Chen J, Jin XB, Wu G. Suppression of autophagy enhances preferential toxicity of paclitaxel to folliculin-deficient renal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* (2013) 32:99. doi: 10.1186/1756-9966-32-99
50. Liu S, Li X. Autophagy inhibition enhances sensitivity of endometrial carcinoma cells to paclitaxel. *Int J Oncol* (2015) 46(6):2399–408. doi: 10.3892/ijo.2015.2937
51. Zhang SF, Wang XY, Fu ZQ, Peng QH, Zhang JY, Ye F, et al. TXNDC17 promotes paclitaxel resistance via inducing autophagy in ovarian cancer. *Autophagy* (2015) 11(2):225–38. doi: 10.1080/15548627.2014.998931
52. Song Y, Li W, Peng X, Xie J, Li H, Tan G. Inhibition of autophagy results in a reversal of taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma by enhancing taxol-induced caspase-dependent apoptosis. *Am J Transl Res* (2017) 9(4):1934–42. doi: 10.1097/cad.0b013e3283363980
53. Zhen Z, Yang K, Ye L, You Z, Chen R, Liu Y, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid sensitizes neuroblastoma to paclitaxel by inhibiting thioredoxin-related protein 14-mediated autophagy. *Cancer Sci* (2017) 108 (7):1485–92. doi: 10.1111/cas.13279
54. Shao S, Li S, Qin Y, Wang X, Yang Y, Bai H, et al. Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *Int J Oncol* (2014) 44(5):1661–8. doi: 10.3892/ijo.2014.2313
55. Yu Y, Yang L, Zhao M, Zhu S, Kang R, Vernon P, et al. Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* (2012) 26(8):1752–60. doi: 10.1038/leu.2012.65
56. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* (1984) 2(10):1102–9. doi: 10.1200/JCO.1984.2.10.1102
57. Gu Y, Chen T, Li G, Xu C, Xu Z, Zhang J, et al. Lower Beclin 1 downregulates HER2 expression to enhance tamoxifen sensitivity and predicts a favorable outcome for ER positive breast cancer. *Oncotarget* (2017) 8(32):52156–77. doi: 10.18632/oncotarget.11044
58. Zhang Y, Cheng Y, Ren X, Zhang L, Yap KL, Wu H, et al. NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response. *Oncogene* (2012) 31(8):1055–64. doi: 10.1038/onc.2011.290
59. Ma B, Liang LZ, Liao GQ, Liang YJ, Liu HC, Zheng GS, et al. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity in human adenoid cystic carcinoma cells of salivary glands. *J Oral Pathol Med* (2013) 42(10):774–80. doi: 10.1111/jop.12066
60. Zhang R, Wang R, Chen Q, Chang H. Inhibition of autophagy using 3-methyladenine increases cisplatin-induced apoptosis by increasing endoplasmic reticulum stress in U251 human glioma cells. *Mol Med Rep* (2015) 12(2):1727–32. doi: 10.3892/mmr.2015.3588
61. Schlutermann D, Skowron MA, Berleth N, Bohler P, Deitersen J, Stuhldreier F, et al. Targeting urothelial carcinoma cells by combining cisplatin with a specific inhibitor of the autophagy-inducing class III PtdIns3K complex. *Urol Oncol* (2018) 36(4):160 e161–160 e113. doi: 10.1016/j.urolonc.2017.11.021
62. Giampieri R, Caporale M, Pietrantonio F, De Braud F, Negri FV, Giuliani F, et al. Second-line angiogenesis inhibition in metastatic colorectal cancer patients: Straightforward or overcrowded? *Crit Rev Oncol Hematol* (2016) 100:99–106. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.02.005
63. Stratigos M, Matikas A, Voutsina A, Mavroudis D, Georgoulias V. Targeting angiogenesis in small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* (2016) 5 (4):389–400. doi: 10.21037/tlcr.2016.08.04
64. Jain RK, Gandhi S, George S. Second-line systemic therapy in metastatic renal-cell carcinoma: A review. *Urol Oncol* (2017) 35(11):640–6. doi: 10.1016/j.urolonc.2017.08.010
65. Zhao Z, Xia G, Li N, Su R, Chen X, Zhong L. Autophagy Inhibition Promotes Bevacizumab-induced Apoptosis and Proliferation Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *J Cancer* (2018) 9(18):3407–16. doi: 10.7150/jca.24201
66. Peeters M, Price T. Biologic therapies in the metastatic colorectal cancer treatment continuum–applying current evidence to clinical practice. *Cancer Treat Rev* (2012) 38(5):397–406. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.08.002
67. Mele L, Del Vecchio V, Liccardo D, Prisco C, Schwerdtfeger M, Robinson N, et al. The role of autophagy in resistance to targeted therapies. *Cancer Treat Rev* (2020) 88:102043. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102043
68. Baginska J, Viry E, Berchem G, Poli A, Noman MZ, van Moer K, et al. Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to

natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110(43):17450–5. doi: 10.1073/pnas.1304790110
69. Mgrditchian T, Arakelian T, Paggetti J, Noman MZ, Viry E, Moussay E, et al. Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114(44):E9271–9. doi: 10.1073/pnas.1703921114
70. Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* (2013) 504(7479):296–300. doi: 10.1038/nature12865
71. Maes H, Kuchnio A, Peric A, Moens S, Nys K, De Bock K, et al. Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell* (2014) 26(2):190–206. doi: 10.1016/j.ccr.2014.06.025
72. Rao S, Tortola L, Perlot T, Wirnsberger G, Novatchkova M, Nitsch R, et al. A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat Commun* (2014) 5:3056. doi: 10.1038/ncomms4056
73. Poillet-Perez L, Xie X, Zhan L, Yang Y, Sharp DW, Hu ZS, et al. Autophagy maintains tumour growth through circulating arginine. *Nature* (2018) 563 (7732):569–73. doi: 10.1038/s41586-018-0697-7
74. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* (2016) 12(1):1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356
75. Qian Z, Lin C, Espinosa R, LeBeau M, Rosner MR. Cloning and characterization of MST4, a novel Ste20-like kinase. *J Biol Chem* (2001) 276(25):22439–45. doi: 10.1074/jbc.M009323200
76. Li T, Deng L, He X, Jiang G, Hu F, Ye S, et al. MST4 Predicts Poor Prognosis And Promotes Metastasis By Facilitating Epithelial-Mesenchymal Transition In Gastric Cancer. *Cancer Manag Res* (2019) 11:9353–69. doi: 10.2147/CMAR.S219689
77. Madsen CD, Hooper S, Tozluoglu M, Bruckbauer A, Fletcher G, Erler JT, et al. STRIPAK components determine mode of cancer cell migration and metastasis. *Nat Cell Biol* (2015) 17(1):68–80. doi: 10.1038/ncb3083
78. Thompson BJ, Sahai E. MST kinases in development and disease. *J Cell Biol* (2015) 210(6):871–82. doi: 10.1083/jcb.201507005
79. Huang T, Kim CK, Alvarez AA, Pangeni RP, Wan X, Song X, et al. MST4 Phosphorylation of ATG4B Regulates Autophagic Activity, Tumorigenicity, and Radioresistance in Glioblastoma. *Cancer Cell* (2017) 32840-855(6):e848. doi: 10.1016/j.ccell.2017.11.005
80. Akin D, Wang SK, Habibzadegah-Tari P, Law B, Ostrov D, Li M, et al. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors. *Autophagy* (2014) 10(11):2021–35. doi: 10.4161/auto.32229
81. Kurdi A, Cleenewerck M, Vangestel C, Lyssens S, Declercq W, Timmermans JP, et al. ATG4B inhibitors with a benzotropolone core structure block autophagy and augment efficiency of chemotherapy in mice. *Biochem Pharmacol* (2017) 138:150–62. doi: 10.1016/j.bcp.2017.06.119
82. Chu J, Fu Y, Xu J, Zheng X, Gu Q, Luo X, et al. ATG4B inhibitor FMK-9a induces autophagy independent on its enzyme inhibition. *Arch Biochem Biophys* (2018) 644:29–36. doi: 10.1016/j.abb.2018.03.001
83. Fu Y, Hong L, Xu J, Zhong G, Gu Q, Gu Q, et al. Discovery of a small molecule targeting autophagy via ATG4B inhibition and cell death of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Autophagy* (2019) 15(2):295–311. doi: 10.1080/15548627.2018.1517073
84. Liu PF, Tsai KL, Hsu CJ, Tsai WL, Cheng JS, Chang HW, et al. Drug Repurposing Screening Identifies Tioconazole as an ATG4 Inhibitor that Suppresses Autophagy and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy. *Theranostics* (2018) 8(3):830–45. doi: 10.7150/thno.22012
85. Bortnik S, Choutka C, Horlings HM, Leung S, Baker JH, Lebovitz C, et al. Identification of breast cancer cell subtypes sensitive to ATG4B inhibition. *Oncotarget* (2016) 7(41):66970–88. doi: 10.18632/oncotarget.11408
86. Chen J, Zhang L, Zhou H, Wang W, Luo Y, Yang H, et al. Inhibition of autophagy promotes cisplatin-induced apoptotic cell death through Atg5 and Beclin 1 in A549 human lung cancer cells. *Mol Med Rep* (2018) 17 (5):6859–65. doi: 10.3892/mmr.2018.8686
87. Chittaranjan S, Bortnik S, Dragowska WH, Xu J, Abeysundara N, Leung A, et al. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* (2014) 20(12):3159–73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2060
88. O'Donovan TR, O'Sullivan GC, McKenna SL. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy* (2011) 7(5):509–24. doi: 10.4161/auto.7.6.15066
89. Zheng B, Zhu H, Gu D, Pan X, Qian L, Xue B, et al. MiRNA-30a-mediated autophagy inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to sorafenib. *Biochem Biophys Res Commun* (2015) 459(2):234–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.084
90. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* (2018) 14(2):207–15. doi: 10.1080/15548627.2017.1378838
91. Chen D, Xie J, Fiskesund R, Dong W, Liang X, Lv J, et al. Chloroquine modulates antitumor immune response by resetting tumor-associated macrophages toward M1 phenotype. *Nat Commun* (2018) 9(1):873. doi: 10.1038/s41467-018-03225-9
92. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* (2008) 132(1):27–42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018
93. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* (2012) 151(6):1256–69. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.001
94. Zhou F, Yang X, Zhao H, Liu Y, Feng Y, An R, et al. Down-regulation of OGT promotes cisplatin resistance by inducing autophagy in ovarian cancer. *Theranostics* (2018) 8(19):5200–12. doi: 10.7150/thno.27806
95. Chen Y, Meng D, Wang H, Sun R, Wang D, Wang S, et al. VAMP8 facilitates cellular proliferation and temozolomide resistance in human glioma cells. *Neuro Oncol* (2015) 17(3):407–18. doi: 10.1093/neuonc/nou219
96. Fu R, Deng Q, Zhang H, Hu X, Li Y, Liu Y, et al. A novel autophagy inhibitor berbamine blocks SNARE-mediated autophagosome-lysosome fusion through upregulation of BNIP3. *Cell Death Dis* (2018) 9(2):243. doi: 10.1038/s41419-018-0276-8
97. Mou L, Liang B, Liu G, Jiang J, Liu J, Zhou B, et al. Berbamine exerts anticancer effects on human colon cancer cells via induction of autophagy and apoptosis, inhibition of cell migration and MEK/ERK signalling pathway. *J BUON* (2019) 24(5):1870–5.
98. Zhang H, Jiao Y, Shi C, Song X, Chang Y, Ren Y, et al. Berbamine suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in ovarian cancer partially via the inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* (2018) 50(6):532–9. doi: 10.1093/abbs/gmy036
99. Morell C, Bort A, Vara-Ciruelos D, Ramos-Torres A, Altamirano-Dimas M, Diaz-Laviada I, et al. Up-Regulated Expression of LAMP2 and Autophagy Activity during Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer LNCaP Cells. *PloS One* (2016) 11(9):e0162977. doi: 10.1371/journal.pone.0162977
100. Jamali L, Moradi A, Ganji M, Ayati M, Kazeminezhad B, Fazeli Attar Z, et al. Potential Prognostic Role for SPOP, DAXX, RARRES1, and LAMP2 as an Autophagy Related Genes in Prostate Cancer. *Urol J* (2020) 17(2):156–63. doi: 10.22037/uj.v0i0.4935
101. Huang CF, Deng WW, Zhang L, Zhang WF, Sun ZJ. Expression of LC3, LAMP2, KEAP1 and NRF2 in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma. *Pathol Oncol Res* (2016) 22(1):109–14. doi: 10.1007/s12253-015-9981-0
102. Koukourakis MI, Kalamida D, Mitrakas A, Pouliliou S, Kalamida S, Sivridis E, et al. Intensified autophagy compromises the efficacy of radiotherapy against prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* (2015) 461(2):268–74. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.014
103. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* (2005) 4 (10):1595–604. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0102
104. Robert G, Auberger P. Azacitidine resistance caused by LAMP2 deficiency: a therapeutic window for the use of autophagy inhibitors in MDS/AML patients? *Autophagy* (2019) 15(5):927–9. doi: 10.1080/15548627.2019.1586259
105. Kuchitsu Y, Fukuda M. Revisiting Rab7 Functions in Mammalian Autophagy: Rab7 Knockout Studies. *Cells* (2018) 7(11):215. doi: 10.3390/cells7110215
106. Liu H, Xu J, Yao Q, Zhang Z, Guo Q, Lin J. Rab7 Is Associated with Poor Prognosis of Gastric Cancer and Promotes Proliferation, Invasion, and Migration of Gastric Cancer Cells. *Med Sci Monit* (2020) 26:e922217. doi: 10.12659/MSM.922217

107. Guerra F, Bucci C. Role of the RAB7 Protein in Tumor Progression and Cisplatin Chemoresistance. *Cancers (Basel)* (2019) 11(8):1096. doi: 10.3390/cancers11081096
108. Guerra F, Paiano A, Migoni D, Girolimetti G, Perrone AM, De Iaco P, et al. Modulation of RAB7A Protein Expression Determines Resistance to Cisplatin through Late Endocytic Pathway Impairment and Extracellular Vesicular Secretion. *Cancers (Basel)* (2019) 11(1):52. doi: 10.3390/cancers11010052
109. Bhargava HK, Tabata K, Byck JM, Hamasaki M, Farrell DP, Anishchenko I, et al. Structural basis for autophagy inhibition by the human Rubicon-Rab7 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* (2020) 117(29):17003–10. doi: 10.1073/pnas.2008030117
110. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* (2018) 14(8):1435–55. doi: 10.1080/15548627.2018.1474314
111. Tsubone T, Rocha C, Tonolli P, II-Sei W, Stolf B. In vitro Autophagy Modulation with Chloroquine: Some Lessons to Learn. *Adv Biochem Biotechnol* (2020) 5:1098. doi: 10.29011/2574-7258.001098
112. Wang F, Tang J, Li P, Si S, Yu H, Yang X, et al. Chloroquine Enhances the Radiosensitivity of Bladder Cancer Cells by Inhibiting Autophagy and Activating Apoptosis. *Cell Physiol Biochem* (2018) 45(1):54–66. doi: 10.1159/000486222
113. Ye H, Chen M, Cao F, Huang H, Zhan R, Zheng X. Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. *BMC Neurol* (2016) 16(1):178. doi: 10.1186/s12883-016-0700-6
114. Roy LO, Poirier MB, Fortin D. Chloroquine inhibits the malignant phenotype of glioblastoma partially by suppressing TGF-beta. *Invest New Drugs* (2015) 33(5):1020–31. doi: 10.1007/s10637-015-0275-x
115. Ratikan JA, Sayre JW, Schaue D. Chloroquine engages the immune system to eradicate irradiated breast tumors in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2013) 87(4):761–8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.07.024
116. Yoon YH, Cho KS, Hwang JJ, Lee SJ, Choi JA, Koh JY. Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2010) 51(11):6030–7. doi: 10.1167/iovs.10-5278
117. Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* (2012) 8(2):200–12. doi: 10.4161/auto.8.2.18554
118. Schonewolf CA, Mehta M, Schiff D, Wu H, Haffty BG, Karantza V, et al. Autophagy inhibition by chloroquine sensitizes HT-29 colorectal cancer cells to concurrent chemoradiation. *World J Gastrointest Oncol* (2014) 6(3):74–82. doi: 10.4251/wjgo.v6.i3.74
119. Geng Y, Kohli L, Klocke BJ, Roth KA. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro Oncol* (2010) 12(5):473–81. doi: 10.1093/neuonc/nop048
120. Eng CH, Wang Z, Tkach D, Toral-Barza L, Ugwonali S, Liu S, et al. Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* (2016) 113(1):182–7. doi: 10.1073/pnas.1515617113
121. Lin JF, Lin YC, Tsai TF, Chen HE, Chou KY, Hwang TI. Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther* (2017) 11:1517–33. doi: 10.2147/DDDT.S126464
122. Aga T, Endo K, Tsuji A, Aga M, Moriyama-Kita M, Ueno T, et al. Inhibition of autophagy by chloroquine makes chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma more efficient. *Auris Nasus Larynx* (2019) 46(3):443–50. doi: 10.1016/j.anl.2018.10.013
123. Zhao XG, Sun RJ, Yang XY, Liu DY, Lei DP, Jin T, et al. Chloroquine-enhanced efficacy of cisplatin in the treatment of hypopharyngeal carcinoma in xenograft mice. *PloS One* (2015) 10(4):e0126147. doi: 10.1371/journal.pone.0126147
124. Choi HS, Jeong EH, Lee TG, Kim SY, Kim HR, Kim CH. Autophagy Inhibition with Monensin Enhances Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by mTOR or Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Lung Cancer Cells. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* (2013) 75(1):9–17. doi: 10.4046/trd.2013.75.1.9
125. Ketola K, Vainio P, Fey V, Kallioniemi O, Iljin K. Monensin is a potent inducer of oxidative stress and inhibitor of androgen signaling leading to apoptosis in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* (2010) 9(12):3175–85. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0368
126. Wiedmer T, Blank A, Pantasis S, Normand L, Bill R, Krebs P, et al. Autophagy Inhibition Improves Sunitinib Efficacy in Pancreatic Neuroendocrine Tumors via a Lysosome-dependent Mechanism. *Mol Cancer Ther* (2017) 16(11):2502–15. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0136
127. Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Corominas-Faja B, Cuyas E, Lopez-Bonet E, et al. The anti-malarial chloroquine overcomes primary resistance and restores sensitivity to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Sci Rep* (2013) 3:1–13. 2469. doi: 10.1038/srep02469
128. Zamame Ramirez JA, Romagnoli GG, Falasco BF, Gorgulho CM, Sanzochi Fogolin C, Dos Santos DC, et al. Blocking drug-induced autophagy with chloroquine in HCT-116 colon cancer cells enhances DC maturation and T cell responses induced by tumor cell lysate. *Int Immunopharmacol* (2020) 84:106495. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106495
129. Yamamoto K, Venida A, Yano J, Biancur DE, Kakiuchi M, Gupta S, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* (2020) 581(7806):100–5. doi: 10.1038/s41586-020-2229-5
130. Chu HY, Wang W, Chen X, Jiang YE, Cheng R, Qi X, et al. Bafilomycin A1 increases the sensitivity of tongue squamous cell carcinoma cells to cisplatin by inhibiting the lysosomal uptake of platinum ions but not autophagy. *Cancer Lett* (2018) 423:105–12. doi: 10.1016/j.canlet.2018.03.003
131. Li LQ, Xie WJ, Pan D, Chen H, Zhang L. Inhibition of autophagy by bafilomycin A1 promotes chemosensitivity of gastric cancer cells. *Tumour Biol* (2016) 37(1):653–9. doi: 10.1007/s13277-015-3842-z
132. Fu W, Li X, Lu X, Zhang L, Li R, Zhang N, et al. A novel acridine derivative, LS-1-10 inhibits autophagic degradation and triggers apoptosis in colon cancer cells. *Cell Death Dis* (2017) 8(10):e3086. doi: 10.1038/cddis.2017.498
133. Takanezawa Y, Nakamura R, Kojima Y, Sone Y, Uraguchi S, Kiyono M. Cytochalasin E increased the sensitivity of human lung cancer A549cells to bortezomib via inhibition of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* (2018) 498(3):603–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.029
134. Alizadeh J, Zeki AA, Mirzaei N, Tewary S, Rezaei Moghadam A, Glogowska A, et al. Mevalonate Cascade Inhibition by Simvastatin Induces the Intrinsic Apoptosis Pathway via Depletion of Isoprenoids in Tumor Cells. *Sci Rep* (2017) 7:44841. doi: 10.1038/srep44841
135. Shojaei S, Koleini N, Samiei E, Aghaei M, Cole LK, Alizadeh J, et al. Simvastatin increases temozolomide-induced cell death by targeting the fusion of autophagosomes and lysosomes. *FEBS J* (2020) 287(5):1005–34. doi: 10.1111/febs.15069
136. Kou X, Yang Y, Jiang X, Liu H, Sun F, Wang X, et al. Vorinostat and Simvastatin have synergistic effects on triple-negative breast cancer cells via abrogating Rab7 prenylation. *Eur J Pharmacol* (2017) 813:161–71. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.08.022
137. Daskalaki I, Gkikas I, Tavernarakis N. Hypoxia and Selective Autophagy in Cancer Development and Therapy. *Front Cell Dev Biol* (2018) 6:104. doi: 10.3389/fcell.2018.00104
138. Carew JS, Espitia CM, Zhao W, Han Y, Visconte V, Phillips J, et al. Disruption of Autophagic Degradation with ROC-325 Antagonizes Renal Cell Carcinoma Pathogenesis. *Clin Cancer Res* (2017) 23(11):2869–79. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1742
139. Nawrocki ST, Han Y, Visconte V, Przychodzen B, Espitia CM, Phillips J, et al. The novel autophagy inhibitor ROC-325 augments the antileukemic activity of azacitidine. *Leukemia* (2019) 33(12):2971–4. doi: 10.1038/s41375-019-0529-2
140. Aldrich LN, Kuo SY, Castoreno AB, Goel G, Kuballa P, Rees MG, et al. Discovery of a Small-Molecule Probe for V-ATPase Function. *J Am Chem Soc* (2015) 137(16):5563–8. doi: 10.1021/jacs.5b02150
141. Carew JS, Espitia CM, Esquivel JA,2, Mahalingam D, Kelly KR, Reddy G, et al. Lucanthone is a novel inhibitor of autophagy that induces cathepsin D-mediated apoptosis. *J Biol Chem* (2011) 286(8):6602–13. doi: 10.1074/jbc.M110.151324
142. Martins WK, Costa ET, Cruz MC, Stolf BS, Miotto R, Cordeiro RM, et al. Parallel damage in mitochondrial and lysosomal compartments promotes efficient cell death with autophagy: The case of the pentacyclic triterpenoids. *Sci Rep* (2015) 5:12425. doi: 10.1038/srep12425
143. Martins WK, Gomide AB, Costa ET, Junqueira HC, Stolf BS, Itri R, et al. Membrane damage by betulinic acid provides insights into cellular aging.

Biochim Biophys Acta Gen Subj (2017) 1861(1 Pt A):3129–43. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.018
144. Kang C, Elledge SJ. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy* (2016) 12(5):898–9. doi: 10.1080/15548627.2015.1121361
145. Cassidy LD, Young ARJ, Young CNJ, Soilleux EJ, Fielder E, Weigand BM, et al. Temporal inhibition of autophagy reveals segmental reversal of ageing with increased cancer risk. *Nat Commun* (2020) 11(1):307. doi: 10.1038/s41467-019-14187-x
146. Gewirtz DA. The Challenge of Developing Autophagy Inhibition as a Therapeutic Strategy. *Cancer Res* (2016) 76(19):5610–4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0722

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Xiao, Benoit, Hasmim, Duhem, Vogin, Berchem, Noman and Janji. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANNEXE II

Lequeux A, Noman MZ, Xiao M, Van Moer K, Hasmim M, **Benoit A**, Bosseler M, Viry E, Arakelian T, Berchem G, Chouaib S, Janji B. **Targeting HIF-1 alpha transcriptional activity drives cytotoxic immune effector cells into melanoma and improves combination immunotherapy**. *Oncogene*. **2021** Jul;40(28):4725-4735.

Contribution à l'article

Dans l'article scientifique intitulé « **Targeting HIF-1 alpha transcriptional activity drives cytotoxic immune effector cells into melanoma and improves combination immunotherapy** » publié en 2020 dans Oncogene, j'ai participé au processus de révision du manuscrit en réalisant des expériences supplémentaires. Plus précisément, j'ai analysé l'ARN messager de *Ca9*, *Ccl2* et *Ccl5* par RT-qPCR sur les cellules B16-F10 en normoxie, et en hypoxie traitées avec une dose croissante d'acriflavine (ACF) (5, 10, 20 µM). J'ai également analysé l'ARN messager de *Ca9*, *Ccl2* et *Ccl5* par RT-qPCR sur les tumeurs B16-F10 HIF-1α (FL) et HIF-1α (Del). Ma participation correspond aux panel A et G de la Supplementary Figure 2.

Oncogene (2021) 40:4725–4735
https://doi.org/10.1038/s41388-021-01846-x

BRIEF COMMUNICATION

Targeting HIF-1 alpha transcriptional activity drives cytotoxic immune effector cells into melanoma and improves combination immunotherapy

Audrey Lequeux[1] · Muhammad Zaeem Noman[1] · Malina Xiao[1] · Kris Van Moer[1] · Meriem Hasmim[1] · Alice Benoit[1] · Manon Bosseler[1] · Elodie Viry[1] · Tsolere Arakelian[1] · Guy Berchem[1,2] · Salem Chouaib[3,4] · Bassam Janji[1]

Received: 31 August 2020 / Revised: 27 April 2021 / Accepted: 17 May 2021 / Published online: 21 June 2021
© The Author(s) 2021. This article is published with open access

Abstract

Hypoxia is a key factor responsible for the failure of therapeutic response in most solid tumors and promotes the acquisition of tumor resistance to various antitumor immune effectors. Reshaping the hypoxic immune suppressive tumor microenvironment to improve cancer immunotherapy is still a relevant challenge. We investigated the impact of inhibiting HIF-1α transcriptional activity on cytotoxic immune cell infiltration into B16-F10 melanoma. We showed that tumors expressing a deleted form of HIF-1α displayed increased levels of NK and $CD8^+$ effector T cells in the tumor microenvironment, which was associated with high levels of CCL2 and CCL5 chemokines. We showed that combining acriflavine, reported as a pharmacological agent preventing HIF-1α/HIF-1β dimerization, dramatically improved the benefit of cancer immunotherapy based on TRP-2 peptide vaccination and anti-PD-1 blocking antibody. In melanoma patients, we revealed that tumors exhibiting high CCL5 are less hypoxic, and displayed high NK, $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell markers than those having low CCL5. In addition, melanoma patients with high CCL5 in their tumors survive better than those having low CCL5. This study provides the pre-clinical proof of concept for a novel triple combination strategy including blocking HIF-1α transcription activity along vaccination and PD-1 blocking immunotherapy.

Introduction

Most solid tumors are hypoxic and characterized by the presence of poorly oxygenated areas (pO_2 pressure less than 8 mmHg) [1]. Tumor hypoxia results from an imbalance between low oxygen (O_2) supply, due to an abnormal vascularization, and high O_2 consumption by tumor cells, which exhibit a marked increase in proliferation and an exacerbated metabolism [2]. Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha (HIF-1α) is the major factor mediating the adaptive response to changes in tissue oxygen level [3]. While HIF-1α is rapidly degraded in cells under normoxia conditions, it is stabilized under hypoxia conditions. The translocation of stabilized HIF-1α to the nucleus and its binding with HIF-1β ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) is a key event to activate the expression of several genes involved in various biological processes [4].

Hypoxia contributes to the failure of conventional cancer therapies such as chemotherapy [5] and radiation therapy [6], while data underlining its real impact on immunotherapy efficacy are still missing. Hypoxic stress is a critical microenvironmental factor impairing the antitumor immune response and activating multiple pathways leading to the emergence of resistant tumor cells. We have reported that

Supplementary information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41388-021-01846-x.

✉ Bassam Janji
bassam.janji@lih.lu

1 Tumor Immunotherapy and Microenvironment (TIME) group, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health (LIH), Luxembourg City, Luxembourg

2 Department of Hemato-oncology, Centre Hospitalier du Luxembourg, Luxembourg City, Luxembourg

3 INSERM UMR 1186, Integrative Tumor Immunology and Genetic Oncology, Gustave Roussy, Villejuif, France

4 Thumbay Research Institute of Precision Medicine, Gulf Medical University, Ajman, United Arab Emirates

tumor hypoxia allows tumor cells to escape cytotoxic effector T lymphocytes (CTL) and Natural Killer (NK) mediated killing through the activation of autophagy [7–9]. We have also demonstrated that, through the secretion of microvesicles containing immunosuppressive molecules (i.e., TGF-β, miRNA23a), hypoxic tumor cells are capable of impairing the cytotoxic function of NK cells [10]. In addition, hypoxic stress modulates the composition and function of the immune infiltrate [11–13]. Depending on the nature of the microenvironment, immune cells present in the hypoxic tumor microenvironment may not be able to fulfill their function and could be corrupted to support tumor growth. Hypoxia enhances the immunosuppressive properties of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) toward T cells by a mechanism involved in the regulation of the immune checkpoint PD-L1 expression on the surface of MDSCs [14–16]. Hypoxia is also involved in the overexpression of other immune checkpoints such as the macrophage immune checkpoint CD47 [17] and the V-domain Ig suppressor of T-cell activation (VISTA) on the surface of MDSCs [18].

Based on the results described above, developing pharmacological agents to modulate HIF-1α signaling pathway has recently inspired significant interest. Indeed, several sub-types of drugs has been described to inhibit HIF-1α activity including inhibitors of HIF-1α/HIF-1β dimerization (e.g., acriflavine) [19, 20]. In this study, we evaluated in vivo the impact of suppressing the transcriptional activity of HIF-1α, by deleting the domain responsible for its dimerization with HIF-1β, on the infiltration of major cytotoxic immune cells into B16-F10 melanoma. The deletion of this particular domain mimics the mode of action of acriflavine (ACF). Our results revealed that suppression of the transcriptional activity of HIF-1α induced the infiltration of NK cells and $CD8^+$ T cells in the tumor microenvironment of melanoma. Such infiltration was associated with the release of CCL2 and CCL5 chemokines in the tumor microenvironment. In addition, simultaneous boosting of the $CD8^+$ T cell response, using a TRP-peptide vaccination strategy, along with anti-PD-1 and ACF in hypoxic B16-F10 tumors, promoted tumor regression in vivo.

Results and discussion

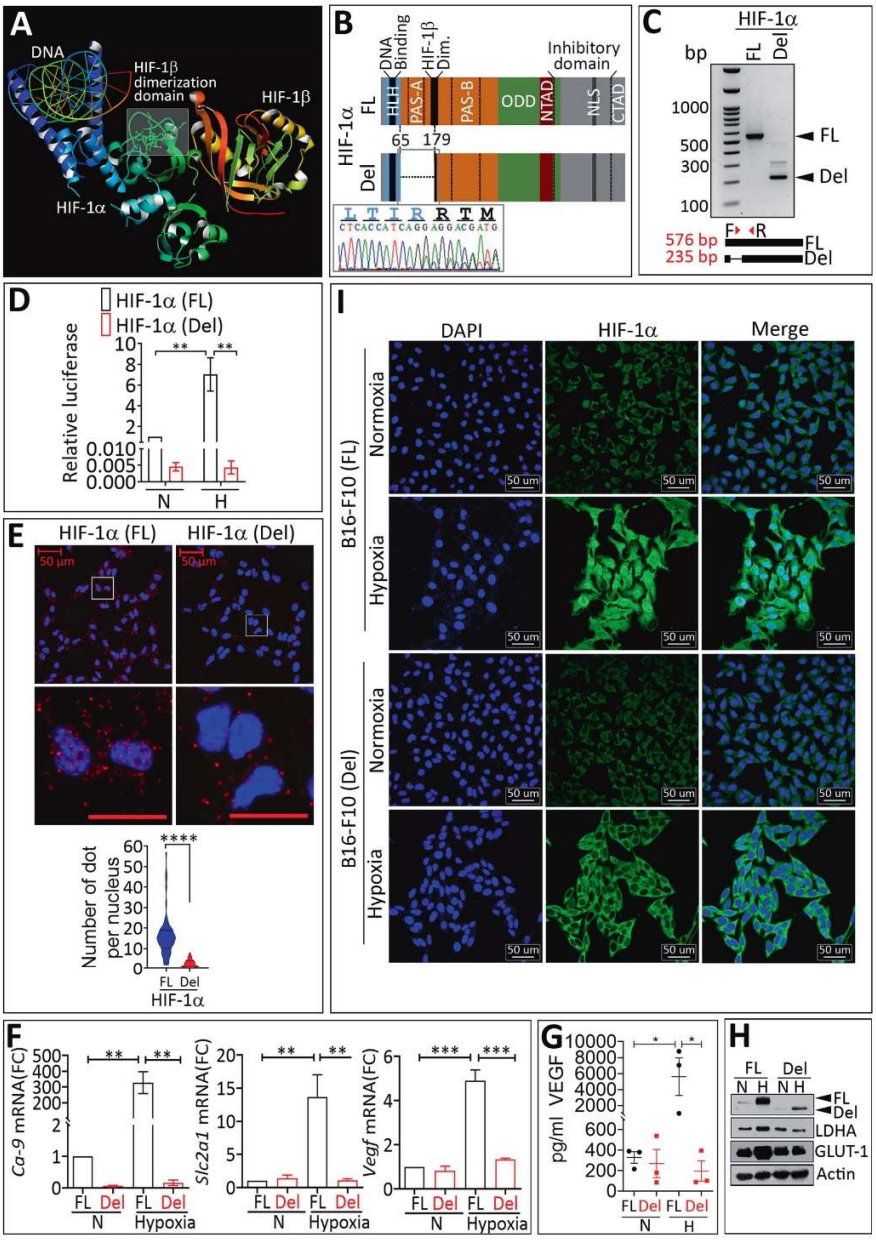
Deleting HIF-1β binding domain in HIF-1α prevents its transcriptional activity in melanoma cells

We investigated the impact of deleting the HIF-1α domain responsible for HIF-1α dimerization with HIF-1β/ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) (Fig. 1A) on B16-F10 melanoma growth. We used CRISPR/Cas9 technology to cleave specifically the HIF-1α/ARNT dimerization domain, located between the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) and PER-ARNT-SIM (PAS) domains on the HIF-1α subunit. DNA sequencing showed a deletion of a 114 amino acid fragment close to the HIF-1α N-terminus. This fragment contains a substantial part of the HIF-1α heterodimerization domain (deletion of 10 amino acids over 22 constituting the HIF-1α heterodimerization domain). Other domains located outside the deleted fragment, such as the DNA-binding domain, located in the bHLH, and the oxygen-dependent degradation domain (ODD), remained intact. The truncated and full-length HIF-1α proteins are therefore termed HIF-1α (Del) and HIF-1α (FL), respectively (Fig. 1B, C). The transcriptional activity of HIF-1α (Del) was abolished, as demonstrated by luciferase activity assay and (Fig. 1D), and the interaction of HIF-1α (Del) with HIF-1β was substantially disrupted as showed by using Proximal Ligation Assay (Fig. 1E). Accordingly, no increase was observed in the expression of HIF-1α downstream target genes such as carbonic anhydrase 9 (*Ca-9*), glucose transporter-1 (*Slc2a1*) and vascular endothelial growth factor (*Vegf*) in cells expressing HIF-1α (Del) under hypoxia (Figure F-G). HIF-1α (Del) protein having smaller molecular weight (Fig. 1H) was still accumulated in hypoxic B16-F10 cells but only in the cytoplasm as demonstrated in Fig. 1I.

Impairing the transcriptional activity of HIF-1α in melanoma inhibits the tumor growth by driving major cytotoxic immune cells into the tumor microenvironment

We next evaluated the impact of deleting the HIF-1α-ARNT dimerization domain on the in vivo tumor growth of B16-F10 melanoma cells. In vitro, there was no significant difference between the proliferation of HIF-1α (Del) and HIF-1α (FL) B16-F10 cells (Supplementary Fig. 1A). We observed a significant inhibition in the growth (Fig. 2A) and weight (Fig. 2B) associated with an improvement in the survival (Fig. 2C) of mice bearing HIF-1α (Del) compared to those bearing HIF-1α (FL). Immunohistochemical (IHC) staining performed on tumor sections at day 19 showed no CA-9 staining in HIF-1α (Del) compared to HIF-1α (FL) tumors, indicating that the transcriptional activity of HIF-1α (Del) protein remains absent in tumors until at least 19 days (Fig. 2D).

ACF is an FDA-approved small molecule inhibiting the dimerization of HIF-1α with ARNT. ACF pretreatment in mice bearing prostate cancer xenografts decreased tumor growth and inhibited vascularization [21]. Digoxin and other cardiac glycosides that inhibit HIF-1α protein synthesis blocked tumor growth [22]. The above-mentioned studies used



immunodeficient mice to investigate the impact of targeting HIF-1α on tumor growth. In this study, our main objective was to use immunocompetent mice to study the impact of targeting HIF-1α on immune cell infiltrate within the tumor bed. Of note, no difference in the growth of HIF-1α (Del)-tumors and HIF-1α (FL)-tumors was observed in immunocompromised

◀ **Fig. 1 Deletion of the heterodimerization domain of HIF-1α inhibits its transcriptional activity in vitro. A** Crystal structure of the heterodimeric HIF-1α: ARNT Complex with Hypoxia-response element (HRE) DNA generated from Protein Data Bank Japan (PDBj) (https://pdbj.org/mine_molmil?pdbid = 4zpr). The HIF-1α domain responsible for the dimerization with HIF-1β is outlined. **B** HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) domain structure: The deleted sequence in HIF-1α (Del) goes from amino acid 65 to amino acid 179 within the HIF-1β dimerization domain. HLH, basic helix-loop-helix domain; PAS, PER-ARNT-SIM domains A and B; ODD, oxygen-dependent domain; N- and C-TAD, N- and C-transactivation domains; NLS, nuclear localization signal sequence. **C** RT-PCR detection of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) showing fragments of 576 and 235 bp for HIF-1α FL and HIF-1α, respectively. The panel inside indicates the design strategy of primers. F: Forward primer and R: Reverse primer. **D** Luciferase report assay performed on B16-F10 cells expressing HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) and cultured under normoxia (N) or hypoxia (H). Results are reported as relative Luciferase activity and normalized to the activity detected in control normoxic B16-F10 cells expressing HIF-1α (FL) as shown in the figure. Data represent the mean of four independent experiments with SEM. Statistically significant difference (indicated by asterisks) are shown (**$p < 0.005$). **E** Proximity Ligation Assay was performed in B16-F10 cells expressing HIF-1α (FL) or HIF-1α (Del) cultured under hypoxia (0.1% pO_2, H) for 24 h. The appearance of red dots is indicative of the complex formed between HIF-1α/HIF-1β. Lower images represent a magnification of the delineated area of the upper images. Scale bar: 50 µm. Images are representative of eight acquisitions from HIF-1α (FL) or HIF-1α (Del) expressing cells. Lower graph represents the quantification of red dots present in the nucleus of all cells in the upper images. Results are shown as mean ± SEM (error bars). **** = $p < 0.0001$ determined by two-tailed unpaired Student's *t* test. **F** RT-qPCR quantification of *Ca-9*, *Slc2a1*, and *Vegf* gene expression in HIF-1α FL (FL) and HIF-1α Del (Del) B16-F10 cells cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% pO_2, H) conditions for 24 h. Results are reported as fold change (FC) and represent the average of three independent experiments. Error bars indicate mean ± SEM. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ determined by unpaired two-tailed Student's *t* test. **G** ELISA quantification of VEGF protein levels in the supernatant of cells described in E. Data are reported in pg/ml and represent three independent experiments. Results are shown as mean ± SEM (error bars). * = $p < 0.05$ determined by one-tailed Student's *t* test. **H** Western-blot analysis of HIF-1α, LDHA, and Glut−1 protein expression in HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 cells cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% pO_2, H) conditions for 24 h. Actin was used as a loading control. **I** Confocal microscopy analysis of subcellular localization of HIF-1α (green) in B16-F10 cells expressing either HIF-1α (FL) or HIF-1α (Del) cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% pO_2, H) conditions for 24 h at the same cell density. Nuclei are stained with DAPI (blue). Individual and merged images of HIF-1α and DAPI staining are shown. Scale bar: 50 µm.

NOD scid gamma (NSG) mice lacking mature B, T, and NK cells (Fig. 2E), highlighting the involvement of the host immune system in inhibiting HIF-1α (Del) tumor growth in mice. We next assessed the infiltration of $CD45^+$ immune cells and major cytotoxic immune cells into HIF-1α (FL)- and HIF-1α (Del)- tumors. Figure 2F–H shows a significant increase in the infiltration of live $CD45^+$, NK, $CD4^+$, and $CD8^+$ T cells into HIF-1α (Del) tumors as compared to HIF-1α (FL) tumors. By analyzing the expression of the early activation marker CD69 on NK and CD8 T cells and assessing the level of IFN-γ in the tumor microenvironment [23], we showed no significant difference in the expression of CD69 in NK and $CD8^+$ T cells (Fig. 2I), but a significant increase in IFN-γ in HIF-1α (Del) compared to HIF-1α (FL) B16-F10 tumors (Fig. 2J). Furthermore, Supplementary Fig. 1B showed a significant increase in the infiltration of $Foxp3^+$ Treg cells in HIF-1α Del compared to HIF-1α FL tumors, which exhibited a significant decrease in the expression of the activation marker CD69, but not the exhaustion marker PD-1. Nevertheless, our data suggest that the increased infiltration of $CD4^+$ T cells, observed in HIF-1α-deleted tumors could be partially related to an increased infiltration of Treg cells.

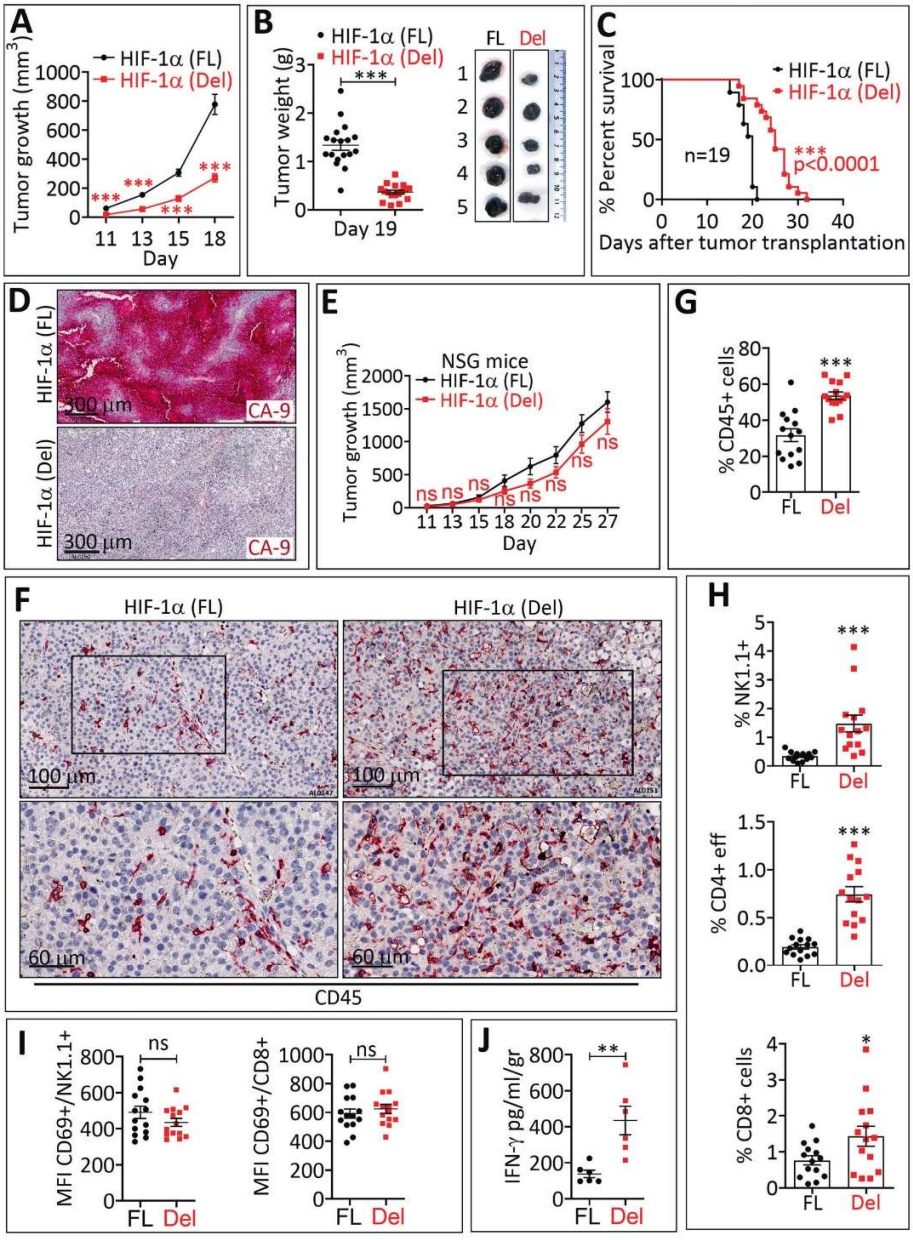
The decrease in HIF-1α (Del) tumor growth was no longer observed when host NK cells were depleted from tumor-bearing mice (Fig. 3A and Supplementary Fig. 1C). $CD8^+$ T cell depletion also partially rescued the growth inhibition of HIF-1α (Del) tumors but to a lesser extent (Fig. 3B and Supplementary Fig. 1D). These results highlight the major contribution of NK cells, but they do not exclude the role of $CD8^+$ T cells, in the inhibition of HIF-1α (Del) tumor growth.

Inhibiting the transcriptional activity of HIF-1α enhances the release of CCL5 in the tumor microenvironment

To gain insight into the cytokine/chemokine network involved in driving immune cells into HIF-1α (Del) tumors, we used large-scale Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array combined to ELISA assay. We identified CCL2 and CCL5 as the major chemokines secreted in HIF-1α (Del) tumors as compared to HIF-1α (FL) tumors (Fig. 3C, D). Supplementary Figure 2A showed a significant increase in the mRNA of CCL5, but not CCL2, in HIF-1α (Del) compared to HIF-1α (FL) tumors.

An ELISA assay of CCL2 in the extracellular medium of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) cells cultured in vitro showed no regulation of CCL2 by hypoxia even when HIF-1α was truncated. CCL5 extracellular levels were also not regulated by hypoxia but HIF-1α truncation under both normoxia and hypoxic led to a consistent increase in CCL5 levels (Fig. 3E). *Ccl2* and *Ccl5* mRNA expression in HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) cells provided similar results, but no significant increase in *CCL5* mRNA was observed in HIF-1α (Del) compared to HIF-1α (FL) cells under normoxia (Supplementary Fig. 2B).

Our key results reported in B16-F10 cells related to the increase of CCL5 can be reproduced in 4T1 breast cancer cells, as the depletion of HIF-1α (evidenced by the failure of hypoxia to induce *Ca-9* and *Slc2a* mRNA and protein) had no impact cell proliferation in vitro, but significantly induced the release of CCL2 and CCL5 under both normoxia and hypoxia (Supplementary Fig. 2C-F).



Nevertheless, in B16-F10 cells, our data indicate that CCL5 overexpression detected in tumors expressing HIF-1α (Del) is most likely released by B16-F10 tumor cells while CCL2 is probably released by the microenvironment of HIF-1α (Del) tumors. CCL5 overexpression was further confirmed by IHC on tumor sections (Fig. 3F).

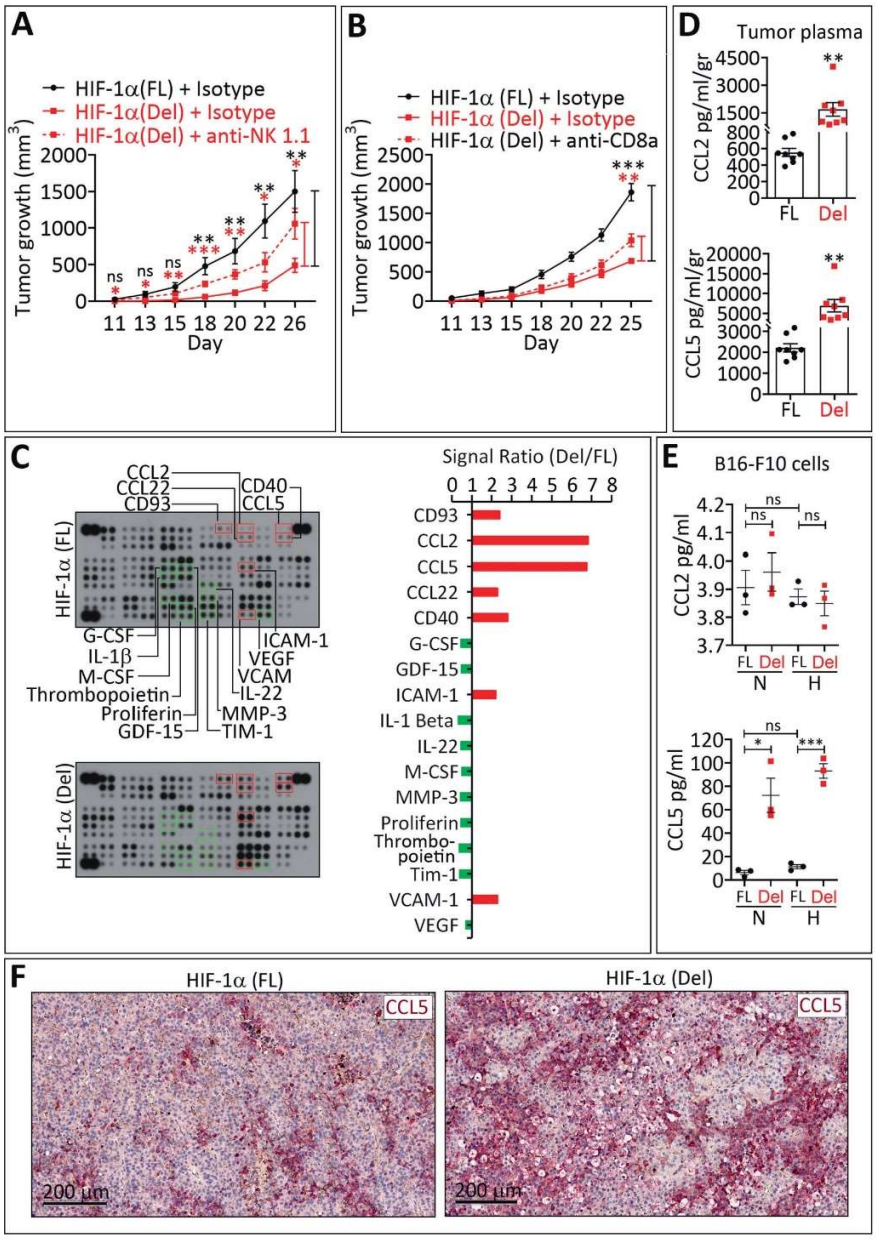
◀ **Fig. 2 Targeting the transcriptional activity of HIF-1α inhibits B16-F10 tumor growth and weight, improves mice survival, and increases NK and $CD8^+$ immune effector cells infiltration.** **A** Tumor growth curves of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 melanoma cells subcutaneously implanted in syngeneic host C57BL/6 mice. Growth curves are reported as the average of 30 (HIF-1α FL) and 29 (HIF-1α Del) mice per group pooled from three independent experiments conducted with at least 6 mice per group. The curve represents mean ± SEM. *** = $p < 0.001$ determined by unpaired two-tailed Student's *t* test. **B** Weight in grams (g) of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 melanoma tumors at day 19. Data are reported as the average of 18 (HIF-1α (FL)) and 17 (HIF-1α (Del)) mice pooled from two independent experiments performed with at least 5 mice per group. Results are presented as mean ± SEM. *** = $p < 0.001$ determined by unpaired two-tailed Student's *t* test. Representative pictures of five HIF-1α (FL) and five HIF-1α (Del) tumors are shown in the right. **C** Kaplan–Meier survival curves of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 melanoma. Results are generated from 19 tumor-bearing mice per group. Death, tumor necrosis, or tumor size ≥2000 mm^3 define the occurrence of a death event. *** = $p < 0.0001$ determined by the Log-rank (Mantel Cox) test. **D** CA 9 immunohistochemical staining (red) performed on HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 melanoma tumors. Scale bar: 300 µm. **E** Tumor growth curves of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 melanoma cells subcutaneously transplanted in immuno-deficient NOD scid gamma mouse (NSG) mice. Results are reported as an average of 10 (HIF-1α (FL)) and 9 (HIF-1α (Del)) mice per group. Error bars represent mean ± SEM. ns = not significant determined by unpaired two-tailed Student's *t* test. **F** Immunohistochemical staining of CD45+ cells (red) performed on HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 melanoma. Lower panels represent a magnification of the delineated tumors area of the upper panels. Scale bars: 100 µm (upper panels); 60 µm (lower panels). **G** Quantification of $CD45^+$ leukocyte infiltration (gated in live cells) in HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 melanoma tumors. Results are reported as the average of 14 mice per group, pooled from two independent experiments conducted with at least 5 mice per group (each dot represents one tumor). Error bars represent mean ± SEM. *** = $p < 0.001$ determined by two-tailed Student's *t* test. **H** Quantification of NK cells ($NK1.1^+$), $CD4^+$ T effector cells ($CD4^+$), and $CD8^+$ T cells ($CD8^+$) percentage infiltrating HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 melanoma by flow cytometry (gated in live $CD45^+$ cells). Bars represent the average of 14 mice per group pooled from two independent experiments conducted with at least 5 mice per group (each dot represents one tumor). Error bars represent mean ± SEM. ns = not significant, * = $p < 0.05$ and *** = $p < 0.001$ determined unpaired two-tailed Student's *t* test. **I** Quantification of $CD69^+$ activated NK cells (left panel) and $CD8^+$ T cells (right panel) infiltrating the B16-F10 melanoma expressing FL or Del HIF-1α. Data are reported as mean florescence intensity (MFI) and represent the average ± SEM (error bars) of 14 mice per group (each dot represents one tumor). Statistically significant differences (indicated by asterisks) are calculated compared to FL tumors using an unpaired two-tailed Student's *t* test (ns = not significant). **J** ELISA quantification of IFN-γ secreted in the microenvironment of B16-F10 melanoma expressing HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del). Data are reported in pg/ml standardized to excised tumor weight (gr) and represent the mean of 6 tumors per group ± SEM (each dot represents one mouse). Statistically significant differences (indicated by asterisks) are calculated compared to FL tumors using an unpaired two-tailed Student's *t* test (** = $p < 0.005$).

Further experiments must be carried out to determine which cell subtypes are responsible for the release of CCL2 in the microenvironment of HIF-1α (Del) tumors. We believe that, relative to CCL2, CCL5 regulation in B16-F10 tumor cells following HIF-1α deletion plays a major chemotaxis role in driving immune effectors and subsequently reshaping the tumor microenvironment. Therefore, it would be interesting to analyze the infiltration of immune cells reported to be a major source of CCL2 such as MDSC and tumor associated macrophages (TAMs).

Depending on its expression level, CCL2 can play a role as pro- or anti-tumorigenic factor [24]. In B16-F10 melanoma, it has been reported that targeting CCL2 reduced malignant pleural effusion and enhanced mice survival compared to control [25]. Conversely, other study showed that CCL2 inhibits B16-F10 tumor growth in C57Bl/6 mice by inducing the homing of adoptively transferred human cytotoxic lymphocytes (CTLs) to the tumor microenvironment [26]. Therefore, we believe that the role of CCL2 and the mechanism involved in its indirect regulation following HIF-1α deletion need to be more extensively investigated. Our attempt to stain CCL2 in the tumor microenvironment of HIF-1α (Del) tumors failed (data not shown). This failure is most likely due to the relatively weak expression of CCL2 compared to CCL5.

Treating melanoma-bearing mice with ACF increases the release of CCL5 in the tumor microenvironment and improves the infiltration of CD3+ and CD4+ effector cells

Our results described above strongly argue that therapeutic strategies preventing HIF-1α/HIF-1β dimerization would improve cancer immunotherapies by inducing the infiltration of immune effectors. We therefore evaluate the role of ACF on the infiltration of lymphoid cells into B16-F10 melanoma. We first showed that ACF treatment of cells, pre-cultured in vitro under hypoxia, significantly decreased hypoxia-dependent overexpression of *Slc2a1* and *Vegf* in a dose-dependent manner. Under these experimental conditions in vitro, we did not observe any changes in the mRNA expression of Ccl2 and Ccl5 (Supplementary Fig. 2G). This could be related to the experimental conditions of the in vitro treatment with ACF or/and to the mode of action of ACF which could be broader than a strict inhibition of HIF-1 α/β heterodimerization. However, treatment of B16-F10 tumor bearing mice with ACF (2 mg/Kg) significantly increased the infiltration of $CD45^+$ cells as well as $CD3^+$, total $CD4^+$ and $CD4^+$ effector T cells associated with a decrease in the infiltration of Treg cells (Fig. 4A). The activation marker CD69 and the exhaustion marker PD-1 were up- and down-regulated, respectively, only in $CD4^+$ effector T cells (Supplementary Fig. 3A–C). Interestingly, ACF-treated tumors showed a significant increase in both CCL2 and CCL5 in the tumor microenvironment (Fig. 4B).


A
HIF-1α(FL) + Isotype
HIF-1α(Del) + Isotype
HIF-1α(Del) + anti-NK 1.1
Tumor growth (mm3)
Day
B
HIF-1α (FL) + Isotype
HIF-1α (Del) + Isotype
HIF-1α (Del) + anti-CD8a
Tumor growth (mm3)
Day
D
Tumor plasma
CCL2 pg/ml/gr
CCL5 pg/ml/gr
FL
Del
C
CCL2
CCL22
CD93
CD40
CCL5
HIF-1α (FL)
G-CSF
IL-1β
M-CSF
Thrombopoietin
Proliferin
GDF-15
ICAM-1
VEGF
VCAM
IL-22
MMP-3
TIM-1
HIF-1α (Del)
Signal Ratio (Del/FL)
CD93
CCL2
CCL5
CCL22
CD40
G-CSF
GDF-15
ICAM-1
IL-1 Beta
IL-22
M-CSF
MMP-3
Proliferin
Thrombo-poietin
Tim-1
VCAM-1
VEGF
E
B16-F10 cells
CCL2 pg/ml
CCL5 pg/ml
FL Del FL Del
N H
F
HIF-1α (FL)
HIF-1α (Del)
CCL5
200 µm

◀ **Fig. 3 The infiltration of NK and CD8$^+$ T cells into HIF-1α Del tumors is associated with the release of CCL5 from tumor cells.** **A** Tumor growth curves of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 cells transplanted in C57BL/6 mice untreated (Isotype) or treated with NK-depleting antibody (anti-NK1.1). Mice were injected intraperitoneally with 200 µg of Isotype or anti-NK1.1 three days before the engraftment tumor cells and at days 0, 4, 8, 11, 15, 18 and 22 after the engraftment. Results are reported as average of 10 mice per group for [HIF-1α (FL) + Isotype] and [HIF-1α (Del) + anti-NK] groups, and 8 mice per group for [HIF-1α (Del) + Isotype] group. Error bars represent mean ± SEM. ns = not significant, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ and *** = $p < 0.001$ determined by unpaired two tailed Student's t test. **B** Tumor growth curves of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 cells transplanted in untreated (Isotype) or CD8a-depleted (anti-CD8a) C57BL/6 mice. Mice were injected intraperitoneally with 200 µg of Isotype or anti-CD8a antibody three days before the engraftment tumor cells and at days 0, 4, 8, 11, 15, 18 and 22 after the engraftment. Data are reported as average of 8 mice per group for [HIF-1α (FL) + Isotype] group, 5 mice per group for [HIF-1α (Del)+ Isotype] and 7 mice per group for [HIF-1α (Del)+ anti-CD8]. Error bars represent mean ± SEM. ns = not significant, ** = $p < 0.01$ and *** = $p < 0.001$ determined by unpaired one tailed Student's t test. **C** Cytokines/chemokines profiling in tumor lysate of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del)B16-F10 tumors using Mouse XL Cytokine Array. Left panel: Cytokines/chemokines up- and down-regulated in HIF-1α (Del) compared to HIF-1α (FL) B16-F10 tumor are highlighted in red and in green, respectively. Right panel: signal ratio of HIF-1α Del/HIF-1α FL (Del/FL). Mouse XL Cytokine Array for cytokines/chemokines profiling was performed once. **D** ELISA quantification of CCL2 and CCL5 in tumor plasma of HIF-1α (FL)and HIF-1α (Del)B16-F10 tumors. Data are reported in pg/ml/g of tumor. Bars represent an average of 8 mice. Error bars represent mean ± SEM. ** = $p < 0.01$ determined by unpaired two tailed Student's t test. **E** ELISA quantification of CCL2 and CCL5 released in the supernatant of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 cells cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% pO_2, H) conditions for 24 h. Bars are mean ± SEM from three independent experiments. ns = not significant, *** = $p < 0.001$ determined by unpaired two tailed Student's t test.

Combining ACF improves the therapeutic benefit of TRP-2-based vaccine and anti-PD-1 in melanoma

We next evaluated the therapeutic benefit of combining ACF with two well-known immunotherapy approaches (anti-PD-1 immune checkpoint blockade antibody and TRP-$2_{180\text{-}188}$ peptide vaccination strategy) (Fig. 4C) which reactivate CD8$^+$ T cells in B16-F10 melanoma [9, 27]. Our results showed that anti-PD-1 treatment alone had no impact on B16-F10 tumor growth and tumor weight. Although the TRP-2-based vaccine resulted in a significant inhibition of tumor growth, tumors continued to grow at a slower but constant rate. ACF treatment alone induced a moderate inhibition of tumor growth and tumor weight in B16-F10 melanoma (Fig. 4D and Supplementary Fig. 3D). Interestingly, triple combination therapy (anti-PD-1 + TRP-2 + ACF) completely inhibited tumor growth compared to either the double combination therapy (anti-PD-1 + TRP-2) or control (Fig. 4D), indicating that ACF can improve cancer immunotherapy approaches based on immune checkpoint blockade and peptide-based vaccination strategies. Our data are in line with several studies highlighted the relevance of targeting hypoxia-associated pathways in tumors to enhance immunotherapy efficacy [28, 29].

Assessing the therapeutic value of CCL5 in melanoma patients

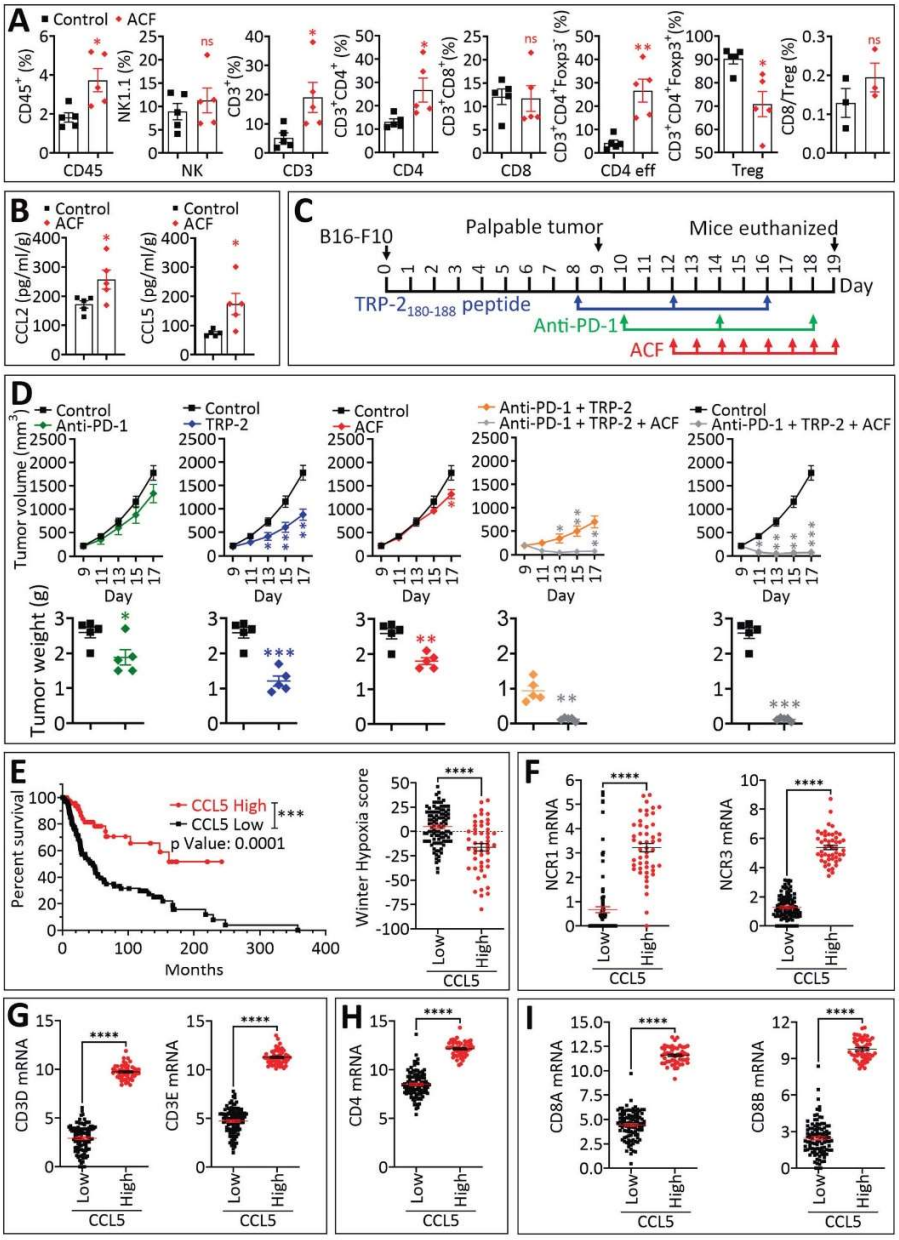
We next investigated whether infiltration of major cytotoxic immune cells correlates with the hypoxia status in 473 melanoma patients from TCGA database. We identified two groups of melanoma expressing low and high level of CCL5 mRNA and showed that the median survival of melanoma patients expressing high CCL5 is significantly better than those expressing low CCL5 (Fig. 4E). Interestingly, according to Winter hypoxia score, "CCL5 high melanomas" are less hypoxic than "CCL5 low melanomas" (Fig. 4E, right panel). Remarkably, the infiltration of NK cells, CD3, CD4, and CD8 T cells, assessed by the mRNA expression of their respective markers NCR1 and NCR2, CD3D and CD3E, CD4, and CD8A and CD8B, is increased in "CCL5 high melanomas" compared to "CCL5 low melanomas" (Fig. 4F–I). Data about TCGA patients are provided in Supplementary Table 1. It should highlighted that hypoxic signature was found enriched in metastatic melanoma patients non-responding to anti-PD-1 [30].

Concluding remarks

Our study revealed that blocking the transcriptional activity of HIF-1α, by disrupting HIF-1α/HIF-1β dimerization, significantly inhibited B16-F10 melanoma growth and increased the infiltration of NK and CD8$^+$ T cells into the tumor microenvironment by a mechanism involving the release of CCL2 and CCL5 chemokines. Together, our data strongly argue that therapeutic strategies disrupting HIF-1α/HIF-1β dimerization would be able to switch the tumor microenvironment from immunosuppressive to immunopermissive for the infiltration of NK and CD8$^+$ effector T cells. Such strategies could be used to improve cancer vaccination and immune checkpoint blockade-based cancer immunotherapies in non-responder melanoma patients.

Materials and methods

Because of the word limits, materials and methods can be found in the Supplementary Information.


A
Control
ACF
CD45+ (%)
NK1.1 (%)
CD3+ (%)
CD3+CD4+ (%)
CD3+CD8+ (%)
CD3+CD4+Foxp3- (%)
CD3+CD4+Foxp3+(%)
CD8/Treg (%)
CD45
NK
CD3
CD4
CD8
CD4 eff
Treg
ns
B
CCL2 (pg/ml/g)
CCL5 (pg/ml/g)
C
B16-F10
Palpable tumor
Mice euthanized
Day
TRP-2180-188 peptide
Anti-PD-1
ACF
D
Control
Anti-PD-1
TRP-2
Anti-PD-1 + TRP-2
Anti-PD-1 + TRP-2 + ACF
Tumor volume (mm3)
Tumor weight (g)
Day
E
CCL5 High
CCL5 Low
p Value: 0.0001
Percent survival
Months
Winter Hypoxia score
Low
High
CCL5
F
NCR1 mRNA
NCR3 mRNA
G
CD3D mRNA
CD3E mRNA
H
CD4 mRNA
I
CD8A mRNA
CD8B mRNA

◀ **Fig. 4 Pharmacological targeting of HIF-1α transcription activity using Acriflavine improves the therapeutic benefit of anti-PD-1 immune checkpoint- and TRP-2 vaccine-based cancer immunotherapy. A** Quantification of the infiltration of $CD45^+$ cells and lymphoid cells (NK, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+$ eff, CD8, and Treg) and CD8/Treg ratio in control and ACF-treated B16-F10 tumors. Data are reported as the percentage (%) of CD45 and represent the mean ± SEM (error bars) of 5 tumors per group (each dot represents one tumor). Statistically significant differences (indicated by asterisks) are calculated compared to control tumors using an unpaired two-tailed Student's *t* test (ns = not significant; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$). **B** ELISA quantification of CCL2 and CCL5 in tumor plasma of control and ACF-treated tumors. Data are reported in pg/ml/g of tumor and represent the mean ± SEM (error bars) of 5 tumors (each dot represents one tumor). Statistically significant differences (indicated by asterisks) are calculated compared to control tumors using an unpaired two-tailed Student's *t* test (* = $p < 0.05$). **C** Schematic representation of the triple combination strategy including anti-PD-1, ACF, and TRP-$2_{180\text{-}188}$ peptide in B16-F10 tumor-bearing mice. 0.2×10^6 B16-F10 cells were subcutaneously (s.c.) injected into the right flank of syngeneic host C57BL/6 mice at day 0. When tumors were palpable (typically at day 8), TRP-$2_{180\text{-}188}$ peptide was injected s.c. (100 µg TRP-$2_{180\text{-}188}$ and 50 µg CpG ODN emulsified in 100 µL of IFA) in the left posterior part of mice. The vaccination was boosted twice at day 12 and day 16 (blue arrows). Mice were injected intraperitoneally with 100 µg of anti-PD-1 or control isotype at days 10, 14, and 18 (green arrows). Daily ACF treatment (2 mg/kg) was administered intraperitoneally from day 12 to 19 (red arrows). **D** B16-F10 tumor growth curves and tumor weight of mice treated with either isotype (control), combined with anti-PD-1, TRP-$2_{180\text{-}188}$, or ACF. Upper panels: B16-F10 tumor growth curves in mice treated with mono, double or triple combination of anti-PD-1, TRP-$2_{180\text{-}188}$, and ACF. Lower panels: B16-F10 tumor weight (grams, g) at day 19. Results are reported as the average of 5 mice per group and shown as mean ± SEM (error bars). Absence of asterisks indicates no significant difference, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, and *** = $p < 0.001$ determined by unpaired two-tailed Student's *t* test. **E** Left panel: Kaplan–Meier median survival curves of the two melanoma patient cohorts expressing high and low CCL5 mRNA. Patients displaying high CCL5 have significantly improved median survival compared to those having low CCL5. A *p* value of 0.0001 was determined using the Log-rank (Mantel-Cox) test. Right panel: Winter hypoxia score of patients expressing low and high CCL5 mRNA. **F-I** The expression of markers for different immune cells in melanoma patient cohorts described in (**E**). (**F**) NCR1 and NCR3 for NK cells; (**G**) CD3D and CD3E for CD3 cells; (**H**) CD4 for CD4; and (**I**) CD8A and CD8B for CD8 T cells. Statistically significant differences (indicated by asterisks) are calculated compared to patients expressing low CCL5 mRNA using an unpaired two-tailed Student's *t* test (****** = $p < 0.0001$).

Acknowledgements We thank Dr Anne Largeot from Tumor Stroma interactions group (Luxembourg Institute of Health) for her technical assistance. This work was supported by Luxembourg Institute of Health and grants from FNRS Televie (grants 7.4535.16, 7.6505.18 and n°7.4606.18); Luxembourg National Research Fund (C18/BM/12670304/COMBATIC and PRIDE15/10675146/CANBIO); Fondation Cancer, Luxembourg (FC/2018/06); Kriibskrank Kanner Foundation, Luxembourg (2019); Janssen Cilag Pharma; Roche Pharma, Action LIONS Vaincre le Cancer Luxembourg and Sheik Hamdan Bin Rashid Al Maktoum Foundation, United Arab Emirates.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

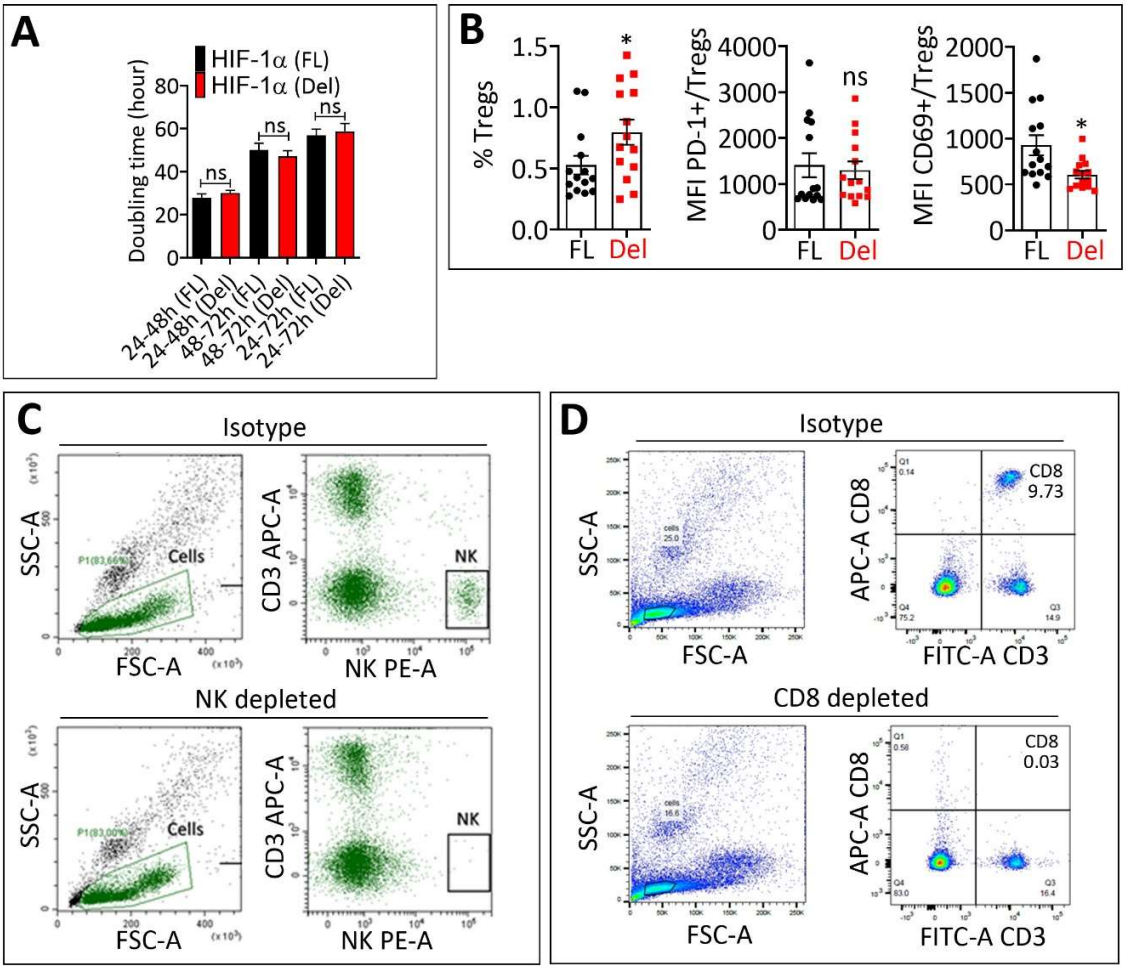
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. Br J Radio. 2014;87:20130676.
2. Span PN, Bussink J. Biology of hypoxia. Semin Nucl Med. 2015;45:101–9.
3. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2003;3:721–32.
4. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene 2010;29:625–34.
5. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. Cancer Treat Rev. 2003;29:297–307.
6. Colliez F, Gallez B, Jordan BF. Assessing tumor oxygenation for predicting outcome in radiation oncology: a review of studies correlating tumor hypoxic status and outcome in the preclinical and clinical settings. Front Oncol. 2017;7:10.
7. Baginska J, Viry E, Berchem G, Poli A, Noman MZ, van Moer K, et al. Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110:17450–5.
8. Noman MZ, Buart S, Romero P, Ketari S, Janji B, Mari B, et al. Hypoxia-inducible miR-210 regulates the susceptibility of tumor cells to lysis by cytotoxic T cells. Cancer Res. 2012;72:4629–41.
9. Noman MZ, Janji B, Kaminska B, Van Moer K, Pierson S, Przanowski P, et al. Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. Cancer Res. 2011;71:5976–86.
10. Berchem G, Noman MZ, Bosseler M, Paggetti J, Baconnais S, Le Cam E, et al. Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF-beta and miR23a transfer. Oncoimmunology 2016;5:e1062968.
11. Chouaib S, Noman MZ, Kosmatopoulos K, Curran MA. Hypoxic stress: obstacles and opportunities for innovative immunotherapy of cancer. Oncogene 2017;36:439–45.
12. Lequeux A, Noman MZ, Xiao M, Sauvage D, Van Moer K, Viry E, et al. Impact of hypoxic tumor microenvironment and tumor cell plasticity on the expression of immune checkpoints. Cancer Lett. 2019;458:13–20.
13. Noman MZ, Hasmim M, Lequeux A, Xiao M, Duhem C, Chouaib S, et al. Improving cancer immunotherapy by targeting the hypoxic tumor microenvironment: new opportunities and challenges. Cells. 2019;8:1083.
14. Messai Y, Gad S, Noman MZ, Le Teuff G, Couve S, Janji B, et al. Renal cell carcinoma programmed death-ligand 1, a new direct

target of hypoxia-inducible factor-2 alpha, is regulated by von Hippel-Lindau gene mutation status. Eur Urol. 2016;70:623–32.
15. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. J Exp Med. 2014;211:781–90.
16. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. Cancer Res. 2014;74:665–74.
17. Zhang H, Lu H, Xiang L, Bullen JW, Zhang C, Samanta D, et al. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112:E6215–23.
18. Deng J, Li J, Sarde A, Lines JL, Lee YC, Qian DC, et al. Hypoxia-Induced VISTA Promotes the Suppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. Cancer Immunol Res. 2019;7:1079–90.
19. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. Trends Pharm Sci. 2012;33:207–14.
20. Scholz CC, Taylor CT. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. Curr Opin Pharm. 2013;13:646–53.
21. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:17910–5.
22. Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:19579–86.
23. Burke JD, Young HA. IFN-gamma: a cytokine at the right time, is in the right place. Semin Immunol. 2019;43:101280.
24. Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. J Immunol. 1992;148:1280–5.
25. Stathopoulos GT, Psallidas I, Moustaki A, Moschos C, Kollintza A, Karabela S, et al. A central role for tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 in malignant pleural effusion. J Natl Cancer Inst. 2008;100:1464–76.
26. Brown CE, Vishwanath RP, Aguilar B, Starr R, Najbauer J, Aboody KS, et al. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. J Immunol. 2007;179:3332–41.
27. Noman MZ, Parpal S, Van Moer K, Xiao M, Yu Y, Viklund J, et al. Inhibition of Vps34 reprograms cold into hot inflamed tumors and improves anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. Sci Adv. 2020;6:eaax7881.
28. Jayaprakash P, Ai M, Liu A, Budhani P, Bartkowiak T, Sheng J, et al. Targeted hypoxia reduction restores T cell infiltration and sensitizes prostate cancer to immunotherapy. J Clin Invest. 2018;128:5137–49.
29. Scharping NE, Menk AV, Whetstone RD, Zeng X, Delgoffe GM. Efficacy of PD-1 blockade is potentiated by metformin-induced reduction of tumor hypoxia. Cancer Immunol Res. 2017;5:9–16.
30. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and transcriptomic features of response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. Cell 2016;165:35–44.

Supplementary Figure 1. Lequeux et al.



Legends for supplementary Figure 1

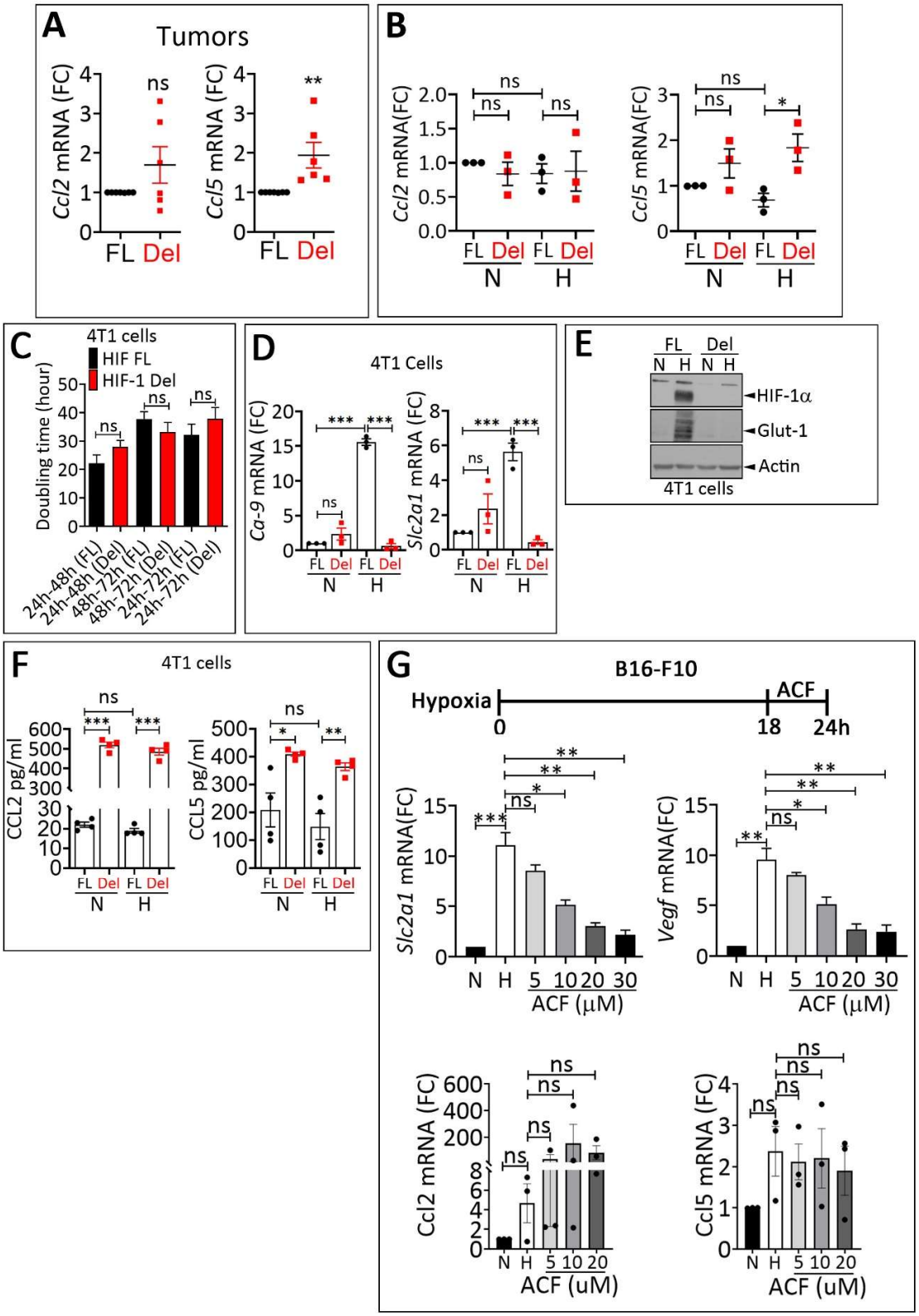
(A) XTT assay to evaluate the doubling time of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 cells at indicated time intervals under hypoxia (0.1% pO_2) conditions. The average of eight replicates is reported. The error bars represent mean ± SEM. ns = not significant determined by an unpaired two-tailed Student's *t*-test.

(B) Quantification of the infiltration of Treg (left panel), PD-1+ Treg (middle panel) and CD69+ Treg (right panel) in B16-F10 melanoma expressing (FL) or (Del) HIF-1α. Data are reported as the percentage (%) of live cells for Treg quantification or mean florescence intensity (MFI) for PD-1 and CD69 expression and represent the mean ± SEM (error bars) of 14 mice per group, (each dot represents one mouse). Statistically significant differences (indicated by asterisks) are calculated relative to (FL) tumors using an unpaired two-tailed Student's t-test (ns= not significant; * = $p<0.05$).

(C) Flow cytometry dot plot analysis of NK cells in representative blood samples from HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 tumor-bearing mice untreated (isotype) or treated with anti-NK1.1 antibody. The NK cell subset was defined in the selected cell population as CD3- $NK1.1^+$ cells.

(D) Flow cytometry dot plot analysis of CD8 cells in representative blood samples from HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 tumor-bearing mice untreated (Isotype) or treated with anti-CD8a antibody. The $CD8^+$ cell subset was defined in the selected cell population as CD3+ CD8+ cells.

Supplementary Figure 2. Lequeux et al.



Legends for supplementary Figure 2

(A) RT-qPCR quantification of *Ccl2* and *Ccl5* gene expression in HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 tumors. Data are reported as fold change (FC). Results represent the mean ± SEM (error bars) of 6 mice per group (each dot represents one mouse). ns = not significant, ** =p< 0.005, calculated using an unpaired two-tailed Student's *t*-test.

(B) RT-qPCR quantification of Ccl2 and Ccl5 gene expression in HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) B16-F10 cells cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% pO_2, H) conditions for 24 hours. Data are reported as fold change (FC). All results are shown as mean ± SEM. ns = not significant, * = p<0.05 calculated using an unpaired two-tailed Student's *t*-test.

(C) XTT assay to evaluate the doubling time of HIF-1α (FL) and HIF-1α (Del) 4T1 cells at indicated time intervals under hypoxia (0.1% $p0_2$) conditions. The average of eight replicates is reported. The error bars represent mean ± SEM. ns = not significant determined by an unpaired two-tailed Student's *t*-test.

(D) RT-qPCR quantification of *Ca-9* and *Slc2a1* gene expression in HIF-1α FL (FL) and HIF-1α Del (Del) 4T1 cells cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% pO_2, H) conditions for 24 hours. Results are reported as fold change (FC) and represent the average of three independent experiments. Error bars indicate ± SEM. *** = p<0.001 determined by unpaired two-tailed Student's *t*-test.

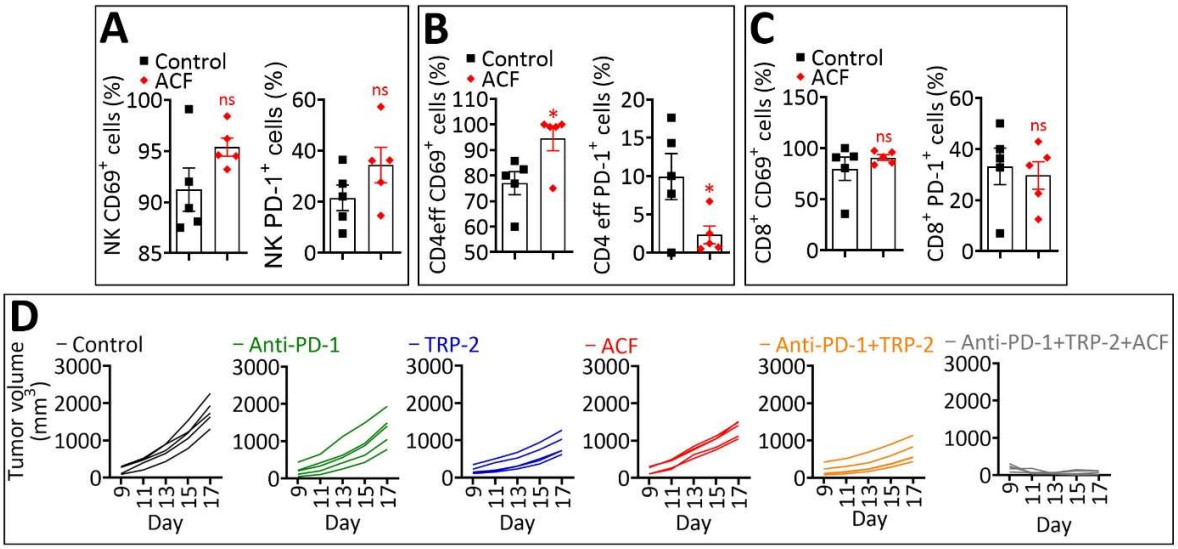
(E) Western-blot analysis of HIF-1α and GLUT-1 protein expression in HIF-1α FL and HIF-1α Del 4T1 cells cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% 0_2 pO_2, H) conditions for 24 hours. Actin was used as a loading control.

(F) ELISA quantification of CCL2 and CCL5 released in the supernatant of HIF-1α FL and HIF-1α Del 4T1 cells cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% pO_2, H) conditions for 24 hours. Results are reported as mean ± SEM from three independent experiments. ns = not significant, * = p<0.05, **, P < 0.01, *** = p<0.001 determined by unpaired two tailed unpaired Student's t test.

(G) *Upper panel:* Treatment strategy of B16-F10 cells cultured under hypoxia with different concentrations of ACF (left panel). *Middle panels:* RT-qPCR quantification of Glut-1 (*Slc2a1*) and *Vegf*

gene expression in B16-F10 cells cultured under normoxia (21% pO_2, N) or hypoxia (0.1% pO_2, H) conditions for 24 hours and treated with different concentrations of ACF (5, 10, 20, and 30 µM) for last 6 hours. Data are reported as fold change (FC) and represent the average of three independent experiments. The error bars represent mean ± SEM. ns = not significant, * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, and *** = $p<0.001$ calculated using an unpaired two-tailed Student's *t*-test. *Lower panels:* RT-qPCR quantification of Ccl2 and Ccl5 gene expression in B16-F10 cells cultured normoxia (21% pO2, N) or hypoxia (0.1% pO2, H) conditions for 24 hours and treated with different concentrations of ACF (5, 10 and 20 µM) for last 6 hours. Data are reported as fold change (FC) and represent the average of three independent experiments ± SEM. ns = not significant, calculated using an unpaired two-tailed Student's t-test. All results are shown as mean ± SEM. ns = not significant, * = $p<0.05$, *** = $p<0.001$, calculated using an unpaired two-tailed Student's *t*-test.

Supplementary Figure 3. Lequeux et al.



Legends for supplementary Figure 3

A-C: Quantification of the activation marker CD69 (left panels) and exhaustion marker PD-1 (right panels) on NK **(A)**; $CD4^+$ eff **(B)** and $CD8^+$ T cells **(C)** infiltrating control and ACF-treated B16-F10 tumors. Data are reported as the percentage (%) of CD45 cells and represent the mean ± SEM (error bars) of 5 tumors per group (each dot represents one tumor). Statistically significant differences (indicated by asterisks) are calculated compared to control tumors using an unpaired two-tailed Student's t-test (ns= not significant; * = $p<0.05$).

D: Individual curves of tumor growth in mice treated with isotype (control), anti-PD-1, TRP-$2_{(180-188)}$, ACF, double (anti-PD-1 + TRP-2) and triple (anti-PD-1 + TRP-2 + ACF) combinations.

ANNEXE III

Benoit A, Vogin G, Duhem C, Berchem G, Janji B. **Lighting Up the Fire in the Microenvironment of Cold Tumors: A Major Challenge to Improve Cancer Immunotherapy**. *Cells* **2023**, 12, 1787.

Contribution à l'article

Dans la revue intitulée « **Lighting Up The Fire In The Microenvironment of Cold Tumors : A Major Challenge To Improve Cancer Immunotherapy** » publiée en 2023 dans Cells, j'ai rédigé le manuscrit entier à l'exception de la Figure 1 et de la Figure 2, et j'ai participé à la révision du manuscrit entier.

cells

MDPI

Review

Lighting Up the Fire in the Microenvironment of Cold Tumors: A Major Challenge to Improve Cancer Immunotherapy

Alice Benoit [1], Guillaume Vogin [2,3], Caroline Duhem [4], Guy Berchem [1,4,5] and Bassam Janji [1,*]

[1] Tumor Immunotherapy and Microenvironment (TIME) Group, Department of Cancer Research, Luxembourg Institute of Health (LIH), L-1210 Luxembourg, Luxembourg; alice.benoit@lih.lu (A.B.); berchem.guy@chl.lu (G.B.)
[2] Centre National de Radiothérapie François Baclesse, L-4005 Esch-sur-Alzette, Luxembourg; guillaume.vogin@baclesse.lu
[3] Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Université de Lorraine—UMR 7365, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[4] Department of Hemato-Oncology, Centre Hospitalier du Luxembourg, L-1210 Luxembourg, Luxembourg; duhem.caroline@chl.lu
[5] Faculty of Science, Technology and Medicine, University of Luxembourg, L-4367 Belvaux, Luxembourg
* Correspondence: bassam.janji@lih.lu; Tel.: +352-26-970-285

Abstract: Immunotherapy includes immune checkpoint inhibitors (ICI) such as antibodies targeting cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) or the programmed cell death protein/programmed death ligand 1 (PD-1/PD-L1) axis. Experimental and clinical evidence show that immunotherapy based on immune checkpoint inhibitors (ICI) provides long-term survival benefits to cancer patients in whom other conventional therapies have failed. However, only a minority of patients show high clinical benefits via the use of ICI alone. One of the major factors limiting the clinical benefits to ICI can be attributed to the lack of immune cell infiltration within the tumor microenvironment. Such tumors are classified as "cold/warm" or an immune "desert"; those displaying significant infiltration are considered "hot" or inflamed. This review will provide a brief summary of different tumor properties contributing to the establishment of cold tumors and describe major strategies that could reprogram non-inflamed cold tumors into inflamed hot tumors. More particularly, we will describe how targeting hypoxia can induce metabolic reprogramming that results in improving and extending the benefit of ICI.

Keywords: immunotherapy; immune checkpoint inhibitors; tumor microenvironment; metabolic reprogramming; hypoxia

check for updates

Citation: Benoit, A.; Vogin, G.; Duhem, C.; Berchem, G.; Janji, B. Lighting Up the Fire in the Microenvironment of Cold Tumors: A Major Challenge to Improve Cancer Immunotherapy. *Cells* **2023**, *12*, 1787. https://doi.org/10.3390/cells12131787

Academic Editors: Haiyan Liu and Michael Morgan

Received: 14 April 2023
Revised: 30 June 2023
Accepted: 3 July 2023
Published: 5 July 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Immunotherapy is a treatment that aims to reactivate the immune system of cancer patients to fight tumor cells. Such therapy includes adoptive T cell therapy, anti-cancer vaccination, oncolytic viruses, and general immunotherapy consisting of the administration of interferon gamma or interleukin-2 as well as immune checkpoint inhibitors (ICI).

Briefly, immune checkpoint inhibitors are monoclonal antibodies directed against immune checkpoint receptors expressed mostly on immune cells or against their ligands expressed on tumor cells. Preventing the interaction between the immune checkpoints and their ligands modulates the function of immune cells against cancer cells. Some receptors are described as co-activators and will strengthen the activation of effector cells such as a cluster of differentiation (CD) 28 and its ligand CD80. In contrast, some receptors are called co-inhibitors, which will decrease the activation of effector cells such as programmed death protein 1 (PD-1) and its programmed death ligands PD-L1/PD-L2 [1]. Cytotoxic T lymphocytes express both types of co-activator and co-inhibitory receptors, and the complex balance between the activation and inhibition signals provided by these receptors will

shape the activation state of immune cells. Indeed, tumor cells are capable of manipulating immune checkpoints to their advantage by over-expressing inhibitory receptor ligands at their surface. Thus, cancer cells can inhibit the activation of the T cell effector and escape the immune system [2].

Immune checkpoint inhibitors used in cancer therapy are mostly directed toward two major targets: (1) cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and (2) PD-1/PD-L1. The first generation of immune checkpoints inhibitor (Ipilimumab) was directed against CTLA-4. CTLA-4 is expressed on CD4+, CD8+ T lymphocytes, regulatory T cells, and T helper cells. When the T cell receptor (TCR) of T lymphocytes recognizes a specific antigen, CTLA-4 will be produced according to the strength of the TCR signal. CTLA-4 has the same ligands as the co-activator of the CD28 receptor: CD80 and CD86. Since CTLA-4 presents a higher affinity for CD80 and CD86 ligands than CD28, the expression of CTLA-4 will inhibit lymphocyte activation [3].

The second generation of immune checkpoint inhibitors was directed against PD-1 or its ligand PD-L1. Anti-PD-1 antibodies, such as Nivolumab and Pembrolizumab, are used in the clinic for the treatment of melanoma, lung, kidney, bladder, head, and neck cancers as well as Hodgkin's lymphoma. Anti-PD-L1 agents such as Atezolizumab, Durvalumad, and Avelumab are indicated for the treatment of bladder and lung cancers as well as Merkel carcinoma. PD-1 and CTLA-4 are also expressed by CD8+, CD4+ T cells, and T regulatory (Treg) cells in the same manner as CTLA-4. Although PD-1 has two ligands (PD-L1 and PD-L2), the PD-1/PD-L1 axis seems to be the main mechanism used by cancer cells to escape the immune system [3].

ICIs have emerged as a promising new treatment yielding significant survival benefits for patients in whom other conventional therapies have failed. However, the response to immunotherapy is relatively heterogeneous according to the cancer type, and the benefits remain low for most patients [4]. Certain types of immunotherapies display severe autoimmune side effects such as the CTLA-4-specific antibody ipilimumab despite the considerable efforts made to uncouple its toxicity and efficacy and potentiate its role as a depleting antibody of regulatory T cells [5]. The limited clinical benefits for a relatively small percentage of patients rely on several factors including the absence or limited infiltration of immune cells within the microenvironment [6].

The immunoscore concept refers to the type, density, and location of immune cells in the tumor microenvironment. The immunoscore has been used to classify tumors as hot, altered-excluded, altered-immunosuppressed, and cold. This classification is based on an immunoscore from zero to four depending on the quantification of CD3 and CD8 T lymphocytes. Cold tumors have an immunoscore of zero and present no infiltration of immune cells within the tumor and the invasive margin, while hot tumors have an immunoscore of four and present high infiltration of immune cells in both areas. Altered or warm tumors have low infiltration of immune cells, either in the tumor margin only (altered-excluded tumors) or in both areas (altered-immunosuppressed tumors) [7,8].

Cold, altered, and warm tumors present low or no clinical benefits from the use of immune checkpoint inhibitors. Therefore, reprograming these tumors into hot, inflamed, and immune-infiltrated tumors is now a well-defined strategy to improve the patient's response to anti-CTLA-4 and anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. This review will summarize some tumor characteristics associated with the lack of immune cell infiltration within the microenvironment of cold tumors. We will also focus on emerging strategies for reprogramming non-inflamed cold tumors into inflamed hot tumors, with a focus on metabolic reprogramming by targeting hypoxia.

2. Factors Involved in the Establishment of Immune Desert Tumors

In this section, we will discuss the main factors contributing to the establishment of cold desert immune tumors.

2.1. Defects in the Cancer-Immunity Cycle

The cancer immune cycle contains multiple steps. The first step is the production of tumor antigens by cancer and normal cells. These antigens are then recognized and presented to the effector T cells by antigen-presenting cells (APCs). T cells are then activated and co-stimulated, leading to an anti-tumoral response toward cancer cells. The absence of effector immune cells infiltration within the tumor microenvironment could relate to (i) a lack or low expression of tumor antigens, (ii) a deficiency in the recruitment of APCs that result in a decrease in T cell activation and co-stimulation, (iii) an immunosuppressive tumor microenvironment, and (iv) the dysregulation of the cytokine/chemokine network [9]. In this section, we will briefly describe how each step of the cancer-immunity cycle contributes to the establishment of immune desert or cold tumors (Figure 1).

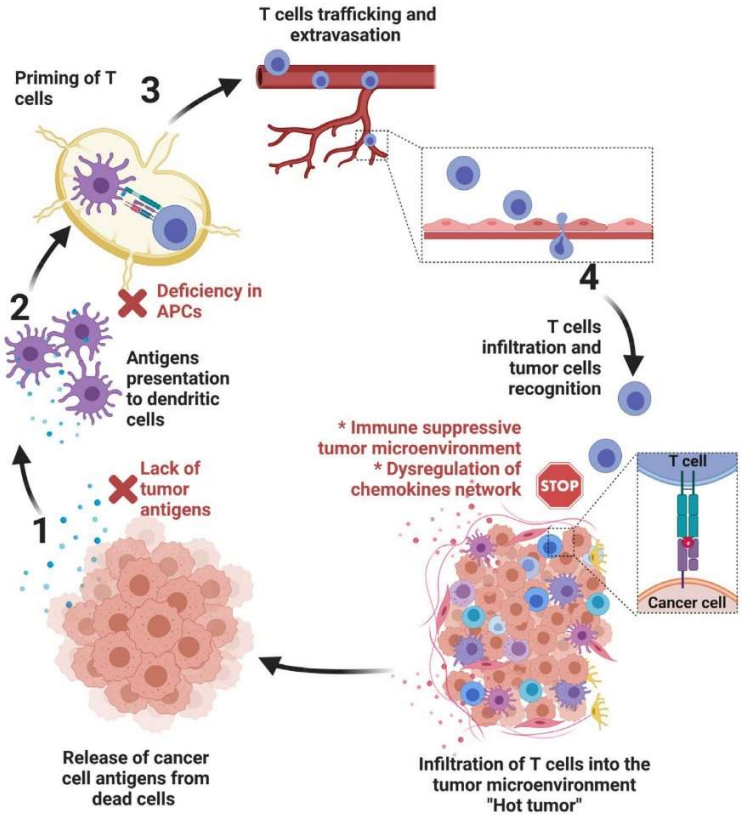


Figure 1. The different steps of the cancer-immunity cycle. Briefly, the first step of the cycle consists of releasing antigens from tumor cells (1). These antigens are captured by dendritic cells on MHC-I and MHC-II molecules (2) and presented to T cells (3). This step results in T cell priming and activation in lymph nodes. Activated T cells migrate through the blood vessels to infiltrate the tumor microenvironment (4). Defects in several steps in the cancer-immunity cycle results in the establishment of cold tumors (reported in red).

2.1.1. Low Expression of Tumor Antigens

Recognition of tumor antigens constitutes a key step of the anti-tumor immune cycle. Tumor antigens can be categorized into two classes: (1) tumor-specific antigens (TSAs)

produced by cancer cells only and not healthy cells, and (2) tumor-associated antigens (TAAs) that can be produced by both cancer and normal healthy cells but are present on elevated levels on tumor cells. These antigens are generated from a wild range of genes that have undergone diverse mutations to ultimately express abnormal proteins. Basically, antigens are necessary to trigger immune responses and unleash adaptive immune responses after repeated presentation of these antigens. Following their recruitment, APCs will be in charge to present antigen fragments to T cells to activate them to kill cancer cells and eliminate tumors. However, the immune system cannot recognize the majority of tumor antigens because they are considered to be self-proteins [10].

We can distinguish different types of TAAs. These include overexpressed proteins or lineage-specific markers of differentiation expressed by tumors as well as cancer germline antigens (CGAs) expressed by tumors, trophoblasts, testis, and fetal ovaries. For TSAs, we can differentiate oncoviral antigens that are expressed by virus-associated tumors such as cervical cancer caused by HPV, and neoantigens that are produced by tumor cells due to genomic mutations [10].

As previously reported, TAAs are self-antigens that are not mutated and expressed in healthy tissues; thus, there is a lack of immunogenicity and tolerance by immune cells. In addition, targeting these TAAs with high-affinity TCRs could cause toxicity and destruction of normal tissues expressing these antigens because of a so-called "on-target toxicity." This could also cause unintentional cross-reactivity expressing normal proteins with a similar structure called "off-target toxicity" [11]. A well-known example of tumor-associated antigens from the self is the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)—a transmembrane receptor involved in the regulation of cell proliferation. In HER2-positive breast cancer and other types of cancers, HER2 is overexpressed and promotes cancer cell proliferation and survival. Tumor mutational burden (TMB) is defined as the total number of mutations per analyzed tumor genomic region. TMB has been proposed as a biomarker of the response to anti-PD-1 therapy [12]. The low number of neoantigens or tumor mutational burden is frequently associated with a weak response to immunotherapy.

2.1.2. Deficiency in APC Recruitment and Maturation/Activation

Following the recognition of tumor antigens, the second step of the immune response is the presentation of these antigens by APCs to T cells. Several subtypes of APCs have been characterized including conventional dendritic cells (cDC) type-1 (cDC1s) and type-2 (cDC2s), plasmacytoid DC (pDCs), monocyte-derived DCs (MoDCs) also known as inflammatory DC (iDCs), macrophages, and Langerhans cells. Although each subtype of APC is responsible for different functions in the immune response, the type-1 DCs (cDC1s) are the most important for the anti-tumor immune response because they are responsible for inducing anti-tumor CD8 T cell responses after the presentation of tumor antigens via the class I major histocompatibility complex (MHC-I) [13]. It is now well established that the cross-presentation of antigens by cDC1s promotes a key CTL response in the tumor microenvironment, although other subsets of dendritic cells such as monocyte-derived dendritic cells (moDCs) can also participate in the cross-presentation of antigen and CTL priming [14]. In addition, cDC1s are important in the response to PD-L1 therapy [15], and patient survival has been positively correlated with the abundance of tumor-infiltrating cDC1, making cDC1 a key factor in the anti-tumor response [15–17].

DCs need to be activated to induce an effective T cell-mediated anti-tumor response. This activation is characterized by the expression of pattern recognition receptors (PRRs) and binding of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or danger-associated molecular patterns (DAMPs) [18]. Low production or absence of PAMPs or DAMPs could be related to the lack of dendritic cell maturation and subsequently the absence of naïve T cell priming/activation. Moreover, activation of APCs is driven by stimulation of their CD40 receptors. Such stimulation regulates the expression of co-activator receptors CD80 and CD86, which are present on T cells [19]. Subsequently, a defect in APC stimulation leads to a reduction in anti-tumor responses driven by CD8+ T cells.

2.1.3. Immunosuppressive Tumor Microenvironment

Suppressive immune cells such as tumor-associated macrophages (TAMs), cancer-associated fibroblasts (CAFs), Tregs, and MDSCs are major components involved in establishing an immunosuppressive tumor microenvironment. TAMs are recruited to the tumor microenvironment and undergo polarization to generate macrophages displaying anti-tumoral phenotype (M1) or macrophages exhibiting a pro-tumoral phenotype (M2) [20]. The pro-tumoral M2 macrophages promote angiogenesis, metastasis, as well as key signaling pathways involved in treatment resistance [21]. In contrast to normal fibroblasts which are activated following the wound healing process, inflammation, or fibrosis, CAFs are constitutively-activated stromal cells producing ECM, growth factors, and cytokines to promote angiogenesis and recruit immune suppressive cells [22]. Tregs are among the most abundant suppressive cells in the tumor microenvironment. They have a key role in maintaining immune homeostasis, and their abundance is associated with poor prognosis for cancer patients [23]. Tregs are also associated with cancer progression, invasion, and metastasis; they are valuable targets in the treatment of cancer [24]. Finally, MDSCs are major regulators of cancer progression by secreting cytokines such as TGF-β, VEGF, and MMP9 to promote angiogenesis and metastasis. MDSCs also interact with NK, T cells, and macrophages to exert immunosuppressive effects and inhibit their activation. MDSCs promote the proliferation and activation of Tregs [25].

In addition to the presence of immunosuppressive cells, several pathways have been identified as key components involved in T cell exclusion. Indeed, a loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN) has been correlated with the expression of immunosuppressive cytokines and decreased T cell infiltration to the tumor microenvironment in addition to an increase in tumor resistance to immunotherapy [26]. Another pathway involved in T cell exclusion is the WNT/β-catenin pathway. In melanoma, tumor-intrinsic active β-catenin signaling has been associated with the absence of type-1 DCs and effector CD8+ T cells in addition to resistance to anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 therapy [27].

Together with the suppressive immune cells described above, hypoxic stress in the tumor microenvironment plays a major role in immune resistance and contributes to the impairment of immune cell-mediated tumor killing [28–32]. Emerging new data demonstrates that hypoxia is involved in the alteration of tumor metabolism and metabolites, pH regulation, and overexpression of several immune checkpoints including macrophage immune checkpoints CD47, PD-L1, and HLA-G [29,30,32,33]. Manipulating hypoxia is thus a valuable target for enhancing anti-tumor immune responses. Targeting hypoxia or hypoxia-downstream pathways has been reported to enhance T cell- and NK-cell-mediated tumor cell killing (reviewed in [34–36]).

2.1.4. Dysregulation of the Chemokines and Cytokines Network

The chemokine network is an important contributor to immune cell trafficking and immune infiltration. In the context of cancer, inflammatory pathways are dysregulated, resulting in enhanced chemokine release. This dysregulation has an impact on cancer progression by affecting the infiltration of immune cells into the tumor microenvironment. Indeed, it has been reported that the chemokine ligands CXCL9, 10, 11, and 16 as well as CX3CL1 are responsible for recruiting T cells and natural killer (NK) cells into the tumor. CCL19 and 21 can promote the recruitment of DCs into T cell priming sites, thus leading to T cell activation [37]. Higher levels of CXCL16 have been associated with increased tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and better prognosis in colorectal cancer [38]. In melanoma, the chemokines CCL2, 3, 4, and 5 as well as CXCL9 and 10 were reported to induce effective T cell migration into the tumor microenvironment [39]. Strategies are being developed to increase the secretion of pro-inflammatory chemokines and improve the infiltration of immune cells in the tumor such as targeting HIF-1α, which resulted in an increase in the pro-inflammatory chemokine CCL5 and an increase in the infiltration of CD4+ and CD8+ T cells as well as NK cells [40].

Several cytokines influence cancer progression and treatment response. For instance, transforming growth factor-β (TGF-β) contributes to the lack of T cell infiltration and low response to anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in metastatic urothelial cancer [41] and colon cancer metastasis [42]. The TGF-β blockade in combination with anti-PD-L1 treatment contributes to an increase in T cell infiltration and improvement in tumor regression in mouse models [41]. Besides TGF-β, IFNγ, IL-2, and IL-9 also contribute to the efficacy of anti-PD-1 therapy [43].

3. Strategies to Turn Non-Inflamed Cold Tumors into Inflamed Hot Tumors

As described previously, switching non-inflamed cold tumors into inflamed hot tumors and thus increasing T cell infiltration into the tumor microenvironment is a promising strategy for improving cancer immunotherapy. Below, we will summarize strategies already described for modulating the immune phenotype of different tumors and discuss briefly how these strategies improve the therapeutic benefits of anti-PD-1/PD-L1 and anti-CTLA-4-based therapy (Figure 2).

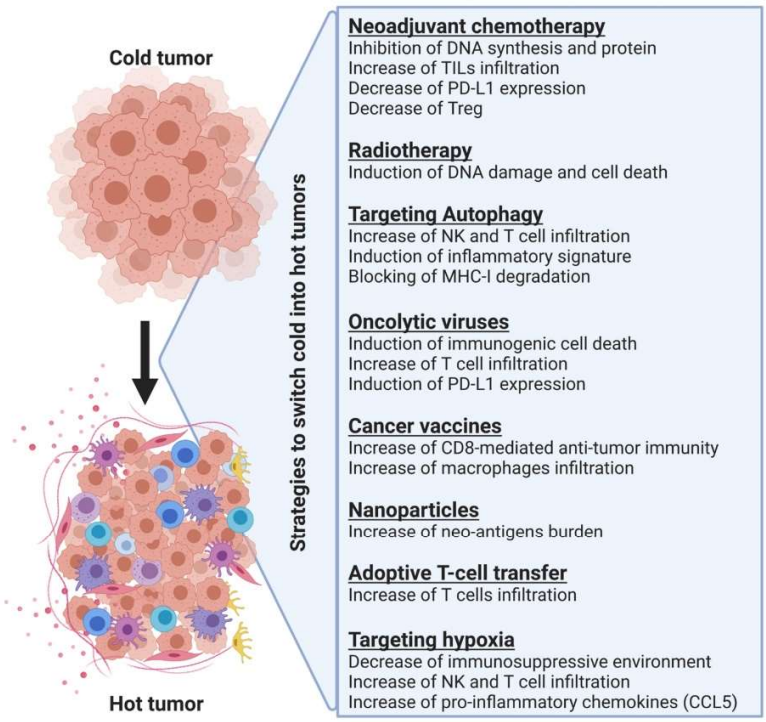


Figure 2. Summary of the different strategies involved in switching cold into hot tumors and their mode of action. Combining these strategies with immunotherapy improves the therapeutic benefit in cancer patients.

3.1. Neoadjuvant Chemotherapy

Chemotherapy is a conventional oncology treatment for inducing tumor cell death and preventing tumor growth by inhibiting multiple processes such as DNA synthesis or protein function. Experimental and clinical evidence show that chemotherapy could have an impact on the tumor immune landscape, thus resulting in an improvement in immunotherapy. In this context, it has been reported that neoadjuvant chemotherapy

could increase the number of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) within the tumor and decrease PD-L1 expression in residual breast cancer tissues [44]. Another study showed a correlation between adjuvant chemotherapy and decreased regulatory Treg infiltration in breast cancer; there was also an increase in cytotoxic T cell infiltration [45]. Neoadjuvant chemotherapy had the same effects in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) in which the number of tumor-associated immune cells was higher in tumors from patients receiving neoadjuvant chemotherapy compared to tumors from untreated patients [46]. Altogether, these data suggest that chemotherapy can induce an anti-tumor immune response and that neoadjuvant chemotherapy could enhance the benefits of anti-PD-1/PD-L1 and CTLA-4 immunotherapy.

The combination of chemoradiotherapy and immunotherapy is currently under investigation in a phase-II clinical trial with patients with locally advanced cervical cancer [47]. For patients with lung squamous cell carcinoma, the combination of chemotherapy with radiotherapy resulted in a longer overall survival and progression-free survival; however, this strategy increased the risk of gastrointestinal abnormalities, hematoxicity, and liver dysfunction [47]. For patients with non-metastatic and metastatic esophageal cancer, neoadjuvant chemoradiotherapy and immunotherapy have no effect on the survival benefits [48]. In addition, chemotherapy is not a specific treatment targeting cancer cells only—it results in cardiac, dermatologic, gastrointestinal, hepatic, nephrotic, and pulmonary toxicities. It also has cytotoxic effects on immune cells and can damage the bone marrow, hence decreasing the production of immune cells and impairing the anti-tumor immune response [49]. Considering the high toxicity and the few effects observed in clinical settings, this suggests that neoadjuvant chemotherapy might not be the best candidate to improve immune infiltration and immunotherapy.

3.2. Radiotherapy

Radiotherapy is a conventional therapy for many cancers. The primary aim of radiotherapy is to induce DNA damage in cancer cells, which are dividing more rapidly than healthy cells. The ultimate goal is to induce tumor cell death through mitotic catastrophe or apoptosis. Radiotherapy also does not specifically target cancer cells, but unlike chemotherapy, radiotherapy focuses specifically where the cancer is located and causes fewer side effects in general. The course of treatment will depend on the type and location of the pathology as well as the overall health status. Several studies showed that radiotherapy can induce an immune response [50] even for primary and metastatic brain cancers that are located in an area lacking appropriate immune surveillance [51]. In addition, radiation induces the expression of mutant proteins and potentially mutant neoantigens, which can generate a CD8+ T cell response [52]. Furthermore, radiotherapy induces ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis, which can stimulate a post-radiation immune response [53].

The concept of enhancing the benefits of immunotherapy treatments via adjuvant radiotherapy has been shown in several studies. Briefly, in a breast carcinoma mouse model, dual treatment with fractioned radiotherapy and an anti-CTLA-4 antibody enhanced the abscopal effect [54], which refers to tumor regression outside the field of radiation due to an indirect systemic anti-tumoral effect induced by radiotherapy [55]. In this study, the effect was associated with a higher frequency of CD8+ T cells showing tumor-specific IFN-γ production. This was translated in clinical settings with a case report of a patient with small-cell lung carcinoma who was treated with a combination of radiation therapy and nivolumab [56]. In murine osteosarcoma, radiotherapy could enhance antitumor efficacy of anti-PD-L1 treatment with a significant decrease in tumor growth and an improved overall survival via an increase in PD-1-positive and granzyme B-positive CD8+ T cells [57].

In a Lewis lung carcinoma mouse model, the use of an anti-CTLA-4 antibody led to an enhancement of the anti-tumor activity of irradiation by delaying tumor growth and prolonging mice survival [58]. Similar results were observed in poorly immunogenic metastatic mouse mammary carcinoma treated with a combination of radiotherapy and CTLA-4 blockade. Here, the combination treatment was also effective in inhibiting metasta-

sis formation via CD8+ T cells [59]. In advanced melanoma, combining radiation therapy with ipilimumab resulted in improved patient survival and complete response rates [60]. Other clinical data concerning melanoma patients have provided evidence that the combination of radiotherapy with a dual-checkpoint blockade, including anti-CTLA-4 and anti-PD-L1 antibodies, could promote an immune response through distinct mechanisms. Anti-CTLA-4 antibodies inhibit Tregs and increase the CD8+ T cells-to-Tregs ratio, while the PD-L1 blockade reverses T cell exhaustion; radiation enhances the diversity of TCRs [61]. However, when radiotherapy was assessed in combination with anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 antibodies for non-small-cell lung carcinoma patients in a phase-II clinical trial, there was no difference in the response rate or the progression-free survival [62]. The challenge for radiotherapy prior to immunotherapy remains in determining the optimal sequence, volume, and radiation dosage.

3.3. Targeting Autophagy

Autophagy is a highly regulated cellular process that is involved in the recycling and degradation of cytoplasmic contents. In cancer, experimental and clinical evidence shows that autophagy acts as a cytoprotective mechanism. Emerging preclinical data show that targeting the autophagy-related gene Beclin-1 inhibits tumor growth and induces the infiltration of functional NK cells into the microenvironment of melanoma tumors in a CCL5-dependent manner [63,64].

More recently, genetic and pharmacological targeting of the vacuolar protein sorting 34 (Vps34; involved in the initiation of autophagy or in the process of endocytosis) has been shown to impact the immune landscape of melanoma and colorectal cancer. Indeed, Vps34 inhibition induces the infiltration of NK, CD8+, and CD4+ T effector cells to the tumor microenvironment. Furthermore, a combined treatment with Vps34 inhibitors and anti-PD-1/PD-L1 antibodies improves the therapeutic benefits in tumor-bearing mice compared to immunotherapy alone. These data provide evidence that Vps34 inhibition improves colorectal cancer and melanoma sensitivity to immune checkpoint blockade [63–67]. Recent data highlight that autophagy is involved in selective degradation of the MHC-I molecules in the lysosome compartment through the cargo receptor NBR1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. The inhibition of autophagy caused a restoration of MHC-1 expression and an improvement in antigen presentation that resulted in enhanced T cell responses and a subsequent decrease in tumor growth. Genetic and pharmacological inhibition of autophagy was shown to improve anti-PD1 and anti-CTLA4 antibody-based immunotherapy [68].

To date, chloroquine and its derivatives are the only FDA-approved drugs for targeting autophagy. It has been shown that chloroquine had a synergistic effect when combined with anti-PD-1 and anti-CTLA-4 antibodies in mouse models of pancreatic cancer [69]. Hydroxycholoroquine is currently investigated in several clinical trials in combination with different immunotherapy molecules for metastatic melanoma, gastrointestinal cancer, and pancreatic cancer. Therefore, targeting autophagy at multiple steps is now an emerging and promising strategy for converting cold tumors into hot inflamed tumors.

3.4. Oncolytic Viruses

Oncolytic viruses are agents that preferentially kill cancer cells via oncolysis. The first oncolytic virus approved for cancer treatment in the United States and Europe was a modified herpes simplex virus called talimogene laherparepvec or T-VEC. It was approved in 2015 by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of advanced melanoma. While oncolytic viruses were mainly used for their capability of killing cancer cells, several studies have shown that they are also capable of promoting anti-tumor immunity. For high-grade gliomas, an intravenous infusion of the oncolytic human Orthoreovirus in patients could increase the cytotoxic T cell infiltration within the tumors, IFN gene expression, and expression of PD-1 and PD-L1, thus suggesting that the combination of this reovirus with PD-1/PD-L1 blockade could lead to significant clinical benefits [70]. For triple-negative breast cancer, the administration of the oncolytic virus Maraba offered long-term benefits

prior to surgery and sensitized tumors to immune checkpoint blockade in preclinical animal models. This oncolytic virus was also capable of promoting intra-tumoral infiltration of cytotoxic immune cells and inducing the expression of PD-L1 [71]. More recently, the engineering of an oncolytic virus expressing PD-1 inhibitors led to improved T cell activity in humanized PD-1 mouse models with an increased anti-tumor effect. This effect was related to an increased infiltration of CD8+ T cells, the establishment of memory CD8+ T cells, and a reduction in CD8+ T cell exhaustion. These results were improved when associating anti-CTLA-4 or anti-TIM-3 without any evidence of neurotoxicity in non-human primates [72].

The use of an oncolytic adenovirus loaded with interleukin 7 has already shown promising results in clinical settings and increases tumor-infiltrating lymphocytes. There is decreased tumor growth by up-regulating pro-inflammatory cytokines and inducing the activation and migration of CD4+ and CD8+ T cells [73]. Moreover, the use of ferroptosis (iron-dependent programmed cell death) inducers in combination with an oncolytic vaccinia virus induced a stronger therapeutic effect than each treatment alone. There was an increase in the number and activity of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatoma, colon, and ovarian cancer cells [72]. These data collectively suggest that the use of oncolytic viruses could improve the immunotherapy response especially in combination with PD-1/PD-L1 antibodies. The use of oncolytic viruses is also a promising strategy for the most lethal malignancies that are not responding to classical treatment strategies such as pancreatic cancer [74], gastrointestinal malignant tumors [75], and glioblastoma [76]. However, efforts are still needed to improve the drug delivery, bioavailability, and the cost of production of oncolytic viruses [77].

3.5. Vaccines

Vaccines often use a benign form of the pathogenic agent injected into humans to stimulate an immune response. It has been reported that an intratumor injection of the seasonal flu shot in melanoma mice model can generate antitumor immunity mediated by CD8+ effector T cells. In addition, the neoadjuvant flu shot injection could improve tumor responses to anti-PD-L1 immune checkpoint blockade compared to anti-PD-1 alone [78]. Another study used a biomaterials-based strategy for converting tumor-derived antigenic microparticles into a cancer vaccine. Interestingly, this vaccine was capable of inducing a strong immune response with high infiltration of tumor-associated macrophages and CD8+ T cells within the tumors. The combination of this microparticle vaccine with PD-L1 blockade in a melanoma mouse model inhibited tumor progression and improved mouse survival [79].

The mRNA vaccines against SARS-CoV-2 have been repurposed for cancer treatment. Lipid-based nanoparticles delivering mRNA could stimulate a T cell response without conferring changes in the spleen and liver of non-human primates [80]. The mRNAs are transcribed in vitro (IVT) to structurally resemble natural mRNA. The IVT mRNAs are delivered by lipid nanoparticles, thus allowing recipient cells to produce many copies of the encoded proteins that can stimulate potent immune responses [81]. The development of the mRNA vaccine technology has gained significant interest in the field of cancer treatment. In fact, several clinical trials are ongoing to evaluate the potential of mRNA vaccines for the treatment of a wide range of cancer types including breast cancer [82,83].

More recently, an elastic nanovaccine called SMONV (soft mesoporous organosilica-based nanovaccine) has been designed. The elasticity-dependent effect resulted in a greater internalization by dendritic cells and the stimulation of cellular and humoral immunity with a suppression of tumor growth in tumor-bearing mice when injected subcutaneously. The combination of this nanovaccine with anti-PD-L1-blocking antibodies resulted in an enhanced therapeutic effect of anti-PD-L1 [84]. Interestingly, the development of an in situ tumor vaccine expressing anti-CD47 antibodies resulted in tumor growth suppression, stronger long-term survival, and increased tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma, lymphoma, and breast cancer mouse models [85].

To date, the only FDA-approved therapeutic anti-cancer vaccine is Sipuleucel-T, which is indicated for metastatic castration-resistant prostate cancer. This vaccine has been reported to cause the induction of CD8+ T cell infiltration in a CXCL10 manner and up-regulation of immune inhibitory checkpoints such as CTLA-4 [86], thus showing that anti-cancer vaccines are interesting leads and require further investigation [82].

3.6. The Use of Nanoparticles for Enhancing the Delivery of Therapies to the Tumor Site

Nanoparticles are small entities measuring less than 200 nm and consisting of liposomes, dendrimers, and nanospheres. All of these nanoparticles are described as selective carriers for anticancer agents to the tumor site. These nanoparticles are also capable of preferentially targeting the tumor microenvironment thanks to the enhanced permeation and retention (EPR) effect. Nanoparticle-based therapy has been proposed as a strategy to increase the neo-antigen burden, modulate the tumor microenvironment, and trigger the antitumor immune response with the ultimate aim of improving immunotherapy [87]. Nanomaterials can stimulate the innate and the adaptive immune system in a long-term manner by regulating the tumor immunosuppressive microenvironment [88–90]. Efforts have recently been made to assess the efficacy of nanoparticles to carry anti-cancer drugs in order to modulate the immune system and enhance the response to immunotherapy. This can be achieved by designing an injectable hydrogel that triggers the immune response and mitochondrial biogenesis of T cells, while enhancing MHC I expression and lowering T cell exhaustion [91]. Hydrogels were already assessed with celecoxib in combination with an anti-PD-1 antibody in B16-F10 melanoma and 4T1 metastatic breast cancer. This strategy successfully enhanced the infiltration of T cells within the tumors and reduced the presence of Treg cells and MDSCs. They could also observe an increase in CXCL9 and 10 with a decrease in IL-1, IL6, and COX2 [92]. Enhanced T cell infiltration and antigen presentation in B16-F10 melanoma was also observed when using a pH-sensitive liposome containing doxorubicin and deferasirox [93].

The emergence of immunoliposomes facilitate the conjugation of monoclonal antibodies or derivatives [94] with interesting results. A significant tumor regression of the melanoma murine model was observed by using targeted immunoliposomes containing doxorubicin and antibodies targeting PD-L1 [95]. Another system of nanoparticles can inhibit the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) pathway and induce immunogenic cell death to enhance DC maturation, increase the number of CTLs, and decrease the number of Tregs in tumor tissues [96].

Nanoscience is also very promising for the treatment of glioblastoma (GBM), which is a very aggressive type of cancer with limited treatment options [97,98]. Indeed, it has been shown that cationic lipid nanoparticles can cross the blood–brain barrier, which is the main issue for drug delivery in glioblastoma. Here, they delivered siRNA against CD47 and PD-L1 in mice models of GBM [97–99]. Nanoparticles have also been used to target the CXCL12/CXCR4 signaling in mouse and human GBM in vitro and vivo, resulting in a decrease in GBM proliferation associated with a decreased infiltration of MDSCs and an increase in immunogenic cell death [100]. The modulation of the immunosuppressive microenvironment with the inhibition of IDO1 and JQ1, a drug decreasing the expression of PD-L1 by tumor cells, improved the immunotherapy treatment of GBM in mice [101]. The use of nanoparticles is also promising for other types of cold tumors such as colorectal cancer [102] and bladder cancer [103], where the delivery of specific drugs by nanoparticles was associated with a successful reprogramming of the tumor microenvironment with enhanced therapeutic efficacy. Together, these data show nanoparticles to be interesting and valuable tools when used as a cargo system to deliver anti-tumor drugs to the tumor site; they improve immune checkpoint blockade therapy.

3.7. Combining Adoptive T Cell Transfer with Other Therapies

Adoptive T cell transfer (ACT) is a type of immunotherapy where immune cells are extracted from the patient's blood or tumor, expanded in vitro, and transfused back into

the patient. Three types of ACT have been developed: tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), T cell receptor (TCR)-engineered T cells, and CAR-T cells [104].

(i) TILs

This type of ACT is based on the isolation of TILs from patient tumor biopsy followed by in vitro stimulation with Interleukin 2 (IL-2). After in vitro expansion, the strategy consists of testing the reactivity of lymphocytes against tumors and amplifying those that are highly reactive before reinjecting them into the patient to selectively kill the remaining tumor.

This strategy has been shown to induce complete and durable regressions in metastatic melanoma patients [105]. However, it has limitations due to the downregulation of MHC molecules and the lack of infiltration of lymphocytes. Therefore, TILs only have benefits in a few cancer types—they have limited benefits (20% of reported objective response rate for metastatic melanoma) [106]. To overcome these limitations, different strategies have been tested for melanoma such as the combination of TILs with cytokines (IFN-α, IFN-β, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, and TNF-α) or with vaccines (fowlpox-based vaccine, GM-CSF—producing tumor-based vaccine). These combinations showed an improved objective response in general, but also elevated toxicity with high doses of cytokines [107]. In addition to melanoma, the efficacy of TILs and anti-PD-1 combination was tested on metastatic cervical cancer without PD-L1 expression. The results show that the combination therapy of TILs and anti-PD1 significantly improves the prognosis of metastatic cervical cancer [108].

(ii) TCR-T cells

The TCR-T cells approach relies on redirecting T cell specificity. This can be achieved by expressing TCR α and β chains that can dimerize with CD3 components to form an operative TCR. Such a strategy deflects T cell specificity to recognize specific antigens in the context of HLA presentation in any subcellular compartment [109]. TCR-T cell therapy showed promising results and even significantly higher benefits compared to TILs for cutaneous melanoma [110]. They had good potential for colorectal cancer and leukemia treatment [111,112]. However, TCR-cells therapy implies several challenges such as the importance of the target antigen selection, immune escape, safety and toxicity, cytokine storms, and T cell exhaustion. Considerable efforts have been made to overcome these challenges such as improving the structural affinity of TCRs and the stromal cell selection, combining TCR-T cells with CD4+ T cells, or activating independently the costimulatory receptors (reviewed in [9]). PD-1 inhibits T cell activation by targeting the signaling of the TCR and CD28 ([9]), and thus, it would be interesting to evaluate the potential of the combination of anti-PD-1 and TCR-T cells therapy.

(iii) CAR-T cells

Chimeric Antigenic Receptor–T or CAR-T cells are structurally different to TCR-T cells. They have been designed to mimic TCR signaling with a tumor antigen-binding domain, an extracellular spacer, a transmembrane domain, costimulatory domains, and a CD3ζ signaling domain. Unlike TCR-T cells, they can bind MHC-independent ligands and show an increased binding affinity [113]. The CAR-T cell approach showed significant efficacy in acute lymphoid leukemia and lymphoma [114,115]. Dual targeting with CD19 and CD22 CAR-T cells increased toxicity and improved the remission rates of acute lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma patients [116]. The efficacy of CAR-T cells in solid tumors is limited, but combinatorial approaches with oncolytic viruses expressing cytokines, chemokines, anti-PD-L1, IL-2, or TNF-α have shown that enhanced CAR-T cells affect murine models [117].

Despite major progress in the ACT approaches, additional efforts need to be performed to improve the efficacy and safety of these immunotherapies. We are also missing studies about the combination of immune checkpoint inhibitors and ACT approaches, which could provide considerable promise but could be limited by toxicity.

3.8. Targeting Hypoxia

As previously reported, hypoxia plays a major role in immune resistance and immune-cell mediated tumor killing. Here, we will provide an overview of the hypoxia mechanism and describe the impact of hypoxic stress on tumor response to immunotherapy. We will also summarize recent strategies developed to target hypoxia and improve patients' response to immunotherapy.

3.8.1. Hypoxia: Mechanisms and Pathways

Cancer cells adapt to hypoxia through hypoxia-inducible factors (HIFs). The HIF family contains three members: HIF-1, HIF-2, and HIF-3. HIF-1 is composed of two sub-units, HIF-1α and HIF-1β; both have basic helix–loop–helix domains and can form a heterodimer and bind to the promoter of target genes. HIF-1 is the most studied and described in the literature because of its involvement in many pathways and diseases. HIF-2α can also bind to HIF-1β, and it plays a role in vascularization, pulmonary development, and erythropoiesis [118]. HIF-3α is much less known; it is different regarding its structure and seems to act as a transcription factor competing with HIF-1α and HIF-2α [119].

In normoxic conditions, HIF-1α is hydroxylated by the prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2), and the complex interacts with the Von Hippel–Lindau tumor suppressor protein (VHL). The VHL protein is part of a ubiquitin-ligase complex E3 that is involved in the hydroxylation and polyubiquitination of HIF-1α, thus leading to its degradation by the proteasome system. In hypoxic conditions, the low level of oxygen inhibits PHD2's activity, which prevented hydroxylation and the degradation of HIF-1α. HIF-1α accumulates in the cytoplasm before being translocated into the nucleus. In the nucleus, HIF-1α forms a dimer with the subunit HIF-1β, and the heterodimer binds to the hypoxia response elements (HRE) motif in the promoter of different target genes to activate their transcription [120,121] (Figure 3).

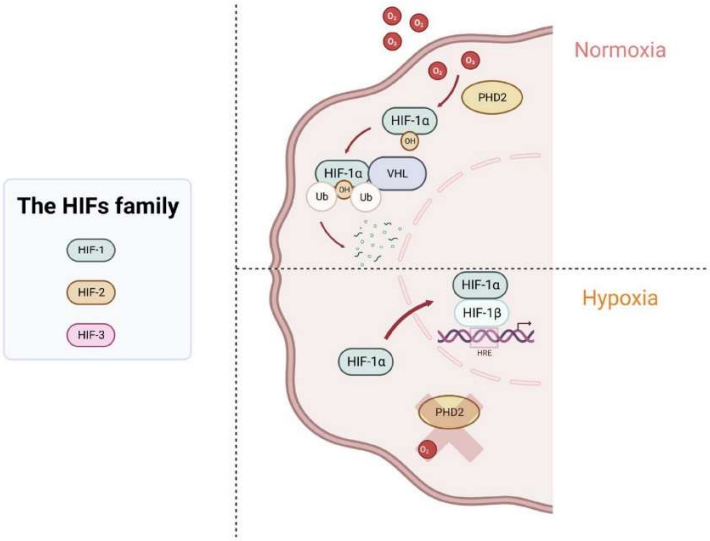


Figure 3. Summary of the mechanisms involved in HIF-1α regulation in normoxia and hypoxia.

3.8.2. Hypoxia Inducible Factors and Cancer

HIFs play a central role in many physiological conditions because they are responsible for oxygen homeostasis, but they are also involved in pathological processes such as cancer. A high expression of HIF-1α and/or HIF-2α has been associated with an increased risk of

mortality in more than 10 different types of cancer [118]. Target genes of HIFs include many genes involved in different steps of cancer biology such as cell immortalization, genetic instability, epithelial-to-mesenchymal transition, angiogenesis, metabolism, invasion and metastasis, and, more importantly, immune evasion [122].

Hypoxia influences tumor immune escape through four different aspects: (i) regulation of signal transduction pathways, (ii) suppression of immune effector cells, (iii) recruitment of immunosuppressive cells and upregulation of inhibitory immune checkpoints, and (iv) activation of autophagy [122].

(i) Regulation of signal transduction pathways

As previously reported, HIFs can bind to the HRE motifs found in several genes including the vascular endothelial growth factor (VEGF), which is a key mediator of angiogenesis in embryogenic development and in wound healing. In cancer, VEGF is up-regulated, allowing the formation of blood vessels to provide nutrients and oxygen to the tumor. In addition, vessels formed under these conditions are chaotic, leaky, and not well-structured. These characteristics lead to generating more hypoxia and thus more VEGF production [123]. The HIF-1α/VEGF axis in cytotoxic CD8+ T cells regulates tumor progression, and the deletion of VEGF-A in CD8+ T cells accelerated tumorigenesis while also altering vascularization [120].

About 75% of clear cell renal cell carcinomas display a loss of function of the VHL gene, which results from mutations, loss of heterozygosity, and promoter methylation [124,125]. The loss of function of VHL leads to a constitutive stabilization of HIF-1α and HIF-2α, which induces the activation of HIF-target genes and pathways involved in cancer progression.

HIFs also play a role in mitochondrial metabolism because HIF-1α activation induces the pyruvate dehydrogenase kinase 1 to deprive mitochondria from pyruvate. HIF-1α also induces BNIP3, which is responsible for triggering mitochondrial selective autophagy and CD73, which is an enzyme producing the immunosuppressive factor adenosine [126]. HIF-1 is also responsible for the up-regulation of glucose transporter proteins (GLUTs) in cancer cells to promote glycolysis [127] and the induction of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in several types of cancer, thus promoting tumor progression and metastasis [128,129].

The tumor microenvironment displays dysregulated vasculature and glycolytic tumor cells. It contains hypoxic regions with an accumulation of metabolic products such as lactate. Lactate is the most increased metabolite in solid tumors [130]. The accumulation of lactate decreases the pH, which ultimately impairs almost all features of CD4+ and CD8+ T lymphocytes (proliferation, chemotaxis, activation, and cytotoxicity). Lactate also promotes the development of immunosuppressive Tregs and immune cell exhaustion due to the switch in metabolic activity and the lack of nutrients within the tumor microenvironment [131].

(ii) Suppression of immune effector cells

HIF-1 has a negative effect on MHC-I expression, thus limiting tumor cell recognition by T cells [132,133]. As previously reported, HIF-1α increases the expression of a wide range of immune checkpoints such as CTLA-4 on T cells; LAG3, TIM3, and PD-L1 on tumor cells; and PD-L1 and VISTA on MDSCs, thus resulting in the inhibition of T cell proliferation and T cell-mediated lysis. CD47 is also up-regulated by hypoxia on tumor cells, thus resulting in the inhibition of tumor cells' phagocytosis. Finally, hypoxia triggers the activation of autophagy, thus impairing tumor cell susceptibility to NK and CTL-mediated killing [134].

(iii) Recruitment of immunosuppressive cells

Hypoxia contributes to the recruitment of immunosuppressive cells—notably tumor-associated macrophages (TAMs), Tregs, and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). In Tregs, hypoxia induces the secretion of the chemokine CCL28, which is responsible for their recruitment to the tumor microenvironment [135]. Hypoxia also promotes the suppressive

function of MDSCs by inducing the expression of VISTA on myeloid cells [136]. Likewise, hypoxia promotes the tumor-supporting functions of TAMs via the up-regulation of iron exporter ferroportin (FPN) and lipocalin 2. This leads to increased iron availability and thus proliferative activation of cancer cells as well as the up-regulation of the regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1)—an inhibitor of MTOR complex 1. This results in a shift toward oxidative metabolism and increased glucose availability in the tumor microenvironment [137].

(iv) Induction of autophagy

Hypoxia can induce cytoprotective autophagy via the expression of BNIP/BNIP3L, leading to the dissociation of the Bcl-2/Beclin-1 complex to activate autophagy (reviewed in [138]). Interestingly, blocking hypoxia-induced autophagy restored cytotoxic T cell activity and promoted tumor regression [139].

3.8.3. Targeting Hypoxia as a Strategy to Improve Patient's Response to Immunotherapy

Hypoxia is responsible for tumor escape from immune surveillance [35,140]. It has been demonstrated that HIF1-α can bind to the HRE motif of the promoter of PD-L1 gene and induce its expression in prostate, breast, and lung cancer as well as melanoma [30]. In addition to PD-L1, hypoxia induces the V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation (VISTA) expression by MDSCs and promotes their suppressive function. VISTA is an immune checkpoint, and its expression on tumor cells and/or immune cells is associated with an immunosuppressive tumor microenvironment in several cancer types. Targeting of VISTA by antibody or genetic ablation under hypoxia decreased MDSC-mediated T cell suppression, thus suggesting that combination approaches targeting both VISTA and hypoxia could reverse the immunosuppressive antitumor immunity, and thus improve immunotherapy [141].

The emergence of hypoxia-activated prodrugs provides an interesting strategy to target hypoxia in solid tumors. The most studied one is TH-302, also called Evovosfamide. The activation of TH-302 relies on genes involved in mitochondrial electron transfer, DNA damage-response factors, and mitochondrial function regulators. The activation of TH-302 occurs under hypoxia based on the reduction in free radical anions, leading to the release of bromo-iso-phosphoramide mustard (Br-IPM) or its stable downstream product, isophosphoramide mustard (IPM) [142]. In prostate cancer, it has been reported that combining immune checkpoint blockades with the hypoxia-activated prodrug TH-302 significantly inhibits tumor growth and extends survival in a transgenic adenocarcinoma prostate-derived mouse model. This effect was associated with a decrease in MDSCs in the tumor microenvironment, and a decrease in intra-tumoral hypoxia [143]. The drug has shown relevant potential when used in combination with cytotoxic drugs, targeted therapy, or radiotherapy [144]. TH-302 is currently under investigation in several clinical trials for different types of cancer [142].

In addition to hypoxia-activated prodrugs, nanoparticles can also target hypoxic tumor microenvironments. In the blood circulation, the hypoxia-responsive nanoparticles are inactive and become active once they reach the hypoxic zones of the tumor. They can be used to boost the efficiency of different treatments such as chemotherapy and radiotherapy [145]. For instance, in hepatocellular carcinoma, the use of the FDA-approved nanoparticle with photothermal abilities could alleviate tumor hypoxia, trigger an antitumor immune response, inhibit tumor metastasis, and induce long-term immunological memory when combined with anti-PD-L1 immunotherapy [146]. Nanoparticles are also considered to target hypoxia in glioblastoma [56,99,100,146].

Considering the involvement of hypoxia in the immunosuppressive microenvironment of tumors, we provided evidence that deleting the transcriptional activity of HIF-1α decreased the tumor growth of a melanoma mouse model and increased the infiltration of CD45+, NK, CD4+, and CD8+ cells. Such infiltration was related to an increase in the release of CCL5 in HIF-1α-targeted tumors as previously reported by us [40]. Moreover, the treatment of melanoma-bearing mice with Acriflavine, which is reported to prevent the

dimerization between HIF-1α and HIF-1β [147], led to an improvement in immunotherapy based on TRP-2 peptide vaccination and anti-PD-1 antibody [40].

Currently, targeting hypoxia, or more particularly HIF-1α, relies on developing hypoxia-activated prodrugs or small inhibitors targeting molecules involved in the survival of hypoxic cells [148].

4. Conclusions

Immune checkpoint blockades such as anti-PD-1/PD-L1 and anti-CTLA-4 are promising new strategies that provide durable clinical benefits.

In this review, we briefly overviewed different factors that are involved in the establishment of cold immune desert tumors and new strategies for overcoming immune desert tumors and establishing an inflammatory signature. Converting cold into hot tumors remains the major challenge for improving and extending the clinical benefits of immune checkpoint inhibitors. We believe that such strategies would offer a large variety of therapeutic combination options for improving and extending the benefits of cancer immunotherapy. Among them, the use of neoadjuvant chemotherapy or radiotherapy has provided some encouraging results for improving the infiltration of immune cells within the tumor microenvironment and enhancing the response to immune checkpoint blockade. Targeting autophagy is also an emerging therapeutic option for driving effector T cells to the tumors and improving clinical benefits in combination with immunotherapy in melanoma and colorectal cancer. In addition, oncolytic viruses, nanoparticles, and anti-cancer vaccines are less conventional strategies but nevertheless constitute additional options for switching cold tumors into hot tumors and improving immunotherapy benefits. Finally, metabolic reprogramming by targeting hypoxia is a very promising approach because hypoxia is involved in many steps of cancer biology and impacts the lack of effector immune cells infiltration, the recruitment of immunosuppressive cells, and the up-regulation of inhibitory immune checkpoints. However, HIFs are involved in many pathways and physiological processes—the challenge is to be able to target specifically cancer-related hypoxia without compromising physiological processes that are associated with HIFs. Although several therapeutic options need additional experimental and clinical validation, the strategies described here remain very promising for use in combined immune checkpoint blockades in a large variety of cancers.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, A.B. and B.J.; writing—review and editing, A.B., G.V., C.D., G.B. and B.J.; supervision, B.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from FNRS Televie (7.4559.21 IMPACT21 and 7.4560.21 INCITE21); Roche Pharma 2023; RCMS foundation (INCOM BIOM); Luxembourg National Research Fund (BRIDGES2020/BM/15412275/SMART-COMBO; BRIDGES2021/BM/16358198/TRICK-ALDH; INTER/EUROSTARS21/16896480/C2I; INTER/EUROSTARS21/16896735/PreCyse); Kriibskrank Kanner Foundation, Luxembourg (2019); Action LIONS Vaincre le Cancer Luxembourg; and Stiftelsen Cancera (CombiN 2023).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hoober, J.K.; Eggink, L.L.; Cote, R. Stories From the Dendritic Cell Guardhouse. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2880. [CrossRef] [PubMed]
2. Schreiber, R.D.; Old, L.J.; Smyth, M.J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **2011**, *331*, 1565–1570. [CrossRef] [PubMed]

3. Postow, M.A.; Callahan, M.K.; Wolchok, J.D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1974–1982. [CrossRef] [PubMed]
4. Hirsch, L.; Zitvogel, L.; Eggermont, A.; Marabelle, A. PD-Loma: A cancer entity with a shared sensitivity to the PD-1/PD-L1 pathway blockade. *Br. J. Cancer* **2019**, *120*, 3–5. [CrossRef]
5. Pol, J.; Kroemer, G. Anti-CTLA-4 immunotherapy: Uncoupling toxicity and efficacy. *Cell Res.* **2018**, *28*, 501–502. [CrossRef]
6. Maleki Vareki, S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 157. [CrossRef]
7. Galon, J.; Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 197–218. [CrossRef]
8. Bonaventura, P.; Shekarian, T.; Alcazer, V.; Valladeau-Guilemond, J.; Valsesia-Wittmann, S.; Amigorena, S.; Caux, C.; Depil, S. Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 168. [CrossRef]
9. Liu, Y.; Yan, X.; Zhang, F.; Zhang, X.; Tang, F.; Han, Z.; Li, Y. TCR-T Immunotherapy: The Challenges and Solutions. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 794183. [CrossRef]
10. Xie, N.; Shen, G.; Gao, W.; Huang, Z.; Huang, C.; Fu, L. Neoantigens: Promising targets for cancer therapy. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 9. [CrossRef]
11. Leko, V.; Rosenberg, S.A. Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 454–472. [CrossRef]
12. Yarchoan, M.; Hopkins, A.; Jaffee, E.M. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2500–2501. [CrossRef] [PubMed]
13. Lei, X.; Khatri, I.; de Wit, T.; de Rink, I.; Nieuwland, M.; Kerkhoven, R.; van Eenennaam, H.; Sun, C.; Garg, A.D.; Borst, J.; et al. CD4(+) helper T cells endow cDC1 with cancer-impeding functions in the human tumor micro-environment. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 217. [CrossRef] [PubMed]
14. Von Euw, E.M.; Barrio, M.M.; Furman, D.; Bianchini, M.; Levy, E.M.; Yee, C.; Li, Y.; Wainstok, R.; Mordoh, J. Monocyte-derived dendritic cells loaded with a mixture of apoptotic/necrotic melanoma cells efficiently cross-present gp100 and MART-1 antigens to specific CD8(+) T lymphocytes. *J. Transl. Med.* **2007**, *5*, 19. [CrossRef] [PubMed]
15. Borst, J.; Busselaar, J.; Bosma, D.M.T.; Ossendorp, F. Mechanism of action of PD-1 receptor/ligand targeted cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* **2021**, *51*, 1911–1920. [CrossRef] [PubMed]
16. Melaiu, O.; Chierici, M.; Lucarini, V.; Jurman, G.; Conti, L.A.; De Vito, R.; Boldrini, R.; Cifaldi, L.; Castellano, A.; Furlanello, C.; et al. Cellular and gene signatures of tumor-infiltrating dendritic cells and natural-killer cells predict prognosis of neuroblastoma. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5992. [CrossRef]
17. Van Cruijsen, H.; van der Veldt, A.A.; Vroling, L.; Oosterhoff, D.; Broxterman, H.J.; Scheper, R.J.; Giaccone, G.; Haanen, J.B.; van den Eertwegh, A.J.; Boven, E.; et al. Sunitinib-induced myeloid lineage redistribution in renal cell cancer patients: CD1c+ dendritic cell frequency predicts progression-free survival. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 5884–5892. [CrossRef]
18. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801. [CrossRef]
19. Jongbloed, S.L.; Kassianos, A.J.; McDonald, K.J.; Clark, G.J.; Ju, X.; Angel, C.E.; Chen, C.J.; Dunbar, P.R.; Wadley, R.B.; Jeet, V.; et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 1247–1260. [CrossRef]
20. Ge, W.; Wu, W. Influencing Factors and Significance of Tumor-associated Macrophage Polarization in Tumor Microenvironment. *Chin. J. Lung Cancer* **2023**, *26*, 228–237. [CrossRef]
21. Dallavalasa, S.; Beeraka, N.M.; Basavaraju, C.G.; Tulimilli, S.V.; Sadhu, S.P.; Rajesh, K.; Aliev, G.; Madhunapantula, S.V. The Role of Tumor Associated Macrophages (TAMs) in Cancer Progression, Chemoresistance, Angiogenesis and Metastasis—Current Status. *Curr. Med. Chem.* **2021**, *28*, 8203–8236. [CrossRef]
22. Liu, T.; Han, C.; Wang, S.; Fang, P.; Ma, Z.; Xu, L.; Yin, R. Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 86. [CrossRef]
23. Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Itoh, M.; Kuniyasu, Y.; Nomura, T.; Toda, M.; Takahashi, T. Immunologic tolerance maintained by $CD25^+$ $CD4^+$ regulatory T cells: Their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **2001**, *182*, 18–32. [CrossRef]
24. Alissafi, T.; Hatzioannou, A.; Legaki, A.I.; Varveri, A.; Verginis, P. Balancing cancer immunotherapy and immune-related adverse events: The emerging role of regulatory T cells. *J. Autoimmun.* **2019**, *104*, 102310. [CrossRef]
25. Yin, Z.; Li, C.; Wang, J.; Xue, L. Myeloid-derived suppressor cells: Roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 933–946. [CrossRef]
26. Peng, W.; Chen, J.Q.; Liu, C.; Malu, S.; Creasy, C.; Tetzlaff, M.T.; Xu, C.; McKenzie, J.A.; Zhang, C.; Liang, X.; et al. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 202–216. [CrossRef]
27. Spranger, S.; Bao, R.; Gajewski, T.F. Melanoma-intrinsic β-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **2015**, *523*, 231–235. [CrossRef]
28. Berchem, G.; Noman, M.Z.; Bosseler, M.; Paggetti, J.; Baconnais, S.; Le Cam, E.; Nanbakhsh, A.; Moussay, E.; Mami-Chouaib, F.; Janji, B.; et al. Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF-β and miR23a transfer. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1062968. [CrossRef]

29. Lequeux, A.; Noman, M.Z.; Xiao, M.; Sauvage, D.; Van Moer, K.; Viry, E.; Bocci, I.; Hasmim, M.; Bosseler, M.; Berchem, G.; et al. Impact of hypoxic tumor microenvironment and tumor cell plasticity on the expression of immune checkpoints. *Cancer Lett.* **2019**, *458*, 13–20. [CrossRef]
30. Noman, M.Z.; Desantis, G.; Janji, B.; Hasmim, M.; Karray, S.; Dessen, P.; Bronte, V.; Chouaib, S. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1α, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 781–790. [CrossRef]
31. Noman, M.Z.; Hasmim, M.; Lequeux, A.; Xiao, M.; Duhem, C.; Chouaib, S.; Berchem, G.; Janji, B. Improving Cancer Immunotherapy by Targeting the Hypoxic Tumor Microenvironment: New Opportunities and Challenges. *Cells* **2019**, *8*, 1083. [CrossRef] [PubMed]
32. Noman, M.Z.; Hasmim, M.; Messai, Y.; Terry, S.; Kieda, C.; Janji, B.; Chouaib, S. Hypoxia: A key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2015**, *309*, C569–C579. [CrossRef] [PubMed]
33. Zhang, H.; Lu, H.; Xiang, L.; Bullen, J.W.; Zhang, C.; Samanta, D.; Gilkes, D.M.; He, J.; Semenza, G.L. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E6215–E6223. [CrossRef] [PubMed]
34. Li, Y.; Patel, S.P.; Roszik, J.; Qin, Y. Hypoxia-Driven Immunosuppressive Metabolites in the Tumor Microenvironment: New Approaches for Combinational Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1591. [CrossRef]
35. Vito, A.; El-Sayes, N.; Mossman, K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells* **2020**, *9*, 992. [CrossRef]
36. Janji, B.; Chouaib, S. The Promise of Targeting Hypoxia to Improve Cancer Immunotherapy: Mirage or Reality? *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 880810. [CrossRef]
37. Gorbachev, A.V.; Fairchild, R.L. Regulation of chemokine expression in the tumor microenvironment. *Crit. Rev. Immunol.* **2014**, *34*, 103–120. [CrossRef]
38. Hojo, S.; Koizumi, K.; Tsuneyama, K.; Arita, Y.; Cui, Z.; Shinohara, K.; Minami, T.; Hashimoto, I.; Nakayama, T.; Sakurai, H.; et al. High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4725–4731. [CrossRef]
39. Harlin, H.; Meng, Y.; Peterson, A.C.; Zha, Y.; Tretiakova, M.; Slingluff, C.; McKee, M.; Gajewski, T.F. Chemokine expression in melanoma metastases associated with $CD8^+$ T-cell recruitment. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3077–3085. [CrossRef]
40. Lequeux, A.; Noman, M.Z.; Xiao, M.; Van Moer, K.; Hasmim, M.; Benoit, A.; Bosseler, M.; Viry, E.; Arakelian, T.; Berchem, G.; et al. Targeting HIF-1 alpha transcriptional activity drives cytotoxic immune effector cells into melanoma and improves combination immunotherapy. *Oncogene* **2021**, *40*, 4725–4735. [CrossRef]
41. Mariathasan, S.; Turley, S.J.; Nickles, D.; Castiglioni, A.; Yuen, K.; Wang, Y.; Kadel, E.E., III; Koeppen, H.; Astarita, J.L.; Cubas, R.; et al. TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* **2018**, *554*, 544–548. [CrossRef]
42. Tauriello, D.V.F.; Palomo-Ponce, S.; Stork, D.; Berenguer-Llergo, A.; Badia-Ramentol, J.; Iglesias, M.; Sevillano, M.; Ibiza, S.; Cañellas, A.; Hernando-Momblona, X.; et al. TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* **2018**, *554*, 538–543. [CrossRef]
43. Vinokurova, D.; Apetoh, L. The Emerging Role of IL-9 in the Anticancer Effects of Anti-PD-1 Therapy. *Biomolecules* **2023**, *13*, 670. [CrossRef]
44. Pelekanou, V.; Carvajal-Hausdorf, D.E.; Altan, M.; Wasserman, B.; Carvajal-Hausdorf, C.; Wimberly, H.; Brown, J.; Lannin, D.; Pusztai, L.; Rimm, D.L. Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance. *Breast Cancer Res.* **2017**, *19*, 91. [CrossRef]
45. Spring, L.M.; Fell, G.; Arfe, A.; Sharma, C.; Greenup, R.; Reynolds, K.L.; Smith, B.L.; Alexander, B.; Moy, B.; Isakoff, S.J.; et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 2838–2848. [CrossRef]
46. Parra, E.R.; Villalobos, P.; Behrens, C.; Jiang, M.; Pataer, A.; Swisher, S.G.; William, W.N., Jr.; Zhang, J.; Lee, J.; Cascone, T.; et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on the immune microenvironment in non-small cell lung carcinomas as determined by multiplex immunofluorescence and image analysis approaches. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 48. [CrossRef]
47. Chen, J.; Li, C.; Cao, Y.; Zhu, L.; Zhang, B.; You, J.; Hou, H.; Wang, J.; Yuan, Z. Toripalimab combined with concurrent platinum-based Chemoradiotherapy in patients with locally advanced cervical Cancer: An open-label, single-arm, phase II trial. *BMC Cancer* **2022**, *22*, 793. [CrossRef]
48. Valkema, M.J.; Mostert, B.; Lagarde, S.M.; Wijnhoven, B.P.L.; van Lanschot, J.J.B. The effectivity of targeted therapy and immunotherapy in patients with advanced metastatic and non-metastatic cancer of the esophagus and esophago-gastric junction. *Updat. Surg.* **2023**, *75*, 313–323. [CrossRef]
49. Rébé, C.; Ghiringhelli, F. Cytotoxic effects of chemotherapy on cancer and immune cells: How can it be modulated to generate novel therapeutic strategies? *Future Oncol.* **2015**, *11*, 2645–2654. [CrossRef]
50. Schaue, D. A Century of Radiation Therapy and Adaptive Immunity. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 431. [CrossRef]
51. Sevenich, L. Turning "Cold" Into "Hot" Tumors-Opportunities and Challenges for Radio-Immunotherapy Against Primary and Metastatic Brain Cancers. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 163. [CrossRef] [PubMed]

52. Lussier, D.M.; Alspach, E.; Ward, J.P.; Miceli, A.P.; Runci, D.; White, J.M.; Mpoy, C.; Arthur, C.D.; Kohlmiller, H.N.; Jacks, T.; et al. Radiation-induced neoantigens broaden the immunotherapeutic window of cancers with low mutational loads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2102611118. [CrossRef] [PubMed]
53. Wang, Y.; Wang, Y.; Pan, J.; Gan, L.; Xue, J. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in cancer: Crucial cell death types in radiotherapy and post-radiotherapy immune activation. *Radiother. Oncol.* **2023**, *184*, 109689. [CrossRef] [PubMed]
54. Dewan, M.Z.; Galloway, A.E.; Kawashima, N.; Dewyngaert, J.K.; Babb, J.S.; Formenti, S.C.; Demaria, S. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5379–5388. [CrossRef] [PubMed]
55. Ehlers, G.; Fridman, M. Abscopal effect of radiation in papillary adenocarcinoma. *Br. J. Radiol.* **1973**, *46*, 220–222. [CrossRef]
56. Wang, W.; Li, L.; Wu, S.; Shen, J.; Huang, C.; Chen, Y.; Li, S. Abscopal effect of radiation therapy and nivolumab in a patient with combined small-cell lung cancer: A case report. *Immunotherapy* **2022**, *14*, 909–914. [CrossRef]
57. Katsuki, S.; Takahashi, Y.; Tamari, K.; Minami, K.; Takenaka, W.; Ibuki, Y.; Yamamoto, J.; Tatekawa, S.; Hayashi, K.; Seo, Y.; et al. Radiation therapy enhances systemic antitumor efficacy in PD-L1 therapy regardless of sequence of radiation in murine osteosarcoma. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0271205. [CrossRef]
58. Yoshimoto, Y.; Suzuki, Y.; Mimura, K.; Ando, K.; Oike, T.; Sato, H.; Okonogi, N.; Maruyama, T.; Izawa, S.; Noda, S.E.; et al. Radiotherapy-induced anti-tumor immunity contributes to the therapeutic efficacy of irradiation and can be augmented by CTLA-4 blockade in a mouse model. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92572. [CrossRef]
59. Demaria, S.; Kawashima, N.; Yang, A.M.; Devitt, M.L.; Babb, J.S.; Allison, J.P.; Formenti, S.C. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 728–734. [CrossRef]
60. Koller, K.M.; Mackley, H.B.; Liu, J.; Wagner, H.; Talamo, G.; Schell, T.D.; Pameijer, C.; Neves, R.I.; Anderson, B.; Kokolus, K.M.; et al. Improved survival and complete response rates in patients with advanced melanoma treated with concurrent ipilimumab and radiotherapy versus ipilimumab alone. *Cancer Biol. Ther.* **2017**, *18*, 36–42. [CrossRef]
61. Twyman-Saint Victor, C.; Rech, A.J.; Maity, A.; Rengan, R.; Pauken, K.E.; Stelekati, E.; Benci, J.L.; Xu, B.; Dada, H.; Odorizzi, P.M.; et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* **2015**, *520*, 373–377. [CrossRef]
62. Ochoa-de-Olza, M.; Bourhis, J.; Coukos, G.; Herrera, F.G. Low-dose irradiation for reversing immunotherapy resistance: How to translate? *J. Immunother. Cancer* **2022**, *10*, e004939. [CrossRef]
63. Mgrditchian, T.; Arakelian, T.; Paggetti, J.; Noman, M.Z.; Viry, E.; Moussay, E.; Van Moer, K.; Kreis, S.; Guerin, C.; Buart, S.; et al. Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E9271–E9279. [CrossRef]
64. Noman, M.Z.; Paggetti, J.; Moussay, E.; Berchem, G.; Janji, B. Driving Natural Killer cells toward the melanoma tumor battlefield: Autophagy as a valuable therapeutic target. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1452583. [CrossRef]
65. Janji, B.; Hasmim, M.; Parpal, S.; Berchem, G.; Noman, M.Z. Firing up the cold tumors by targeting Vps34. *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1809936. [CrossRef]
66. Janji, B.; Hasmim, M.; Parpal, S.; De Milito, A.; Berchem, G.; Noman, M.Z. Lighting up the fire in cold tumors to improve cancer immunotherapy by blocking the activity of the autophagy-related protein PIK3C3/VPS34. *Autophagy* **2020**, *16*, 2110–2111. [CrossRef]
67. Noman, M.Z.; Parpal, S.; Van Moer, K.; Xiao, M.; Yu, Y.; Viklund, J.; De Milito, A.; Hasmim, M.; Andersson, M.; Amaravadi, R.K.; et al. Inhibition of Vps34 reprograms cold into hot inflamed tumors and improves anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaax7881. [CrossRef]
68. Yamamoto, K.; Venida, A.; Yano, J.; Biancur, D.E.; Kakiuchi, M.; Gupta, S.; Sohn, A.S.W.; Mukhopadhyay, S.; Lin, E.Y.; Parker, S.J.; et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* **2020**, *581*, 100–105. [CrossRef]
69. Duffy, A.; Le, J.; Sausville, E.; Emadi, A. Autophagy modulation: A target for cancer treatment development. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *75*, 439–447. [CrossRef]
70. Samson, A.; Scott, K.J.; Taggart, D.; West, E.J.; Wilson, E.; Nuovo, G.J.; Thomson, S.; Corns, R.; Mathew, R.K.; Fuller, M.J.; et al. Intravenous delivery of oncolytic reovirus to brain tumor patients immunologically primes for subsequent checkpoint blockade. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, eaam7577. [CrossRef]
71. Bourgeois-Daigneault, M.C.; Roy, D.G.; Aitken, A.S.; El Sayes, N.; Martin, N.T.; Varette, O.; Falls, T.; St-Germain, L.E.; Pelin, A.; Lichty, B.D.; et al. Neoadjuvant oncolytic virotherapy before surgery sensitizes triple-negative breast cancer to immune checkpoint therapy. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, eaao1641. [CrossRef] [PubMed]
72. Liu, W.; Chen, H.; Zhu, Z.; Liu, Z.; Ma, C.; Lee, Y.J.; Bartlett, D.L.; Guo, Z.S. Ferroptosis Inducer Improves the Efficacy of Oncolytic Virus-Mediated Cancer Immunotherapy. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1425. [CrossRef] [PubMed]
73. Kudling, T.V.; Clubb, J.H.A.; Quixabeira, D.C.A.; Santos, J.M.; Havunen, R.; Kononov, A.; Heiniö, C.; Cervera-Carrascon, V.; Pakola, S.; Basnet, S.; et al. Local delivery of interleukin 7 with an oncolytic adenovirus activates tumor-infiltrating lymphocytes and causes tumor regression. *Oncoimmunology* **2022**, *11*, 2096572. [CrossRef] [PubMed]
74. Nisar, M.; Paracha, R.Z.; Adil, S.; Qureshi, S.N.; Janjua, H.A. An Extensive Review on Preclinical and Clinical Trials of Oncolytic Viruses Therapy for Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 875188. [CrossRef] [PubMed]

75. Li, Q.; Oduro, P.K.; Guo, R.; Li, R.; Leng, L.; Kong, X.; Wang, Q.; Yang, L. Oncolytic Viruses: Immunotherapy Drugs for Gastrointestinal Malignant Tumors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 921534. [CrossRef]
76. Shoaf, M.L.; Desjardins, A. Oncolytic Viral Therapy for Malignant Glioma and Their Application in Clinical Practice. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. NeuroTher.* **2022**, *19*, 1818–1831. [CrossRef]
77. Ripp, J.; Hentzen, S.; Saeed, A. Oncolytic Viruses as an Adjunct to Immune Checkpoint Inhibition. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2022**, *27*, 151. [CrossRef]
78. Newman, J.H.; Chesson, C.B.; Herzog, N.L.; Bommareddy, P.K.; Aspromonte, S.M.; Pepe, R.; Estupinian, R.; Aboelatta, M.M.; Buddhadev, S.; Tarabichi, S.; et al. Intratumoral injection of the seasonal flu shot converts immunologically cold tumors to hot and serves as an immunotherapy for cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 1119–1128. [CrossRef]
79. Lin, Z.; Zhang, Y.; Cai, H.; Zhou, F.; Gao, H.; Deng, L.; Li, R. A PD-L1-Based Cancer Vaccine Elicits Antitumor Immunity in a Mouse Melanoma Model. *Mol. Ther. Oncolytics* **2019**, *14*, 222–232. [CrossRef]
80. Bevers, S.; Kooijmans, S.A.A.; Van de Velde, E.; Evers, M.J.W.; Seghers, S.; Gitz-Francois, J.; van Kronenburg, N.C.H.; Fens, M.; Mastrobattista, E.; Hassler, L.; et al. mRNA-LNP vaccines tuned for systemic immunization induce strong antitumor immunity by engaging splenic immune cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2022**, *30*, 3078–3094. [CrossRef]
81. Sun, H.; Zhang, Y.; Wang, G.; Yang, W.; Xu, Y. mRNA-Based Therapeutics in Cancer Treatment. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 622. [CrossRef]
82. Beck, J.D.; Reidenbach, D.; Salomon, N.; Sahin, U.; Türeci, Ö.; Vormehr, M.; Kranz, L.M. mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 69. [CrossRef]
83. Jiang, X.T.; Liu, Q. mRNA vaccination in breast cancer: Current progress and future direction. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2023**. [CrossRef]
84. Li, Q.; Teng, Z.; Tao, J.; Shi, W.; Yang, G.; Zhang, Y.; Su, X.; Chen, L.; Xiu, W.; Yuwen, L.; et al. Elastic Nanovaccine Enhances Dendritic Cell-Mediated Tumor Immunotherapy. *Small* **2022**, *18*, e2201108. [CrossRef]
85. Ju, F.; Luo, Y.; Lin, C.; Jia, X.; Xu, Z.; Tian, R.; Lin, Y.; Zhao, M.; Chang, Y.; Huang, X.; et al. Oncolytic virus expressing PD-1 inhibitors activates a collaborative intratumoral immune response to control tumor and synergizes with CTLA-4 or TIM-3 blockade. *J. Immunother. Cancer* **2022**, *10*, e004762. [CrossRef]
86. Hagihara, K.; Chan, S.; Zhang, L.; Oh, D.Y.; Wei, X.X.; Simko, J.; Fong, L. Neoadjuvant sipuleucel-T induces both Th1 activation and immune regulation in localized prostate cancer. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1486953. [CrossRef]
87. Rodallec, A.; Sicard, G.; Fanciullino, R.; Benzekry, S.; Lacarelle, B.; Milano, G.; Ciccolini, J. Turning cold tumors into hot tumors: Harnessing the potential of tumor immunity using nanoparticles. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2018**, *14*, 1139–1147. [CrossRef]
88. Duan, X.; Chan, C.; Lin, W. Nanoparticle-Mediated Immunogenic Cell Death Enables and Potentiates Cancer Immunotherapy. *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)* **2019**, *58*, 670–680. [CrossRef]
89. Navarro-Ocón, A.; Blaya-Cánovas, J.L.; López-Tejada, A.; Blancas, I.; Sánchez-Martín, R.M.; Garrido, M.J.; Griñán-Lisón, C.; Calahorra, J.; Cara, F.E.; Ruiz-Cabello, F.; et al. Nanomedicine as a Promising Tool to Overcome Immune Escape in Breast Cancer. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 505. [CrossRef]
90. Yang, J.; Zhang, C. Regulation of cancer-immunity cycle and tumor microenvironment by nanobiomaterials to enhance tumor immunotherapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2020**, *12*, e1612. [CrossRef]
91. Zhang, D.; Li, Q.; Chen, X.; Nie, X.; Xue, F.; Xu, W.; Luan, Y. An Injectable Hydrogel to Modulate T Cells for Cancer Immunotherapy. *Small* **2022**, *18*, e2202663. [CrossRef] [PubMed]
92. Amoroso, D.; Bertelli, G.; Pronzato, P.; Vidili, M.G.; Gulisano, M.; Lionetto, R.; Rosso, R. Continuous venous infusion of vindesine in metastatic breast cancer: Experience with a subcutaneously implanted system and portable pump. *Anticancer Res.* **1989**, *9*, 141–143. [PubMed]
93. Song, P.; Han, X.; Zheng, R.; Yan, J.; Wu, X.; Wang, Y.; Zhang, H. Upregulation of MHC-I and downregulation of PD-L1 expression by doxorubicin and deferasirox codelivered liposomal nanoparticles for chemoimmunotherapy of melanoma. *Int. J. Pharm.* **2022**, *624*, 122002. [CrossRef] [PubMed]
94. Merino, M.; Zalba, S.; Garrido, M.J. Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives. *J. Control. Release* **2018**, *275*, 162–176. [CrossRef]
95. Merino, M.; Lozano, T.; Casares, N.; Lana, H.; Troconiz, I.F.; Ten Hagen, T.L.M.; Kochan, G.; Berraondo, P.; Zalba, S.; Garrido, M.J. Dual activity of PD-L1 targeted Doxorubicin immunoliposomes promoted an enhanced efficacy of the antitumor immune response in melanoma murine model. *J. Nanobiotechnol.* **2021**, *19*, 102. [CrossRef]
96. Shi, M.; Zhang, J.; Wang, Y.; Han, Y.; Zhao, X.; Hu, H.; Qiao, M.; Chen, D. Blockage of the IDO1 pathway by charge-switchable nanoparticles amplifies immunogenic cell death for enhanced cancer immunotherapy. *Acta Biomater.* **2022**, *150*, 353–366. [CrossRef]
97. Abadi, B.; Yazdanpanah, N.; Nokhodchi, A.; Rezaei, N. Smart biomaterials to enhance the efficiency of immunotherapy in glioblastoma: State of the art and future perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *179*, 114035. [CrossRef]
98. Shabani, L.; Abbasi, M.; Amini, M.; Amani, A.M.; Vaez, A. The brilliance of nanoscience over cancer therapy: Novel promising nanotechnology-based methods for eradicating glioblastoma. *J. Neurol. Sci.* **2022**, *440*, 120316. [CrossRef]
99. Liu, S.; Liu, J.; Li, H.; Mao, K.; Wang, H.; Meng, X.; Wang, J.; Wu, C.; Chen, H.; Wang, X.; et al. An optimized ionizable cationic lipid for brain tumor-targeted siRNA delivery and glioblastoma immunotherapy. *Biomaterials* **2022**, *287*, 121645. [CrossRef]

100. Alghamri, M.S.; Banerjee, K.; Mujeeb, A.A.; Mauser, A.; Taher, A.; Thalla, R.; McClellan, B.L.; Varela, M.L.; Stamatovic, S.M.; Martinez-Revollar, G.; et al. Systemic Delivery of an Adjuvant CXCR4-CXCL12 Signaling Inhibitor Encapsulated in Synthetic Protein Nanoparticles for Glioma Immunotherapy. *ACS Nano* **2022**, *16*, 8729–8750. [CrossRef]
101. Wang, T.; Zhang, H.; Qiu, W.; Han, Y.; Liu, H.; Li, Z. Biomimetic nanoparticles directly remodel immunosuppressive microenvironment for boosting glioblastoma immunotherapy. *Bioact. Mater.* **2022**, *16*, 418–432. [CrossRef]
102. Qian, Y.; Mao, J.; Leng, X.; Zhu, L.; Rui, X.; Jin, Z.; Jiang, H.; Liu, H.; Zhang, F.; Bi, X.; et al. Co-delivery of proanthocyanidin and mitoxantrone induces synergistic immunogenic cell death to potentiate cancer immunotherapy. *Biomater. Sci.* **2022**, *10*, 4549–4560. [CrossRef]
103. Wu, X.; Wei, Y.; Lin, R.; Chen, P.; Hong, Z.; Zeng, R.; Xu, Q.; Li, T. Multi-responsive mesoporous polydopamine composite nanorods cooperate with nano-enzyme and photosensitiser for intensive immunotherapy of bladder cancer. *Immunology* **2022**, *167*, 247–262. [CrossRef]
104. June, C.H.; O'Connor, R.S.; Kawalekar, O.U.; Ghassemi, S.; Milone, M.C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **2018**, *359*, 1361–1365. [CrossRef]
105. Rosenberg, S.A.; Restifo, N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* **2015**, *348*, 62–68. [CrossRef]
106. Rosenberg, S.A.; Yang, J.C.; Sherry, R.M.; Kammula, U.S.; Hughes, M.S.; Phan, G.Q.; Citrin, D.E.; Restifo, N.P.; Robbins, P.F.; Wunderlich, J.R.; et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 4550–4557. [CrossRef]
107. Foley, K.C.; Nishimura, M.I.; Moore, T.V. Combination immunotherapies implementing adoptive T-cell transfer for advanced-stage melanoma. *Melanoma Res.* **2018**, *28*, 171–184. [CrossRef]
108. Yin, H.; Guo, W.; Sun, X.; Li, R.; Feng, C.; Tan, Y. TILs and Anti-PD1 Therapy: An Alternative Combination Therapy for PDL1 Negative Metastatic Cervical Cancer. *J. Immunol. Res.* **2020**, *2020*, 8345235. [CrossRef]
109. Shafer, P.; Kelly, L.M.; Hoyos, V. Cancer Therapy With TCR-Engineered T Cells: Current Strategies, Challenges, and Prospects. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 835762. [CrossRef]
110. Yarza, R.; Bover, M.; Herrera-Juarez, M.; Rey-Cardenas, M.; Paz-Ares, L.; Lopez-Martin, J.A.; Haanen, J. Efficacy of T-Cell Receptor-Based Adoptive Cell Therapy in Cutaneous Melanoma: A Meta-Analysis. *Oncol.* **2023**, *28*, e406–e415. [CrossRef]
111. Biernacki, M.A.; Brault, M.; Bleakley, M. T-Cell Receptor-Based Immunotherapy for Hematologic Malignancies. *Cancer J.* **2019**, *25*, 179–190. [CrossRef] [PubMed]
112. Yi, X.; Hu, W. Advances in adoptive cellular therapy for colorectal cancer: A narrative review. *Ann. Transl. Med.* **2022**, *10*, 1404. [CrossRef] [PubMed]
113. Salter, A.I.; Rajan, A.; Kennedy, J.J.; Ivey, R.G.; Shelby, S.A.; Leung, I.; Templeton, M.L.; Muhunthan, V.; Voillet, V.; Sommermeyer, D.; et al. Comparative analysis of TCR and CAR signaling informs CAR designs with superior antigen sensitivity and in vivo function. *Sci. Signal.* **2021**, *14*, eabe2606. [CrossRef] [PubMed]
114. Grupp, S.A.; Kalos, M.; Barrett, D.; Aplenc, R.; Porter, D.L.; Rheingold, S.R.; Teachey, D.T.; Chew, A.; Hauck, B.; Wright, J.F.; et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 1509–1518. [CrossRef]
115. Kochenderfer, J.N.; Dudley, M.E.; Kassim, S.H.; Somerville, R.P.; Carpenter, R.O.; Stetler-Stevenson, M.; Yang, J.C.; Phan, G.Q.; Hughes, M.S.; Sherry, R.M.; et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 540–549. [CrossRef]
116. Fergusson, N.J.; Adeel, K.; Kekre, N.; Atkins, H.; Hay, K.A. A systematic review and meta-analysis of CD22 CAR T-cells alone or in combination with CD19 CAR T-cells. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1178403. [CrossRef]
117. Watanabe, K.; Kuramitsu, S.; Posey, A.D., Jr.; June, C.H. Expanding the Therapeutic Window for CAR T Cell Therapy in Solid Tumors: The Knowns and Unknowns of CAR T Cell Biology. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2486. [CrossRef]
118. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **2012**, *148*, 399–408. [CrossRef]
119. Yang, S.L.; Wu, C.; Xiong, Z.F.; Fang, X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 2411–2416. [CrossRef]
120. Palazon, A.; Tyrakis, P.A.; Macias, D.; Veliça, P.; Rundqvist, H.; Fitzpatrick, S.; Vojnovic, N.; Phan, A.T.; Loman, N.; Hedenfalk, I.; et al. An HIF-1α/VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 669–683.e5. [CrossRef]
121. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci. STKE* **2007**, *2007*, cm8. [CrossRef]
122. Schito, L.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 758–770. [CrossRef]
123. Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **2005**, *69* (Suppl. S3), 4–10. [CrossRef]
124. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* **2013**, *499*, 43–49. [CrossRef]
125. Mohl, D.A.; Lagies, S.; Zodel, K.; Zumkeller, M.; Peighambari, A.; Ganner, A.; Plattner, D.A.; Neumann-Haefelin, E.; Adlesic, M.; Frew, I.J.; et al. Integrated Metabolomic and Transcriptomic Analysis of Modified Nucleosides for Biomarker Discovery in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cells* **2023**, *12*, 1102. [CrossRef]
126. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 1263–1268. [CrossRef]

127. Courtnay, R.; Ngo, D.C.; Malik, N.; Ververis, K.; Tortorella, S.M.; Karagiannis, T.C. Cancer metabolism and the Warburg effect: The role of HIF-1 and PI3K. *Mol. Biol. Rep.* **2015**, *42*, 841–851. [CrossRef]
128. Gilkes, D.M.; Semenza, G.L.; Wirtz, D. Hypoxia and the extracellular matrix: Drivers of tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 430–439. [CrossRef]
129. Joseph, J.P.; Harishankar, M.K.; Pillai, A.A.; Devi, A. Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral Oncol.* **2018**, *80*, 23–32. [CrossRef]
130. Piñeiro Fernández, J.; Luddy, K.A.; Harmon, C.; O'Farrelly, C. Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4131. [CrossRef]
131. Hayes, C.; Donohoe, C.L.; Davern, M.; Donlon, N.E. The oncogenic and clinical implications of lactate induced immunosuppression in the tumour microenvironment. *Cancer Lett.* **2021**, *500*, 75–86. [CrossRef] [PubMed]
132. Murthy, A.; Gerber, S.A.; Koch, C.J.; Lord, E.M. Intratumoral Hypoxia Reduces IFN-γ-Mediated Immunity and MHC Class I Induction in a Preclinical Tumor Model. *ImmunoHorizons* **2019**, *3*, 149–160. [CrossRef] [PubMed]
133. Sethumadhavan, S.; Silva, M.; Philbrook, P.; Nguyen, T.; Hatfield, S.M.; Ohta, A.; Sitkovsky, M.V. Hypoxia and hypoxia-inducible factor (HIF) downregulate antigen-presenting MHC class I molecules limiting tumor cell recognition by T cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187314. [CrossRef] [PubMed]
134. Hu, M.; Li, Y.; Lu, Y.; Wang, M.; Li, Y.; Wang, C.; Li, Q.; Zhao, H. The regulation of immune checkpoints by the hypoxic tumor microenvironment. *PeerJ* **2021**, *9*, e11306. [CrossRef]
135. Labiano, S.; Palazon, A.; Melero, I. Immune response regulation in the tumor microenvironment by hypoxia. *Semin. Oncol.* **2015**, *42*, 378–386. [CrossRef]
136. Facciabene, A.; Peng, X.; Hagemann, I.S.; Balint, K.; Barchetti, A.; Wang, L.P.; Gimotty, P.A.; Gilks, C.B.; Lal, P.; Zhang, L.; et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* **2011**, *475*, 226–230. [CrossRef]
137. Vitale, I.; Manic, G.; Coussens, L.M.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 36–50. [CrossRef]
138. Xiao, M.; Benoit, A.; Hasmim, M.; Duhem, C.; Vogin, G.; Berchem, G.; Noman, M.Z.; Janji, B. Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 626309. [CrossRef]
139. Noman, M.Z.; Janji, B.; Kaminska, B.; Van Moer, K.; Pierson, S.; Przanowski, P.; Buart, S.; Berchem, G.; Romero, P.; Mami-Chouaib, F.; et al. Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 5976–5986. [CrossRef]
140. Barsoum, I.B.; Smallwood, C.A.; Siemens, D.R.; Graham, C.H. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 665–674. [CrossRef]
141. Huang, X.; Zhang, X.; Li, E.; Zhang, G.; Wang, X.; Tang, T.; Bai, X.; Liang, T. VISTA: An immune regulatory protein checking tumor and immune cells in cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *13*, 83. [CrossRef]
142. Li, Y.; Zhao, L.; Li, X.F. The Hypoxia-Activated Prodrug TH-302: Exploiting Hypoxia in Cancer Therapy. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 636892. [CrossRef]
143. Jayaprakash, P.; Ai, M.; Liu, A.; Budhani, P.; Bartkowiak, T.; Sheng, J.; Ager, C.; Nicholas, C.; Jaiswal, A.R.; Sun, Y.; et al. Targeted hypoxia reduction restores T cell infiltration and sensitizes prostate cancer to immunotherapy. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 5137–5149. [CrossRef]
144. Phillips, R.M. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77*, 441–457. [CrossRef]
145. Wang, Y.; Shang, W.; Niu, M.; Tian, J.; Xu, K. Hypoxia-active nanoparticles used in tumor theranostic. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 3705–3722. [CrossRef]
146. Zhou, T.; Liang, X.; Wang, P.; Hu, Y.; Qi, Y.; Jin, Y.; Du, Y.; Fang, C.; Tian, J. A Hepatocellular Carcinoma Targeting Nanostrategy with Hypoxia-Ameliorating and Photothermal Abilities that, Combined with Immunotherapy, Inhibits Metastasis and Recurrence. *ACS Nano* **2020**, *14*, 12679–12696. [CrossRef]
147. Lee, K.; Zhang, H.; Qian, D.Z.; Rey, S.; Liu, J.O.; Semenza, G.L. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17910–17915. [CrossRef]
148. Wilson, W.R.; Hay, M.P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 393–410. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ANNEXE IV

Benoit A, Lequeux A, Harter P, Berchem G, Janji B. **Atypical Chemokine Receptor 2 expression is directly regulated by Hypoxia Inducible Factor-1 alpha in cancer cells under hypoxia**. En soumission (Avril 2024)

Contribution à l'article

Dans l'article scientifique intitulé « **Atypical Chemokine Receptor 2 expression is directly regulated by Hypoxia Inducible Factor-1 alpha in cancer cells under hypoxia** » soumis en Avril 2024 dans Oncogene, j'ai rédigé le manuscrit entier, et j'ai conçu, réalisé et analysé toutes les expériences à l'exception du panel B de la Figure 1.

Atypical Chemokine Receptor 2 expression is directly regulated by Hypoxia Inducible Factor-1 alpha in cancer cells under hypoxia.

Alice Benoit[1], Audrey Lequeux[2], Phillip Harter[1], Guy Berchem[1,2]; Bassam Janji[1].
[1] Tumor Immunotherapy and Microenvironment (TIME) Group, Department of Cancer Research, Luxembourg Institute of Health (LIH), L-1210 Luxembourg, Luxembourg.
[2] Department of Hemato-Oncology, Centre Hospitalier du Luxembourg, L-1210 Luxembourg, Luxembourg;

Received xxxxxx
Accepted for publication xxxxxx
Published xxxxxx

Abstract

Lack of significant and durable clinical benefit from anti-cancer immunotherapies is partly due to the failure of cytotoxic immune cells to infiltrate the tumor microenvironment. Immune infiltration is predominantly dependent on the chemokine network, which is regulated in part by chemokine and atypical chemokine receptors. We investigated the impact of hypoxia in the regulation of Atypical Chemokine Receptor 2 (ACKR2), which subsequently regulates major pro-inflammatory chemokines reported to drive cytotoxic immune cells into the tumor microenvironment. We showed *in silico* that both murine and human ACKR2 promoters contain hypoxia response element (HRE) motifs. Murine and human colorectal, melanoma, and breast cancer cells overexpressed ACKR2 under hypoxic conditions in a HIF-1α dependent manner; as such overexpression was abrogated in melanoma cells expressing non-functional deleted HIF-1α. We also showed that decreased expression of ACKR2 in HIF-1α-deleted cells under hypoxia was associated with increased CCL5 levels. We provided chromatin immunoprecipitation data showing that ACKR2 is directly regulated by HIF-1α at its promoter in B16-F10 melanoma cells. This study provides new key elements on how hypoxia can impair immune infiltration in the tumor microenvironment.

Keywords: Atypical chemokine receptors; cancer; hypoxia; immune infiltration; chemokines

Introduction

Hypoxia is a well known hallmark of solid tumors. Healthy tissues average about 5% oxygen, while tumor tissues exhibit oxygen levels below 2% [1]. The response to hypoxic tumor microenvironment (TME) is mediated by the hypoxia-inducible factors (HIF), in particular HIF-1 alpha (HIF-1α), which promote an immunosuppressive TME and tumor immune escape [2]. In normoxia, HIF-1α is hydroxylated and bound to the von Hippel-Lindau (VHL) protein, which recruits an ubiquitine ligase that targets HIF-1α for degradation by the proteasome [3]. In hypoxia, HIF-1α is no longer hydroxylated and no longer degraded ; thus, stabilized HIF-1α is translocated into the nucleus, where it can form an heterodimer with HIF-1β/Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator [4]. The

 © xxxx IOP Publishing Ltd

heterodimer HIF-1α/HIF-1β can bind on hypoxia response elements (HRE) defined by the binding site 5'-RCGTG-3', where R can be A or G, and activate the transcription of target genes involved in cancer progression [5].

Hypoxia also drives resistance to cancer therapies, such as chemotherapy [6], radiotherapy [7] and immunotherapy [8]. Regarding the latter, it has been shown that hypoxic conditions create an immunosuppressive environment by many ways; one of them is by decreasing the ratio between anti-tumor effector immune cells such as dendritic cells, CD4+ and CD8+ T cells, and Natural Killer (NK) cells [9], and immunosuppressive cells such as myeloid-derived suppressor cells, tumor-associated macrophages with a pro-tumoral M2 phenotype and T-regulatory cells [10]. Trafficking of these critical immune cells is also mediated by chemokines and their corresponding chemokine receptors [11]. Studies have shown that hypoxia can impair immune cells trafficking and promote cancer progression by regulating chemokines and chemokines receptors. Indeed, in several cancer types, HIF-1 and HIF-2-mediated hypoxia can directly regulate the CC chemokines CCL2, CCL3, CCL5, CCL15, CCL16, CCL20 and CCL28, the CXC chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL14 and CXCL16 ; as well as the chemokines receptors CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5 and CXCR6, due to the presence of HRE on their promoters [12, 13]. Hypoxia can also indirectly regulate the chemokines CCL7, CCL8, CCL11, CCL18, CXCL3, CXCL7, CXCL8 and CXCL11, and the chemokine receptors CXCR3 and CXCR7 through the regulation of other factors, such as zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), oncostatin M expression, activating protein-1 (AP-1) and NF-κB [12, 13].

An emergent class of chemokine receptors are Atypical Chemokine Receptors (ACKRs). Unlike the classical chemokine receptors, they present a modification on their second intracellular loop that prevents any G protein binding and classical GPCR signaling [14]. Instead, they regulate chemokine network through internalization and degradation or redirecting of their ligands [15]. The ACKRs family contains 4 members : Atypical Chemokine Receptors 1, 2, 3 and 4. More recently, additionnal atypical chemokine receptors have been considered : GPR182, CCRL2, GPR1, PITPNM3 and C5aR2, which posses similar features to ACKRs [16]. While the regulation of ACKRs and additional ACKRs is still under investigation, studies have shown that some of them could be regulated by hypoxia, such as ACKR3 (also called CXCR7) [17, 18] and GPR182 [19]. In our study, we focused on ACKR2, which can scavenge pro-inflammatory chemokines such as CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL17, CCL22, CXCL2, CCL26 and CXCL10, thus regulating the infiltration of effector immune cells [20, 21]. Studies have shown that ACKR2 expression on myeloid progenitor cells, mast cells, megakaryocytes, and dendritic cells is dependent on the transcription factor GATA1 [22], and that ACKR2 is regulated by the miRNA miR-146b in psoriasis and thyroid cancer [23, 24] and by the KRAS/BRAF/ERK pathway in Kaposi's sarcoma [25]; however, there is no evidence of an hypoxia-mediated regulation of ACKR2. Based on evidence showing that hypoxia can regulate classical chemokine receptors as well as some ACKRs [17-19], we hypothesized that hypoxia *via* HIF1-α could regulate ACKR2 expression.

In this study, we evaluated ACKR2 expression in hypoxia in various mouse and human cancer cell types: melanoma, triple-negative breast cancer and colorectal cancer. Our results revealed that ACKR2 expression was significantly increased in all cell types in hypoxia compared to normoxia, at both transcriptional and protein levels. In melanoma B16-F10 cells previously reported to express deleted HIF-1α [26], ACKR2 expression was decreased and associated with increased CCL5 levels, providing further evidence that ACKR2 could be regulated by HIF-1α. Our chromatin immunoprecipitation results confirmed that HIF-1α binds to at least two HRE motifs within *ACKR2* promoter in B16-F10 melanoma cells. In addition, we evaluated ACKR2 expression in B16-F10 tumors previously reported to express deleted for HIF-1α [26]. In these tumors, ACKR2 expression was also significantly decreased and associated with an increase of CCL5 levels and immune infiltration.

Materials and methods

Cell culture and hypoxia

B16-F10, CT26.WT, 4T1,A-375, MDA-MB-468 and Caco-2 cell lines were all purchased from the American Type Culture Collection and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium or Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium with 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin, at 37°C et 5% CO_2. B16-F10 and 4T1 cells deleted for HIF-1α were generated by CRISPR-Cas9 as previously described [26]. Hypoxic conditions were performed in Whitley H35 Hypoxystation from Don Whitley Scientific at 0.1% O_2, 5% CO_2 and 80% relative humidity for 48 hours.

RNA Extraction, Reverse-transcription, SYBR Green RT-qPCR and Primers

Total RNA was extracted with a Nucleospin RNA Plus Kit (Macherey-Nagel) and reverse-transcribed with a Maxima First-Strand cDNA Synthesis Kit (Thermofisher Scientific). Synthetized cDNA was amplified by qPCR using SYBR Green PCR Master Mix (Eurogentec). Normalization was made with *18S* (forward 5'-GAT-GGG-CGG-CGG-AAA-ATA-G-3' and reverse 5'-GCG-TGG-ATT-CTG-CAT-AAT-GGT-3') or *Rpl13* (forward 5'-TGT-TGA-TGC-CTT-CAC-AGC-GT-3' and reverse 5'-GGA-GGG-GCA-GGT-TCT-GGT-AT-3'). Other primers were purchased from Qiagen.

Flow Cytometry

After collecting the supernatant, cells cultured in normoxia (21% O_2) or hypoxia (0,1% O_2) were washed with PBS and detached using 10 mM EDTA for 10 minutes at 37°C, before collection with PBS and centrifugation at 400x *g* for 5 minutes, at 4°C. Next, cells were incubated with LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, L34976) for 20 minutes at 4°C. After two washes in MACS buffer (Miltenyi, 130-091-221), cells were fixed and permeabilized using the Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer Set (Biolegend, 426803) according to the manufacturer's instructions. After permeabilization, cells were incubated with anti-ACKR2 primary antibody (Invitrogen, CCRD6 Goat anti-Mouse PA121612 or CCRD6 Goat Polyclonal Antibody PA121614) and then the secondary antibody (Abcam, Donkey Anti-Goat IgG H&L, Alexa Fluor® 488, ab150129), both for 1 hour at room temperature. Cells were washed twice in Cyto-Fast Perm Wash 1X in between antibodies and after staining. Samples were processed using the Beckman Coulter CytoFLEX Model A00-1-1102 and data were analyzed with the CytExpert software (Beckman Coulter).

Western Blotting

Cells have been lysed using RIPA Lysis Buffer (Merck Millipore, 20-188) supplemented with 1x protease and phosphatase inhibitors (Thermo Scientific™, 78444). Collected samples were then vortexed and centrifuged at maximum power for 10 minutes at 4°C. Supernatant was collected for protein assay with Bradford blue (Bio-Rad, 5000006) with the measure of optical density at 595 nm. The volume required to obtain 25 µg of protein (for B16-F10 cells) or 40 ug of protein (for 4T1 cells) was calculated and mixed with water and 4X Laemmli buffer, before boiling at 95°C for 5 minutes. Samples were then deposited on a 10% SDS-PAGE gel, alongside a molecular weight marker (Proteintech, PL00001). After migration, the gel was transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham™, GE10600004). Once transfer was complete, the membrane was blocked in 5% milk and then incubated in primary antibody for one hour at room temperature or overnight at 4°C. After washing, the membrane was incubated again for one hour at room temperature with the secondary antibody. Antibodies used for protein detection by Western blot were anti-HIF-1α (Cell Signaling, HIF-1α (D2U3T) Rabbit mAb, 14179), anti-rabbit (Cell Signaling, Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 7074) and anti-Actin (Sigma-Aldrich-Merck, Anti-β-Actin-Peroxidase antibody, Mouse monoclonal, reference: A3854). For revelation, chemiluminescent substrate was used (PerkinElmer, NEL113001EA). The membrane was revealed either by camera (ImageQuantLAS4000, GE Gealthcare Life Sciences) or using autoradiographic films (Cytiva, 28906843).

ELISA and Cytokine profiling

ELISAs were performed using DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2 (R&D Systems, DY008B) and Mouse CCL5/RANTES DuoSet ELISA (R&D Systems, DY478) following the protocol provided by the supplier.

Immunohistochemistry Images

ACKR2 and CCL5 staining were performed by HistoWiz Company (NY, USA) on tumors previously generated in [26]. Quantification of ACKR2 staining was made using Aperio ImageScope software.

ChIP-qPCR

Chromatin immunoprecipitation was performed using the iDeal ChIP-qPCR Kit (Diagenode, C01010180) following the manufacturer's instructions. Samples were sonicated with a M220 Focused-ultrasonicator (Covaris, 500295) and chromatin fragments size were analyzed on a 1.5% agarose gel. For immunoprecipitation, IgG or anti-HIF-1α antibody (Novus Biologicals, NB100-479) were used. Primers for qPCR were designed using Primer-BLAST (NCBI). For the positive control, primers were designed specifically to amplify HRE motifs of *Ca9* and *Vefga*. For the negative control, primers were designed specifically to amplify *Ackr2* sequences without HRE. To identify the binding of HIF-1α on *Ackr2* promoter, primers have been created specifically to amplify HRE motifs present in the promoter. At least two primer pairs were tested for each gene (primers sequences are provided in Supplementary Table 1). For each primer pair, INPUT was analyzed alongside the IgG negative control and immunoprecipitated samples. The cycle threshold values of the qPCR exponential phase were recorded for each sample and each INPUT, and the relative amount of immunoprecipitated DNA compared with INPUT DNA was calculated.

NanoString analysis

NanoString analysis was performed on previously generate tumors in each group (B16-F10 CTRL and B16-F10 HIFΔ) using the nCounter® PanCancer IO 360TM panel. All data were standardized and quality-controlled. Data analysis was performed using nCounter® Advanced Analysis Software.

Statistical analysis

All statistical analysis were performed using unpaired two-tailed Student's t-test in GraphPad Prism version 10.

Results and discussion

ACKR2 is upregulated in hypoxia as compared to normoxia in mouse and human melanoma, colorectal and triple negative breast cancer cells

Based on evidence showing that hypoxia regulates other atypical chemokine receptors and *in silico* data generated by JASPAR and MCAST showing that ACKR2 contains HRE motifs on its mouse and human promoters (**Supplementary Fig. 1**), we evaluated ACKR2 expression in various cancer cell types in normoxia and hypoxia. Studied cell lines were mouse melanoma B16-F10 (**Figure 1A**), human melanoma A-375 (**Figure 1B**), mouse colorectal CT26 (**Figure 1C**), human colorectal Caco-2 (**Figure 1D**), mouse triple-negative breast cancer 4T1 (**Figure 1E**) and human triple-negative breast cancer MDA-MB-468 (**Figure 1F**). For flow cytometry, cells were permeabilized to determine intracellular staining, since no difference was observed at the cell surface (*data not shown*). This is consistent with the fact that ACKR2 has been shown to be constitutively less than 5% expressed at the cell surface, while the majority of its expression is found in internal endosomes, and the variable factor is the recycling rate [27]. The Vascular Endothelial Growth Factor A (*Vegfa)* and Carbonic anhydrase 9 (*Ca9)* are known downstream target genes of HIF-1α [28, 29], and their mRNA levels were determined by RT-qPCR for each experiments to verify hypoxic conditions. For each cell line, ACKR2 expression was increased at transcriptional and protein level in hypoxic conditions compared to normoxia, showing strong evidence that ACKR2 expression is indeed upregulated by hypoxia (**Figure 1 A-F**).

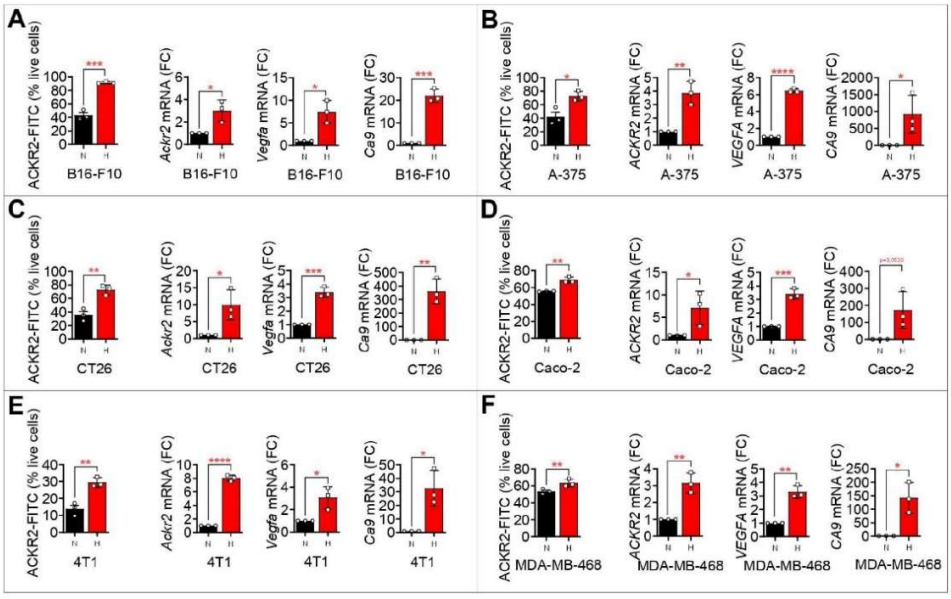


Fig. 1 ACKR2 protein and mRNA levels are upregulated in hypoxia in B16-F10, A-375, CT26, Caco-2, 4T1 and MDA-MB-468 cells.
ACKR2 protein expression analysis by flow cytometry and RT-qPCR quantification of *Ackr2*, *Ca9*, and *Vegfa* mRNA levels in (**A**) B16-F10, (**B**) A-375, (**C**) CT26, (**D**) Caco-2, (**E**) 4T1 and (**F**) MDA-MB-468 cells cultured in normoxia (21% O_2 - N) or in hypoxia (0.1% O_2 - H) for 48 hours. *Ca9* and *Vegfa* gene expressions were analyzed to confirm the induction of hypoxic conditions. Results are reported as % of positive live cells or fold change (FC) and represent the average of three independent

experiments. Error bars indicate mean ± SEM. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ and **** = $p < 0.0001$, determined by unpaired two-tailed Student's t test.

Impairing of HIF-1α transcriptional activity in B16-F10 melanoma cells inhibits the hypoxia-induced ACKR2 expression

To determine whether the upregulation of ACKR2 observed in hypoxia is mediated by HIF-1α transcription factor, we used B16-F10 melanoma cells deleted for HIF-1α (named B16-F10 HIFΔ) as previously described [26]. We first confirmed by western-blot that we obtained similar results with an accumulation of HIF-1α protein in hypoxic conditions, and with a troncated form of HIF-1α in B16-F10 HIFΔ cells (**Figure 2A**). We then assessed ACKR2 protein expression by flow cytometry (**Figure 2B**) and mRNA levels by RT-qPCR (**Figure 2C**). *Vegfa* and *Ca9* mRNA levels were verified by RT-qPCR for each experiments to confirm hypoxic conditions and to confirm that the troncated form of HIF-1α was no longer transcriptionnally active (**Figure 2C**). We can see a significant increase of ACKR2 protein in B16-F10 CTRL cells in hypoxia compared to normoxia, as observed previously with B16-F10 wt cells ; however, for B16-F10 HIFΔ cells, there is still an increase of ACKR2 protein in hypoxia, but significantly less compared to hypoxic B16-F10 CTRL (**Figure 2B**). This slight increase between normoxic and hypoxic HIFΔ cells could be due to the regulation by another hypoxia-induced factor, e.g. HIF-2α. On the other hand, this increase is not found at the mRNA level of *Ackr2* under these conditions (**Figure 2C**), which would rather assume a post-translational mechanism (phosphorylation, glycosylation, acetylation, stimulation by ligand binding...). Regarding mRNA levels, *Vegfa* and *Ca9* expressions are no longer induced in hypoxic B16-F10 HIFΔ cells compared to CTRL cells, showing that the deletion of HIF-1α efficiently inhibits its transcription activity. The same results are observed for *Ackr2* mRNA level, where its increased expression in hypoxic B16-F10 CTRL cells is no longer found in B16-F10 HIFΔ cells (**Figure 2C**). Increased expression of ACKR2 was associated with an decreased level of CCL5 in hypoxic conditions compared to normoxic conditions for B16-F10 HIFΔ and B16-F10 CTRL cells, as confirmed by ELISA (**Figure 2D**). However, when compairing CCL5 levels in both conditions between CTRL and HIFΔ cells, CCL5 seemed increased in HIFΔ cells compared to CTRL cells, but not in a significant way (*p-value = 0,06 and 0,08*) (**Figure 2D**). ACKR2 is able to scavenge the pro-inflammatory chemokine CCL5 [30], but it should be highlighted that in hypoxia, CCL5 is also regulated by HIF-2 and NF-κB [12]. CCL5 participates in the recruitment of immune cells such as macrophages, basophils, eosinophils and T cells, and is known to promote cancer cells proliferation and metastasis formation [31]. This result suggests the fonctional impact of ACKR2 downregulation in B16-F10 HIFΔ cells on CCL5, which could potentially lead to an increase of immune infiltration mediated by CCL5 or other chemokines scavenged by ACKR2.

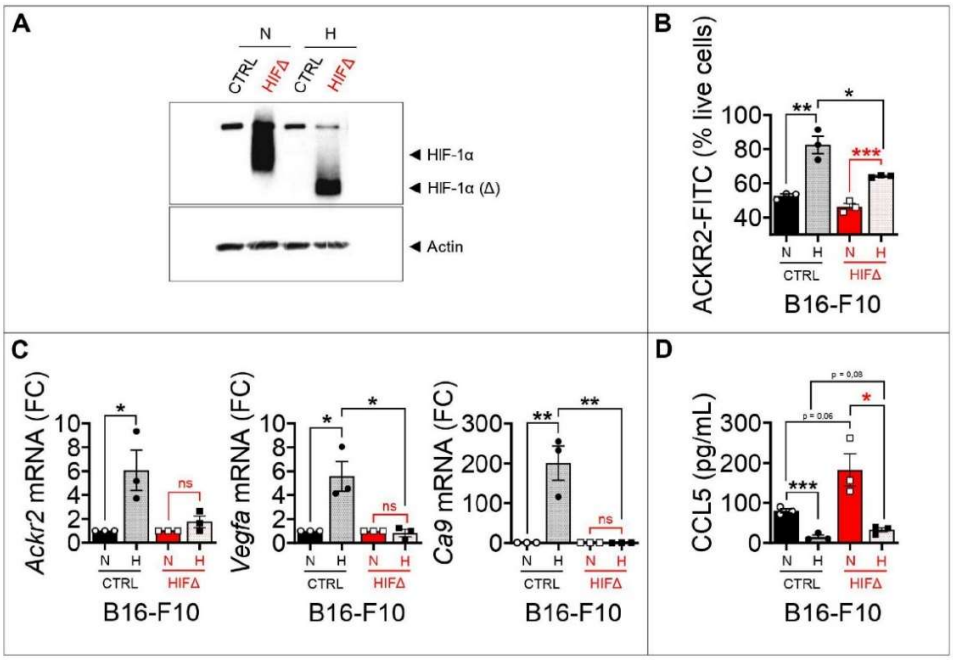


Fig. 2 Inhibition of HIF-1α trancription activity impairs the hypoxia-induced ACKR2 expression and increases CCL5 levels in B16-F10 melanoma cells.

(**A**) Western-blot analysis of HIF-1α protein expression in B16-F10 CTRL and HIFΔ cells cultured in normoxia (21% O_2 - N) or hypoxia (0.1% O_2 - H) for 48 hours. Actin was used as a loading control. (**B**) ACKR2 protein expression analysis by flow cytometry in permeabilized B16-F10 CTRL and HIFΔ cells cultured in normoxia (21% O_2 - N) or hypoxia (0.1% O_2 - H) for 48 hours. Results are reported as % of positive live cells and represent the average of three independent experiments. Error bars indicate mean ± SEM. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, and *** = $p < 0.001$, determined by unpaired two-tailed Student's t test. (**C**) RT-qPCR quantification of *Ackr2*, *Ca9*, and *Vegfa* mRNA levels in cells described in (B). *Ca9* and *Vegfa* gene expressions were analyzed to confirm the induction of hypoxic conditions. Results are reported as fold change (FC) and represent the average of three independent experiments. Error bars indicate mean ± SEM. ns = not significant, * = $p < 0.05$, and ** = $p < 0.01$, determined by unpaired two-tailed Student's t test. (**D**) ELISA quantification of CCL5 protein levels in the supernatant of cells described in (B) and (C). Results are reported as pg/ml and represent the average of three independent experiments. Error bars indicate mean ± SEM. * = $p < 0.05$ and *** = $p < 0.001$, determined by unpaired two-tailed Student's t test.

Transcription factor HIF-1α directly binds to the HRE motifs of Ackr2 promoter in hypoxic B16-F10 melanoma cells

Based on our results showing that the transcription factor HIF-1α is involved in ACKR2 regulation, our goal was to determine whether the regulation is direct or involves other factors. To do so, we generated chromatin immunoprecipitation-qPCR data using an anti-HIF-1α antibody and primers amplifying HRE motifs within *Ackr2* promoter (**Supplementary Table 1**). We could observe that for B16-F10 CTRL cells, the signal is increased for two HRE of *Ackr2* promoter in a similar way of *Vegfa* HRE, which is a known downstream target gene of HIF-1α [29]. It was no longer the case for B16-F10 HIFΔ cells or with the primers amplifying an *Ackr2* sequence containing no HRE (*Ackr2*-NegCTRL), which shows the specificity of the signal (**Figure 3A**). We conclude that the transcription factor HIF-1α binds to both HRE motifs (**Figure 3B**). These results are consistent with our previous

data showing an increased ACKR2 expression in hypoxic conditions, and a decreased ACKR2 expression in hypoxic cells deleted for HIF-1α.

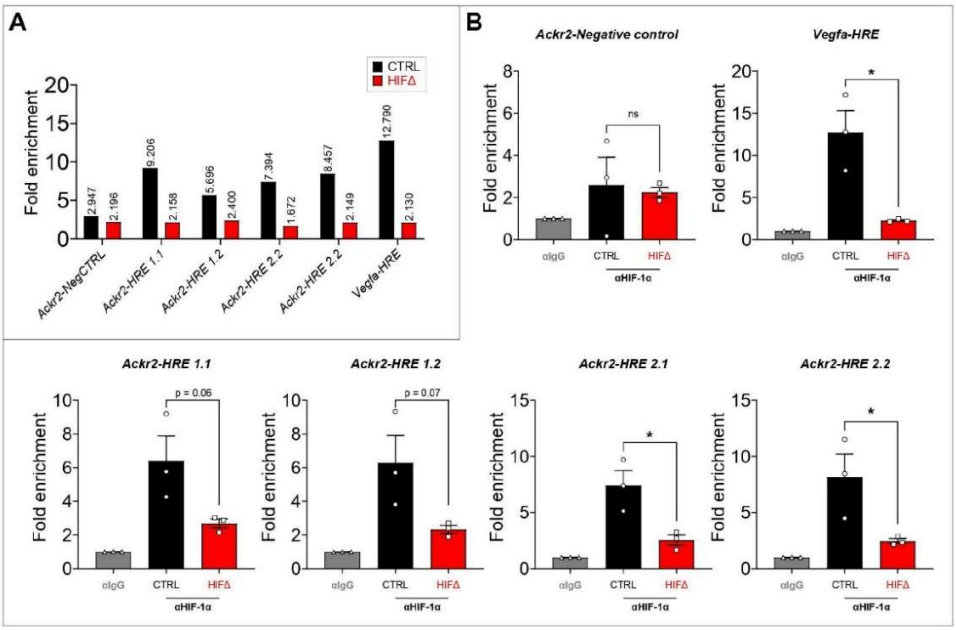


Fig. 3 HIF-1α transcription factor is able to bind directly onto HRE motifs of Ackr2 promoter in B16-F10 cells. (**A**) Single chromatin immunoprecipitation experiment performed using an anti-HIF-1α antibody on B16-F10 CTRL and HIFΔ cells cultured in hypoxia for 48 hours (0.1% O_2), and followed by a qPCR with primers amplifying HRE motifs of *Vegfa* and *Ackr2*. A random sequence of *Ackr2* containing no HRE motifs was used as a negative control (Ackr2-NegCTRL), while *Vegfa*-HRE was used as a positive control. For each HRE motif in the *Ackr2* promoter, two different primer pairs were used (Ackr2 HRE 1.1, 1.2, 2.1 and 2.2). For each gene, the signals obtained by qPCR were normalized to the IgG condition. (**B**) Combination of three independent chromatin immunoprecipitation experiments performed as described in (A). For each gene, the signals obtained by qPCR were normalized to the IgG condition. Statistically significant differences between results obtained for B16-F10 CTRL and HIFΔ cells are shown. Results are reported in fold enrichment and error bars represent the mean ± SEM of three independent experiments. ns = not significant, and * = p-value < 0.05, determined by an unpaired Student's t-test.

Inhibition of HIF-1α transcriptional activity in B16-F10 tumors decreases ACKR2 expression, enhances the release of CCL5 and the infiltration of major immune cells into the tumor microenvironment

To determine whether ACKR2 regulation by hypoxia could also be observed in B16-F10 tumors, we next evaluated ACKR2 expression in B16-F10 tumors presenting the HIF-1α deletion previously generated in [26]. Inhibition of HIF-1α transcription activity was confirmed with a significant decrease of *Vegfa* and *Ca9* mRNA levels in B16-F10 HIFΔ tumors. In line with our previous results, *Ackr2* mRNA level was also significantly decreased in B16-F10 HIFΔ tumors compared to CTRL tumors (**Figure 4A**). We next assessed protein levels with an immunohistochemistry study of ACKR2, and CCL5 proteins. We could observe a decrease of ACKR2 staining in B16-F10 HIFΔ tumors compared to B16-F10 CTRL tumors, which confirms that the expression of ACKR2 is not only decreased at the transcriptional level, but also at the protein level (**Figure 4B**). Quantification of ACKR2

staining in 3 different tumors of each group confirmed that ACKR2 protein is significantly decreased in B16-F10 HIFΛ tumors compared to control tumors (**Figure 4C**). We could also see an increase of CCL5 staining B16-F10 HIFΔ tumors compared to control (**Figure 4B**), which is in line with the fact that ACKR2 is able to scavenge CCL5 to induce its degradation by endosomal pathway [30]. This was associated with an increase of B cells, T cells, cytotoxic cells, neutrophils and exhausted CD8+ T cells infiltration according to specific markers as determined by NanoString analysis (**Figure 4D**). This result confirmed our previous data, where we observed a significant increase in the infiltration of live NK, CD4+ and CD8+ T cells in HIF-1α-deleted tumors compared to control tumors [26]. Regarding exhausted T cells, we observed a significant decrease in the expression of the activation marker CD69, but not of the exhaustion marker PD-1 in our tumors [26]. Nevertheless, we had used PD-1 as an exhaustion marker, whereas NanoString technology relies on the mRNA of *Ptger4*, *CD244*, *Eomes* and *Lag3* to determine immune cells exhaustion. Thus, the use of other exhaustion markers might have been able to accurately identify an exhausted immune cell population in our HIF-deleted tumors. Overall, the increased immune infiltration is consistent with the fact that ACKR2 is responsible of the regulation of the chemokine network, a master regulator of immune infiltration [20].

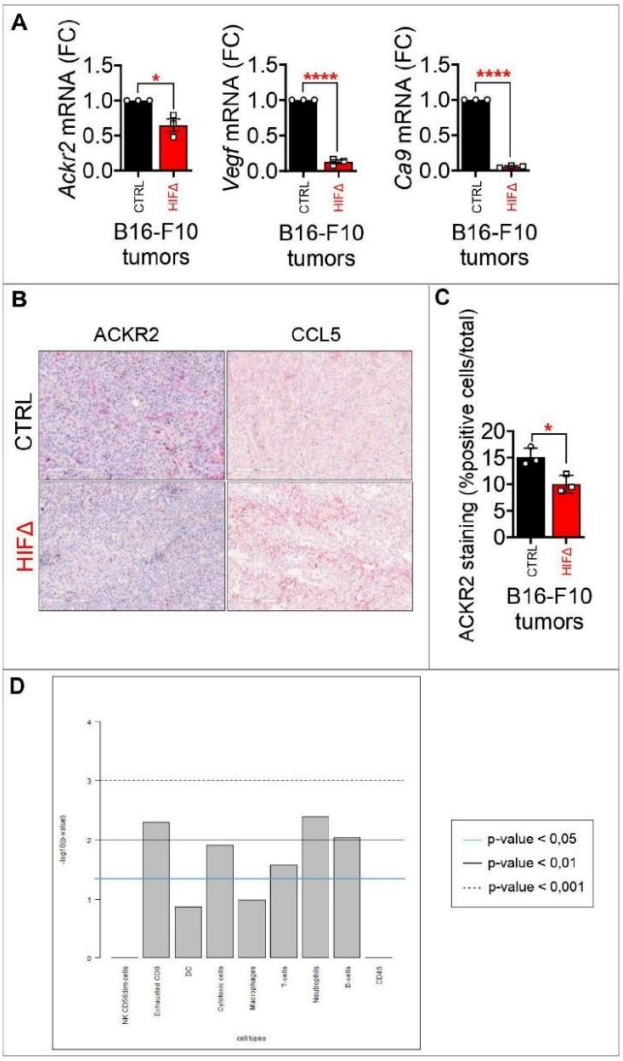


Fig. 4 ACKR2 expression is decreased in B16-F10 HIFΔ tumors and associated with an increase of CCL5 protein levels and an infiltration of B cells, T cells, cytotoxic cells, neutrophils and exhausted CD8+ T cells.
(**A**) RT-qPCR analysis of *Ackr2*, *Vegfa* and *Ca9* gene expression in B16-F10 CTRL and HIFΔ tumors. Results are reported in fold change (FC) and error bars represent the mean ± SEM of 3 tumors per group. * = p-value < 0.05 and **** = p-value < 0.0001, determined by unpaired Student's t-test. (**B**) Immunohistochemistry images of ACKR2 and CCL5 staining (in red), performed on B16-F10 CTRL and HIFΔ tumors used in (A). Scale bars: 200 µm. (**C**) Quantification of ACKR2 staining by immunohistochemistry on B16-F10 CTRL and HIFΔ tumors described in (A) and (B). Results are reported as percentage of

cells positively stained cells compared to total cell numbers. For quantification, three random areas of three tumors per group were considered, and averaged. Error bars represent the mean ± SEM of 3 tumors per group. * = p-value < 0.05 determined by unpaired Student's t-test. (**D**) Infiltration of different immune cell populations in B16-F10 HIFΔ tumors compared to B16-F10 CTRL tumors described in (A), (B) and (C). Immune infiltration was determined by NanoString analysis performed for 3 tumors in each group using the nCounter® PanCancer IO 360™ panel. All data were standardized and quality-controlled. Data analysis was performed using nCounter® Advanced Analysis Software.

Conclusions

Our study showed that hypoxia upregulates ACKR2 expression at transcriptional and protein levels in melanoma, triple negative breast cancer and colorectal cancer murine and human cell lines. In B16-F10 cells deleted for HIF-1α, ACKR2 expression was decreased and associated with an increase in CCL5 protein levels, providing further evidence that ACKR2 may be regulated by HIF-1α and influences CCL5 levels. Our chromatin immunoprecipitation results confirmed that HIF-1α binds to at least two HRE motifs within the *Ackr2* promoter in B16-F10 melanoma cells, in the same manner as with HRE within *Vegfa* promoter. These results were translated *in vivo*, where ACKR2 expression was also significantly decreased in B16-F10 HIFΔ tumors compared to control tumors, and associated with increased CCL5 levels and infiltration of B cells, T cells, cytotoxic cells, neutrophils and exhausted CD8+ T cells. Overall, our results identify HIF-1α as a novel direct regulator of the atypical chemokine receptor ACKR2 in cancer, and reveal a new way by which HIF1-α-mediated hypoxia could impair immune infiltration within the TME and promote cancer progression.

Supplementary materials

Fig. S1 MCAST and JASPAR analysis of *ACKR2* mouse and human promoters.
Table 1 List of primers used for ChIP-qPCR results.

Author contributions

A.B. designed and performed experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. A.L. established cellular models. P.H. performed experiments. B.J. designed experiments and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This study was supported by the Luxembourg Institute of Health and grants from the Action LIONS Vaincre Le Cancer Luxembourg (2020) and FNRS Televie (7.4559.21F).

References

1. McKeown, S.R., *Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response.* Br J Radiol, 2014. **87**(1035): p. 20130676.
2. Wu, Q., L. You, E. Nepovimova, Z. Heger, W. Wu, K. Kuca and V. Adam, *Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape.* J Hematol Oncol, 2022. **15**(1): p. 77.
3. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.* Cell, 2012. **148**(3): p. 399-408.
4. Jaakkola, P., D.R. Mole, Y.M. Tian, M.I. Wilson, J. Gielbert, S.J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H.F. Hebestreit, M. Mukherji, C.J. Schofield, et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation.* Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
5. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics.* Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625-34.
6. Shannon, A.M., D.J. Bouchier-Hayes, C.M. Condron and D. Toomey, *Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies.* Cancer Treat Rev, 2003. **29**(4): p. 297-307.

7. Colliez, F., B. Gallez and B.F. Jordan, *Assessing Tumor Oxygenation for Predicting Outcome in Radiation Oncology: A Review of Studies Correlating Tumor Hypoxic Status and Outcome in the Preclinical and Clinical Settings.* Front Oncol, 2017. **7**: p. 10.
8. Kopecka, J., I.C. Salaroglio, E. Perez-Ruiz, A.B. Sarmento-Ribeiro, S. Saponara, J. De Las Rivas and C. Riganti, *Hypoxia as a driver of resistance to immunotherapy.* Drug Resist Updat, 2021. **59**: p. 100787.
9. de la Cruz-López, K.G., L.J. Castro-Muñoz, D.O. Reyes-Hernández, A. García-Carrancá and J. Manzo-Merino, *Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches.* Front Oncol, 2019. **9**: p. 1143.
10. McDonald, P.C., S.C. Chafe and S. Dedhar, *Overcoming Hypoxia-Mediated Tumor Progression: Combinatorial Approaches Targeting pH Regulation, Angiogenesis and Immune Dysfunction.* Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 27.
11. Griffith, J.W., C.L. Sokol and A.D. Luster, *Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity.* Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 659-702.
12. Korbecki, J., K. Kojder, K. Barczak, D. Simińska, I. Gutowska, D. Chlubek and I. Baranowska-Bosiacka, *Hypoxia Alters the Expression of CC Chemokines and CC Chemokine Receptors in a Tumor-A Literature Review.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(16).
13. Korbecki, J., K. Kojder, P. Kapczuk, P. Kupnicka, B. Gawrońska-Szklarz, I. Gutowska, D. Chlubek and I. Baranowska-Bosiacka, *The Effect of Hypoxia on the Expression of CXC Chemokines and CXC Chemokine Receptors-A Review of Literature.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(2).
14. Ulvmar, M.H., E. Hub and A. Rot, *Atypical chemokine receptors.* Exp Cell Res, 2011. **317**(5): p. 556-68.
15. Nibbs, R., G. Graham and A. Rot, *Chemokines on the move: control by the chemokine "interceptors" Duffy blood group antigen and D6.* Semin Immunol, 2003. **15**(5): p. 287-94.
16. Torphy, R.J., E.J. Yee, R.D. Schulick and Y. Zhu, *Atypical chemokine receptors: emerging therapeutic targets in cancer.* Trends Pharmacol Sci, 2022. **43**(12): p. 1085-1097.
17. Bianco, A.M., M. Uno, S.M. Oba-Shinjo, C.A. Clara, T.F. de Almeida Galatro, S. Rosemberg, M.J. Teixeira and S.K. Nagahashi Marie, *CXCR7 and CXCR4 Expressions in Infiltrative Astrocytomas and Their Interactions with HIF1α Expression and IDH1 Mutation.* Pathol Oncol Res, 2015. **21**(2): p. 229-40.
18. Esencay, M., Y. Sarfraz and D. Zagzag, *CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1α.* BMC Cancer, 2013. **13**: p. 347.
19. Torphy, R.J., Y. Sun, R. Lin, A. Caffrey-Carr, Y. Fujiwara, F. Ho, E.N. Miller, M.D. McCarter, T.R. Lyons, R.D. Schulick, et al., *GPR182 limits antitumor immunity via chemokine scavenging in mouse melanoma models.* Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 97.
20. Sjöberg, E., M. Meyrath, A. Chevigné, A. Östman, M. Augsten and M. Szpakowska, *The diverse and complex roles of atypical chemokine receptors in cancer: From molecular biology to clinical relevance and therapy.* Adv Cancer Res, 2020. **145**: p. 99-138.
21. Szpakowska, M., G. D'Uonnolo, R. Luís, A. Alonso Bartolomé, M. Thelen, D.F. Legler and A. Chevigné, *New pairings and deorphanization among the atypical chemokine receptor family - physiological and clinical relevance.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1133394.
22. McKimmie, C.S., A.R. Fraser, C. Hansell, L. Gutiérrez, S. Philipsen, L. Connell, A. Rot, M. Kurowska-Stolarska, P. Carreno, M. Pruenster, et al., *Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1.* J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3353-63.
23. Pacifico, F., A. Lepore, S. Mellone, L. Sanguigno, G. Federico, A. Greco, A. Brunetti and A. Leonardi, *The chemokine scavenging receptor D6/ACKR2 is a target of miR-146a in thyroid cancer.* Genes Cancer, 2017. **8**(5-6): p. 577-588.
24. Shams, K., M. Kurowska-Stolarska, F. Schütte, A.D. Burden, C.S. McKimmie and G.J. Graham, *MicroRNA-146 and cell trauma down-regulate expression of the psoriasis-associated atypical chemokine receptor ACKR2.* J Biol Chem, 2018. **293**(8): p. 3003-3012.
25. Bonecchi, R., B. Savino, N. Caronni, G. Celesti, A. Mantovani and M. Locati, *Atypical chemokine receptor 2: a brake against Kaposi's sarcoma aggressiveness.* Oncoimmunology, 2014. **3**(12): p. e955337.
26. Lequeux, A., M.Z. Noman, M. Xiao, K. Van Moer, M. Hasmim, A. Benoit, M. Bosseler, E. Viry, T. Arakelian, G. Berchem, et al., *Targeting HIF-1 alpha transcriptional activity drives cytotoxic immune effector cells into melanoma and improves combination immunotherapy.* Oncogene, 2021. **40**(28): p. 4725-4735.
27. Weber, M., E. Blair, C.V. Simpson, M. O'Hara, P.E. Blackburn, A. Rot, G.J. Graham and R.J. Nibbs, *The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(5): p. 2492-508.
28. Logsdon, D.P., F. Shah, F. Carta, C.T. Supuran, M. Kamocka, M.H. Jacobsen, G.E. Sandusky, M.R. Kelley and M.L. Fishel, *Blocking HIF signaling via novel inhibitors of CA9 and APE1/Ref-1*

dramatically affects pancreatic cancer cell survival. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13759.
29. Palazon, A., P.A. Tyrakis, D. Macias, P. Veliça, H. Rundqvist, S. Fitzpatrick, N. Vojnovic, A.T. Phan, N. Loman, I. Hedenfalk, et al., *An HIF-1α/VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression.* Cancer Cell, 2017. **32**(5): p. 669-683.e5.
30. Gowhari Shabgah, A., F. Jadidi-Niaragh, H. Mohammadi, F. Ebrahimzadeh, M. Oveisee, A. Jahanara and J. Gholizadeh Navashenaq, *The Role of Atypical Chemokine Receptor D6 (ACKR2) in Physiological and Pathological Conditions; Friend, Foe, or Both?* Front Immunol, 2022. **13**: p. 861931.
31. Aldinucci, D. and A. Colombatti, *The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression.* Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 292376.

ANNEXE V : Curriculum vitæ



Alice BENOIT

PROFILE

Over the course of my career, I have developed strong project management skills, from applying for funding, planning and organizing to writing scientific articles and sharing knowledge in a pedagogical way. I excel at working independently and collaboratively, and I am keen on continuous learning and self-improvement. My flexible nature allows me to seamlessly navigate diverse environments and thrive in dynamic circumstances. I'm looking to apply these skills and experiences to a new professional opportunity.

CONTACT

+33 7 xx xx xx xx

alice.benoit@outlook.fr

Thionville, France

www.linkedin.com/in/alice-benoit

LANGUES

French: native language

Anglais : advanced level (written and spoken)

CERTIFICATIONS

- **Project Management** – IAE Metz, France – 6-17 November 2023
- **University diploma in animal experimentation**: Design and implementation of procedures on rodents and lagomorphs – University of Lorraine, France - 2021

GRANTS AND AWARDS

- **Award Lydie et Michel Wittner**, Fondation de France (N°: 00147956 / EF-2023-40165) – December 20, 2023
- **FNRS** : « IMPACT 21-2: Improving cancer immunotherapy by targeting hipoxia » (reference 40018525) – November 01, 2023
- **FNRS** : « IMPACT 21: Improving cancer immunotherapy by targeting hypoxia » (reference 40007581) – October 07, 2021
- **LIONS Action « Vaincre le Cancer »** reference n°22116290 – January 12, 2020

PROFESSIONAL EXPERIENCE

LUXEMBOURG INSTITUTE OF HEALTH | 2020 – 2024

PhD Student, Luxembourg

Identification of the role of HIF-1α-dependent hypoxia in the regulation of ACKR2 (Atypical Chemokine Receptor 2) expression in cancer.

INSTITUT DE CANCEROLOGIE ALEXIS VAUTRIN | January – July 2019

Internship, Vandoeuvre-lès-Nancy – France

Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study.

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE | January – March 2018

Internship, Boston – USA

Mechanisms of resistance to Prexasertib used by BRCA-1 deficient cancerous cell lines.

EDUCATION

2020 – 2024 | Luxembourg

PhD in Life Sciences and Health
Defense scheduled for **June 26, 2024**
University of Lorraine, France

2017 – 2019 | Nancy-France

Master in Health Engineering – Specialty in Bioengineering, Nanosystems, Pharmaceuticals, Quality
Rank : 1/14
University of Lorraine, France

2014 – 2017 | Nancy-France

Bachelor in Life Sciences – Specialty in Biology
University of Lorraine

SCIENTIFIC SKILLS

Computer skills: Office suite, CytExpert, GraphPad Prism, ImageJ, cBioportal, NCBI BLAST, MCAST, JASPAR.

Microbiology: bacterial transformation and amplification, DNA isolation.

Animal experimentation: intraperitoneal and subcutaneous injections, anaesthesia, blood collection (tail and heart puncture), collection and cross-sectioning of mouse brain.

Histology: cryostat, immunohistochemistry, immunofluorescence, H&E.

Immunology: flow cytometry, ELISA, cytokine array, immunostaining, immunoprécipitation.

Molecular biology: RNA/DNA extraction and purification, PCR, RT-qPCR, electrophoresis, Western blot, ChIP-qPCR, RNA sequencing.

Cellular biology: cell culture of murine and human cell lines, culture under hypoxic conditions, RNA interference, lentiviral particle transduction.

PUBLICATIONS

Benoit A, Lequeux A, Harter P, Berchem G, Janji B. **Atypical Chemokine Receptor 2 expression is directly regulated by Hypoxia Inducible Factor-1 alpha in cancer cells under hypoxia**. **Submitted (2024)**

Benoit A, Vogin G, Duhem C, Berchem G, Janji B. **Lighting Up the Fire in the Microenvironment of Cold Tumors: A Major Challenge to Improve Cancer Immunotherapy**. *Cells* **2023**, 12, 1787.

Xiao M†, **Benoit A**†, Hasmim M, Duhem C, Vogin G, Berchem G, Noman MZ, Janji B. **Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies**. *Front Oncol*. **2021** Feb 25;11:626309.

Lequeux A, Noman MZ, Xiao M, Van Moer K, Hasmim M, **Benoit A**, Bosseler M, Viry E, Arakelian T, Berchem G, Chouaib S, Janji B. **Targeting HIF-1 alpha transcriptional activity drives cytotoxic immune effector cells into melanoma and improves combination immunotherapy**. *Oncogene*. **2021** Jul;40(28):4725-4735.

Yakavets, I., Francois, A., **Benoit, A**. et al. **Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study**. *Sci Rep* 10, 21273 (**2020**).

Résumé

Identification du rôle de l'hypoxie dépendante de HIF-1α dans la régulation de l'expression de ACKR2 (Atypical Chemokine Receptor 2) dans le cancer

Mots clés : Atypical chemokine receptors ; cancer ; hypoxie ; chimiokines ; mélanome

Les thérapies anti-cancéreuses, notamment l'immunothérapie, ont fait des progrès considérables ces dernières années ; cependant, seul un petit nombre de patients en tire un bénéfice clinique important et durable. Cela s'explique en partie par l'échec des cellules immunitaires cytotoxiques à infiltrer le microenvironnement des tumeurs. L'infiltration immunitaire dépend notamment du réseau de chimiokines, régulé en partie par les ACKRs. Le but de ce projet de thèse était d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de ACKR2, qui est impliqué dans la régulation du réseau de chimiokines pro-inflammatoires. Des données *in silico* ont montré que les promoteurs murins et humains de ACKR2 contiennent des éléments de réponse à l'hypoxie. *In vitro*, les cellules de cancer colorectal, de mélanome et de cancer du sein hypoxiques surexprimaient ACKR2, ce qui n'était plus le cas pour les cellules présentant une délétion de HIF-1α. *In vivo*, une diminution de ACKR2 était également observée dans les tumeurs délétées en HIF-1α et associée à une hausse de CCL5 et de l'infiltration immunitaire. L'immunoprécipitation de chromatine a montré que HIF-1α se lie directement sur les motifs HRE du promoteur de ACKR2 dans les cellules de mélanome.

Abstract

Identification of the role of HIF-1α-dependent hypoxia in the regulation of ACKR2 (Atypical Chemokine Receptor 2) expression in cancer

Key words: Atypical chemokine receptors; cancer; hypoxia; chemokines; melanoma

Anti-cancer therapies, particularly immunotherapy, have made considerable progress in recent years; however, only a small number of patients derive significant and lasting clinical benefit. The incapacity of cytotoxic immune cells to infiltrate the tumor microenvironment explains in part this phenomenon. Immune infiltration depends in particular on the chemokine network, regulated in part by ACKRs. The aim of this thesis was to study the mechanisms involved in the regulation of ACKR2, which regulates the pro-inflammatory chemokine network. *In silico* data showed that both murine and human ACKR2 promoters contain hypoxia response elements. *In vitro*, hypoxic colorectal, melanoma and breast cancer cells overexpressed ACKR2, which was no longer the case for cells with a deletion of HIF-1α. *In vivo*, ACKR2 expression was also decreased in HIF-1α-deleted tumors and associated with increased CCL5 and immune infiltration. Chromatin immunoprecipitation showed HIF-1α directly binds onto the HRE motifs of ACKR2 promoter in melanoma cells.